Determinierung funktioneller Unterschiede der Interaktion von G-Proteinen mit den Mitgliedern der RH-RhoGEF-Familie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Fabian Redlin
aus Hanau

Marburg an der Lahn
2022

Erstgutachter: Prof. Dr. Moritz Bünemann

Zweitgutachter: Prof . Dr. Jens Kockskämper

Eingereicht am 07.10.2022

Tag der mündlichen Prüfung am 18.11.2022

Hochschulkennziffer: 1180

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis V

Kapitel 1: Zusammenfassung 1

Kapitel 2: Summary 3

Kapitel 3: Einleitung

3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren 5

3.1.1 Die eukaryotische Zellmembran und deren Rezeptoren 5

3.1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren 6

3.1.3 Klassifizierung und Aufbau von GPCRs 8

3.1.4 Aktivierung von GPCRs 10

3.1.5 G-Proteine 12

3.1.6 GPCR Signaltransduktion und Abschaltung 14

3.1.7 Der Thromboxan-Rezeptor 16

3.2 Rho-GEFs 17

3.2.1 Allgemeines zu RhoGEFs 17

3.2.2 RH-RhoGEFs und deren Struktur 21

3.2.3 $G\alpha_{12/13}$ – RH-RhoGEF – Rho-GTPase Signalkaskade 22

3.2.4 RH-RhoGEFs als RGS-Proteine 27

3.2.5 Physiologie und Pathophysiologie 28

3.3 Zielsetzung 32

Kapitel 4: Material

4.1 Verbrauchsmaterialien 34

4.2 Chemikalien 34

4.3 Geräte 36

4.4 Software und Datenbanken....37
4.5 Kits....38
4.6 Plasmide....39
4.7 Oligonukleotide....42
4.8 Verwendete Zelllinien....50
4.9 Puffer/ Lösungen....50
4.9.1 Zellkultur....50
4.9.2 Mikroskopie....51
4.9.3 Weitere Lösungen und Puffer....52

Kapitel 5: Methoden

5.1 Zellkultur....55
5.1.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen....55
5.1.2 Transiente Transfektion mit Effectene®....56
5.1.3 Transiente Transfektion mit Metafectene® PRO....56
5.1.4 Transiente Transfektion mit PEI....57
5.1.5 Transfektionsprotokolle....58
5.1.6 Beschichten v. Deckgläschen mit PLL u. Aussäen transfizierter Zellen....59
5.2 Molekularbiologische Methoden....60
5.2.1 PCR....60
5.2.2 Agarose-Gelelektrophorese....61
5.2.3 Gel-Extraktion/Aufreinigung....62
5.2.4 Restriktionsverdau....63
5.2.5 Ligation....63
5.2.6 Kultivierung von E. coli....64
5.2.7 Generierung chemisch kompetenter E. coli....64
5.2.8 E. coli-Transformation mittels KCM-Methode....65
5.2.9 E. coli-Transformation mittels Hitzeschock. 65
5.2.10 Midi-Präparation....66
5.2.11 Messung und Einstellung der DNA-Konzentration....67

5.2.12 DNA-Sequenzierung....68
5.3 Klonierung....69
5.3.1 Punktmutationen/Mutagenese mittels Mutageneseprimern....69
5.3.2 Punktmutationen, Insertionen, Deletionen mittels NEB® Q5 Site-Directed Mutagenesis-Kit....70
5.3.3 Gibson Assembly....71
5.4 Fluoreszenzmikroskopie....75
5.5 FRET- Experimente....76
5.5.1 Grundlagen und Voraussetzungen von FRET....76
5.5.2 Mikroskop....81
5.5.3 Durchbluten und Falschanregung....83
5.5.4 Allgemeine Durchführung von FRET-Messungen....85
5.5.5 $G\alpha_{13}$-RhoGEF-Interaktionsassay....89
5.5.6 Gβγ-RhoGEF-Interaktionsassay....90
5.5.7 Konzentrations-Wirkungs-Kurven....91
5.5.8 G-Protein-Aktivierungsassay....91
5.6 BRET-Experimente....93
5.6.1 BRET-Assay....93
5.7 Dual-Luciferase Assay-System....94
5.8 Konfokalmikroskopie....95
5.9 Statistik....96

Kapitel 6: Ergebnisse

6.1 $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Interaktion....97
6.1.1 Interaktionsassay....97
6.1.2 $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Interaktionskinetiken....104
6.1.3 $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Konzentration-Wirkungs-Kurven....106
6.1.4 FRET zwischen PDZ-RhoGEF und $G\alpha_{13}$....109
6.1.5 Trunkierte p115- und LARG-Konstrukte in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$....111
6.1.6 Dissoziationskinetik initialer RH-RhoGEF-Chimäre....116

6.1.7 Einfluss der RH-Domäne auf die Interaktion mit $G\alpha_{13}$ 117
6.1.8 Strukturvergleich RH-RhoGEFs 120
6.1.9 Einfluss der Fluorophorplatzierung in $G\alpha_{13}$ 123
6.1.10 Dissoziationskinetik der Mutante p115-E32G 125
6.1.11 Mutante $G\alpha_{13}$-R128A in der Interaktion mit RH-RhoGEFs 127
6.1.12 $G\alpha_{13}$-LARG-Interaktion 130
6.1.13 Funktionalität der generierten Konstrukte 136
6.2 Gβγ-RH-RhoGEF Interaktion 139
6.2.1 Interaktionsassay und Kinetik 139
6.2.2 Einfluss von Gα auf FRET zwischen Gγ und den RH-RhoGEFs 142
6.2.3 Interaktionskinetik orientiert sich an $G\alpha_{13}$-RhoGEF 143
6.2.4 Ausschluss von agonistinduziertem bystander-FRET 144
6.2.5 Trennung der $G\alpha_{13}$/Gβγ –Untereinheiten 146

Kapitel 7: Diskussion

7.1 $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Interaktion 148
7.2 Gβγ-RH-RhoGEF-Interaktion 157
7.3 Methoden 160
7.4 Abschließende Worte 162

Literaturverzeichnis 163

Abbildungsverzeichnis 172

Tabellenverzeichnis 175

Publikationen und Konferenzbeiträge 176

Erklärung 178

Danksagung 179

Lebenslauf 180

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	*Analysis of variance*, Varianzanalyse
AP-1	*Activator protein 1*
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	*arbitrary unit*, willkürliche Einheit
AUC	*area under the curve* (Fläche unter der Kurve)
BRET	Biolumineszenz Resonanz Energietransfer
BSA	Bovines Serum-Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDC42	*Cell division control protein 42 homolog*
CFP	*Cyan fluorescent protein*, cyan fluoreszierendes Protein
Dbl-like	*diffuse B-cell lymphoma-like*
DH(-Domäne)	*Dbl-homology*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Zellkulturmedium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DOCK-like	*Dedicator of cytokinesis*-like
EC50	Halbmaximal effektive Konzentration
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	*Fetal calf serum*, fetales Kälberserum
FRET	Förster Resonanz Energietransfer
fw	*forward*, vorwärts
GAP	*GTPase-activating protein*
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	*guanine nucleotide exchange factor*
GFP	*Green fluorescent protein*, grün fluoreszierendes Protein

GIT	Gastrointestinaltrakt
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
HEK-Zellen	*Human embryonic kidney cells*, humane embryonale Nierenzellen
ICL	*Intracellular loop*, intrazelluläre Schleife
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kb	Kilobasen
LARG	*leukemia-associated RhoGEF*
Lbc	*lymphocyte blast crisis*
LPA	Lysophosphatidsäure
mDia	Diaphanous
MLCP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
mTurq	mTurquoise
MRTFA	*myocardin related transcription factor A*
NEB	*New England Biolabs*
NFκB	*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
ns	nicht signifikant
p115	p115-RhoGEF
PBS	*Phosphate-buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	*Polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PDZ-RhoGEF
PDZ(Domäne)	*postsynaptic density 95, disk large, zona occludens-1*
PEI	Polyethylenimine
PH(-Domäne)	*pleckstrin-homolgy*
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLCβ	Phospholipase Cβ

PLL	Poly-L-Lysin
PGH_2	Prostaglandin H_2
Rac1	*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
rgRGS	*RhoGEF fragment of N-terminal GAP motif and RH domain*
RGS	*Regulators of G protein signaling*
RH(-Domäne)	*RGS homology*
RhoA	*Ras homolog family member A*
RhoGEF	*Rho guanine nucleotide exchange factor*
RhoGDIs	*Rho GDP-dissociation inhibitor*
ROCK1/2	*rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1*
ROI	*Region of interest*
rv	*reverse*, rückwärts
SEM	Standardfehler
SRF	Serum-Response-Faktors
SRE	Serum-Response-Element
TM	Transmembranäre Helix
TP-Rezeptor	Thromboxan-Rezeptor
wt	*wildtype*, Wildtyp
YAP	*yes-associated protein 1*
YFP	*Yellow fluorescent protein*, gelb fluoreszierendes Protein

Kapitel 1: Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen die größte Gruppe von Transmembranrezeptoren im menschlichen Körper und erfüllen unzählige physiologische Aufgaben. Die drei RH-RhoGEFs (*GEF*=GTP-Austauschfaktor) p115-RhoGEF, LARG (*leukemia-associated RhoGEF*) und PDZ (*postsynaptic density 95, disc large, zona occludens-1*)-RhoGEF verbinden GPCRs mit der RhoA Signalkaskade über ihre Aktivierung durch die $G\alpha_{12/13}$-Unterfamilie der G-Proteine. Da über die RhoA Signalkaskade die Form von Zellen, Zelldifferenzierung und Zellwachstum reguliert werden, bieten RH-RhoGEFs einen Weg für GPCRs diese physiologischen Prozesse zu steuern. Während die drei RH-RhoGEFs unterschiedlich stark in verschiedenen Organen und Geweben exprimiert werden, ist nicht bekannt ob sie auch funktionelle Unterschiede bezüglich ihrer Aktivierung durch GPCRs zeigen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Interaktion der einzelnen RH-RhoGEFs mit $G\alpha_{13}$ hinsichtlich der Interaktionskinetiken und der Agonistsensitivität untersucht. In einem zweiten Projekt dieser Arbeit wurden die drei RH-RhoGEFs auch in Bezug auf eine mögliche Interaktion mit Gβγ-Untereinheiten untersucht.

Um diese wissenschaftlichen Fragen zu adressieren, wurde ein auf FRET basierender Einzelzell-Assay verwendet, welcher die Beobachtung der G-Protein–RH-RhoGEF Interaktion, nach Stimulation des Thromboxan-Rezeptors, in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung erlaubte. Zusätzlich wurden unterschiedliche Klonierungsstrategien verwendet, um eine Vielzahl von Mutanten und Chimären zu erschaffen, welche Aufschlüsse über funktionelle und strukturelle Zusammenhänge gaben. Konfokale Bildgebung, BRET und das *Dual-Luciferase Reporter Assay-System* wurden als unterstützende Methoden verwendet.

Es war möglich, spezifische Interaktionen zwischen den RH-RhoGEFs und $G\alpha_{13}$-Untereinheiten aufzuzeigen. Hierbei wies p115-RhoGEF eine signifikant kürzere Interaktion mit $G\alpha_{13}$ auf als LARG und PDZ-RhoGEF. Die Interaktionen zeigten außerdem einen kausalen Zusammenhang zwischen Interaktionskinetik und

Agonistsensitivität. Durch Mutanten und Chimären war es möglich die strukturelle Ursache für die Unterschiede zwischen den RH-RhoGEFs auf eine einzige Aminosäure in der rgRGS-Domäne von p115-RhoGEF einzugrenzen. Die Mutation dieser Aminosäure führte zu einer erhöhten Interaktionszeit mit $G\alpha_{13}$, welche mit LARG und PDZ-RhoGEF vergleichbar war und gleichzeitig die Agonistsensitivität erhöhte. Diese Aminosäure in der rgRGS-Domäne von p115-RhoGEF bildet eine polare Interaktion mit einer Aminosäure in der alphahelikalen Domäne von $G\alpha_{13}$. Die Mutation dieser Aminosäure zeigte dieselbe veränderte $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF Interaktionsdynamik. FRET Messungen der Gβγ-RH-RhoGEF Interaktion zeigte robuste Signale, deren Kinetik der $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF Interaktionen glichen. Keine FRET-Änderung konnte beobachtet werden, wenn andere Gα-Untereinheiten außer $G\alpha_{13}$ co-transfiziert wurden.

Obwohl die rgRGS Domänen von p115-RhoGEF, LARG (Suzuki et al., 2009) und einer PDZ-RhoGEF Chimäre (Chen et al., 2008) *in vitro* GAP (*GTPase-activating protein*)-Aktivität gegenüber $G\alpha_{13}$ zeigten, suggerierten die Ergebnisse unserer Herangehensweise in intakten Zellen, dass nur p115-RhoGEF *in vivo* GAP-Aktivität gegenüber $G\alpha_{13}$ zeigt, da die GAP-Aktivität die Länge der Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen bestimmt. Im Gegensatz dazu verlangsamte LARG die Neubildung von $G\alpha_{13}$-Heterotrimeren (Bodmann et al., 2017), was einen wichtigen funktionellen Unterscheid zwischen den PDZ-Domäne beinhaltenden RH-RhoGEFs und p115-RhoGEF nahelegt, welcher sich in p115-RhoGEFs GAP-Aktivität in lebenden Zellen wiederspiegelt. Die Ergebnisse der Gβγ-RH-RhoGEF weisen darauf hin, dass sich $G\alpha_{13}$ und Gβγ-Untereinheiten bei der Aktivierung nicht vollständig trennen und zusammen an die Effektoren von $G\alpha_{13}$ binden.

Angesichts der Vielfallt von Krankheiten, welche mit der $G\alpha_{13}$-RhoGEF-RhoA Signalkaskade in Verbindung stehen, wäre es wichtig, die funktionelle Rolle der verschiedenen RH-RhoGEFs *in vivo* zu verstehen. Die Punktmutanten von p115-RhoGEF und $G\alpha_{13}$ und die viele Chimären bieten dabei nützliche Werkzeuge um die physiologischen Konsequenzen der in dieser Arbeit aufgedeckten funktionellen Unterschiede der Interaktionen von RH-RhoGEFs mit $G\alpha_{13}$ zu untersuchen.

Kapitel 2: Summary

GPCRs represent the largest group of transmembrane receptors and fulfill countless physiological tasks. The three RH-RhoGEFs (Guanine nucleotide exchange factors) p115-RhoGEF, LARG (leukemia-associated RhoGEF) and PDZ (postsynaptic density 95, disc large, zona occludens-1)-RhoGEF link G-protein coupled receptors (GPCRs) with RhoA signalling through being activated by the $G\alpha_{12/13}$ subfamily of G proteins. While the RhoA signaling cascade regulates cell shape, cell differentiation and cell growth, RH-RhoGEFs provide a way for GPCRs to regulate these physiological processes. While the three RH-RhoGEFs are expressed in different organs and tissues, it is not known whether they also exhibit functional differences with respect to their activation via GPCRs. Therefore, the interaction of the various RH-RhoGEFs with $G\alpha_{13}$ regarding their interaction kinetics and agonist sensitivity has been examined. In a second project of this work the three RH-RhoGEFs were also examined with respect to their potential interaction with Gβγ subunits.

A FRET-based single cell approach has been used to address these scientific questions that allowed the observation of the G protein-RH-RhoGEF interaction, upon the stimulation of the thromboxane receptor, in a high spatial and temporal resolution. In addition different cloning strategies have been used to create numerous mutants and chimeras to address the problems at hand. Confocal imaging, BRET and the Dual-Luciferase Reporter Assay-System have been used as supporting methods.

I was able to show the specific interactions of the RH-RhoGEFs with $G\alpha_{13}$ subunits. Here p115-RhoGEF displayed a significantly shorter interaction with $G\alpha_{13}$ than LARG and PDZ-RhoGEF. The interactions also showed a causative connection between interaction kinetics and agonist sensitivity. Through the use of mutants and chimeras it was possible to narrow the structural basis for these differences down to a single amino acid in the rgRGS domain of p115-RhoGEF. The mutation of this single amino acid led to an increased interaction time with $G\alpha_{13}$ comparable to LARG and PDZ-RhoGEF, while also enhancing the agonist sensitivity. This amino acid in the rgRGS

domain of p115-RhoGEF forms a polar interaction with an amino acid in the alpha helical domain of $G\alpha_{13}$. Mutation of this amino acid in $G\alpha_{13}$ showed the same results in altering the interaction dynamics of the $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF interaction. The measurements of the Gβγ-RH-RhoGEF interactions by means of FRET displayed robust signals with kinetics that resembled the $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF interaction, while no signals could be observed when Gα subunits other than $G\alpha_{13}$ were co-transfected.

While the rgRGS domains of p115-RhoGEF, LARG (Suzuki et al., 2009) and a PDZ-RhoGEF chimera (Chen et al., 2008) showed in vitro GAP (GTPase-activating protein) activity towards $G\alpha_{13}$, the results of the intact single cell approach of this work suggests that only p115-RhoGEF displays in vivo GAP activity towards $G\alpha_{13}$, as the GAP activity determines the length of the interaction between the two proteins. In contrast, LARG slowed down $G\alpha_{13}$ reassembly (Bodmann et al., 2017), suggesting that an important functional difference between the PDZ domain containing RH-RhoGEFs and p115-RhoGEF is based on a functional GAP activity in living cells only detectable in p115-RhoGEF. The results of the Gβγ-RH-RhoGEF interaction study indicate that the $G\alpha_{13}$ and Gβγ subunits do not fully dissociate upon activation and bind the $G\alpha_{13}$ effectors together.

Giving the plethora of diseases the $G\alpha_{13}$-RhoGEF-RhoA signaling axis is involved in, it would be important to understand the functional role of the different RH-RhoGEFs in vivo. The p115-RhoGEF and $G\alpha_{13}$ point mutations, as well as the numerous chimeras created in this work provide useful tools to study the physiological consequences of the functional differences in the RH-RhoGEF interactions with $G\alpha_{13}$ that were uncovered in this work.

Kapitel 3: Einleitung

3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

3.1.1 Die eukaryotische Zellmembran und deren Rezeptoren

Eukaryotische Zellen (wie menschliche und generell tierische Zellen) sind von einer Biomembran (genannt Zellmembran) umgeben, welche aus einer Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen und Kohlenhydraten besteht. Diese Zellmembran trennt Zellen untereinander als Einheit und als Reaktionsraum, sodass jede Zelle ihren eigenen Stoffwechsel besitzt. Die Zellmembran übernimmt viele für das Leben unverzichtbare Aufgaben, wie zum Beispiel den Stoffaustausch mit der Umgebung durch Membranproteine, aber auch die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, welche die Entstehung mehrzelliger Organismen möglich macht. Damit Zellen in einem Zellverbund als Gewebe, Organ, oder letztendlich als Organismus fungieren können, ist die Kommunikation zwischen einzelnen Zellen und zwischen Funktionseinheiten, wie Organen, unverzichtbar. Diese Kommunikation findet neben elektrochemischen Gradienten, welche beispielsweise wie im Fall eines Aktionspotentiales über Ionenkanäle und Pumpen gesteuert werden können, ganz hauptsächlich über Rezeptoren statt.

Rezeptoren sind Proteine oder Proteinkomplexe, welche sich dadurch auszeichnen, dass sie durch Signalmoleküle aktiviert werden können und dadurch intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren oder inhibieren. Diese Signalkaskaden können vielfältige kurzfristige und langfristige Effekte in Zellen auslösen, angefangen von kurzfristigen Cytoskelettveränderungen, wie Muskelkontraktionen, über die Veränderung der Proteinexpression, durch An- und Ausschalten von Genen, bis hin zur Apoptose. Man unterscheidet zwischen kernständigen Rezeptoren, welche sich, wie der Name schon sagt, im Zellkern befinden und meistens durch Hormone und andere lipophile Stoffe

adressiert werden und membranständigen Rezeptoren. Membranrezeptoren können weiterhin unterschieden werden in ionotrope Rezeptoren, bei denen es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle handelt und metabotrope Rezeptoren, bei denen eine Signalweiterleitung über die Konzentrationsänderung von sekundären Botenstoffen (*second messenger*) stattfindet. Solche metabotropen Rezeptoren können Proteinkinasen sein, welche Signalkaskaden katalysieren, in den allermeisten Fällen handelt es sich jedoch um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

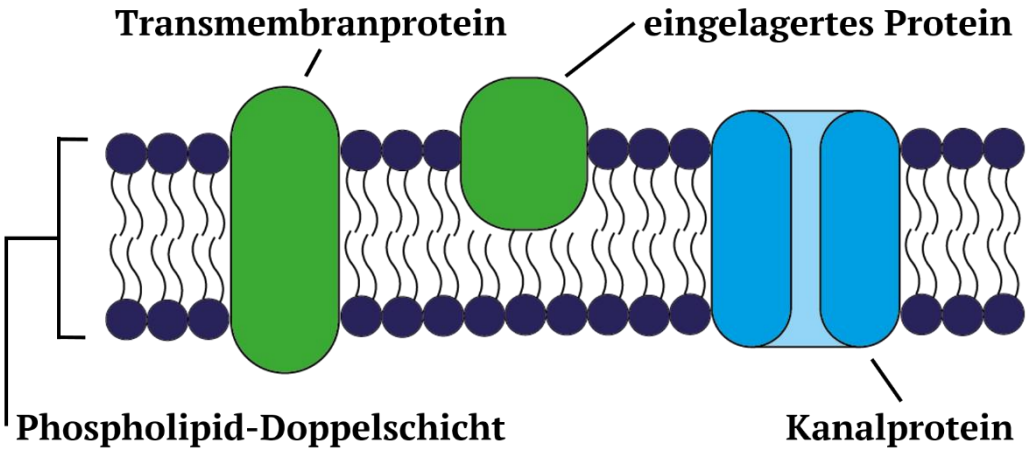

Abbildung 3.1 | Zellmembran schematisch und stark vereinfacht.

3.1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Im menschlichen Körper sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) an einem Großteil aller physiologischen und pathophysiologischen Prozesse beteiligt. Diese Prozesse reichen von Sinneswahrnehmungen wie Schmecken, Riechen und Sehen, über physiologische Vorgänge im zentralen Nervensystem, im kardiovaskulären System, im Immunsystem, beim Metabolismus und der Reproduktion, bis hin zu pathophysiologischen Vorgängen: Schmerzen, neurologische Erkrankungen, Hypertonie, Krebs, Allergien, Diabetes um einige Beispiele zu nennen (Stauch und Cherezov, 2018). Durch die vielfältigen Aufgaben ist es nicht verwunderlich, dass

GPCRs mit mehr als 800 Vertretern die größte aller Rezeptorfamilien im menschlichen Genom darstellen (Isberg et al., 2016). Von diesen 800 Rezeptoren haben mehr als die Hälfte sensorische Funktionen. So gibt es etwa 400 verschiedene olfaktorische GPCRs (Riechen), 33 GPCRs für das Schmecken, zehn GPCRs für Lichtwahrnehmung und fünf für Pheromon-Signale (Mombaerts, 2004).

Aufgrund der großen Anzahl vorhandener GPCRs und damit vermittelter Prozesse, die adressiert werden können, eignen sich GPCRs hervorragend als Zielstruktur für Arzneimittel (*drug targets*). Dadurch, dass GPCRs oft extrazellulär durch körpereigene kleine Moleküle gesteuert werden und potentielle Arzneistoffe somit nicht durch die Zellmembran diffundieren müssen, um eine Wirkung in der Zelle zu erzielen, verstärken diese Eignung. Demzufolge ist wenig verwunderlich, dass bereits ca. ein Drittel aller zugelassenen *small molecule*-Arzneistoffe (kleine Moleküle) GPCRs adressieren (Santos et al., 2016).

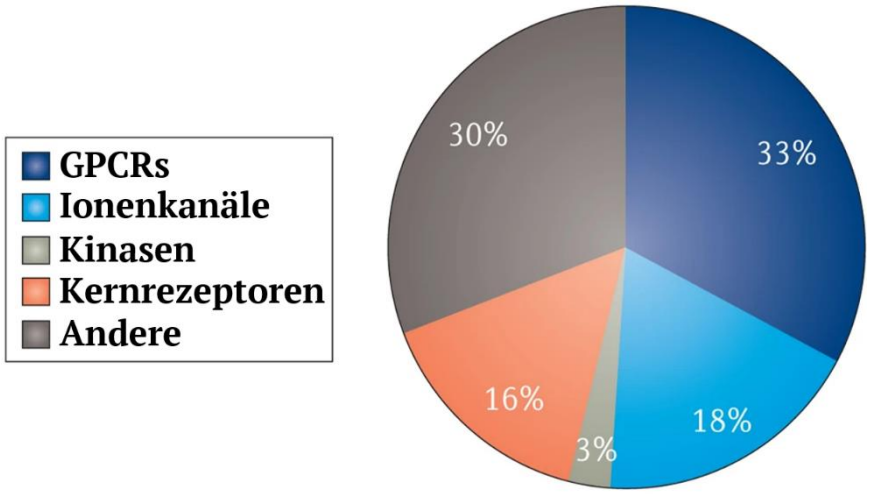

Abbildung 3.2 | Arzneimittelzulassungen nach Zielstruktur modifiziert nach (Santos et al., 2016).

3.1.3 Klassifizierung und Aufbau von GPCRs

GPCRs lassen sich gemäß phylogenetischer Klassifikation in die sechs Gruppen A-F unterteilen, wobei die Klassen D und E (*Fungal mating pheromone receptors* und cyclische AMP-Rezeptoren) nicht in Wirbeltieren zu finden sind (Alexander et al., 2019). Aus diesem Grund wird häufig auch das Klassifikations-Schema „GRAFS“ verwendet, welche, abgesehen von den Klassen D und E, weitestgehend mit der A-F Klassifikation übereinstimmt. Hierbei wird zwischen Glutamatrezeptoren (Klasse C), Rezeptoren der Rhodopsinfamilie (Klasse A), Adhäsionsrezeptoren, Frizzled-Rezeptoren und Rezeptoren der Sekretinfamilie unterschieden (Fredriksson et al., 2003). Rezeptoren der Klasse A (Rhodopsinfamilie) stellen dabei die mit Abstand größte Familie dar und können im Körper von einer Vielzahl an *small molecules*, Neurotransmittern, Peptiden und Hormonen adressiert werden.

Charakteristisch für den Aufbau aller GPCRs sind die sieben transmembranären α-Helices, welche den Rezeptor in der Membran fixieren. Aus diesem Grund werden GPCRs auch als 7TMR (7-Transmembranrezeptoren) bezeichnet. Die sieben transmembranären α-Helices sind untereinander abwechselnd über intrazelluläre Schleifen (*intracellular loops* 1-3 = ICL1-3) und extrazelluläre Schleifen (*extracellular loops* 1-3 = ECL1-3) verknüpft. An der Außenseite der Membran, an TM1 (Transmembranhelix 1) befindet sich der N-Terminus des Proteins, während sich auf der Innenseite der Membran, gekoppelt an TM7, Helix 8 und der C-Terminus finden lassen (Rosenbaum et al., 2009). GPCRs lassen sich zur vereinfachten Darstellung als zweidimensionalen „*snake-plot*“ darstellen (Abbildung 3.3), diese ignoriert jedoch die dreidimensionale Struktur als Ring in der Membran, durch welche oft eine Bindetasche für Liganden gebildet wird (Abbildung 3.4).

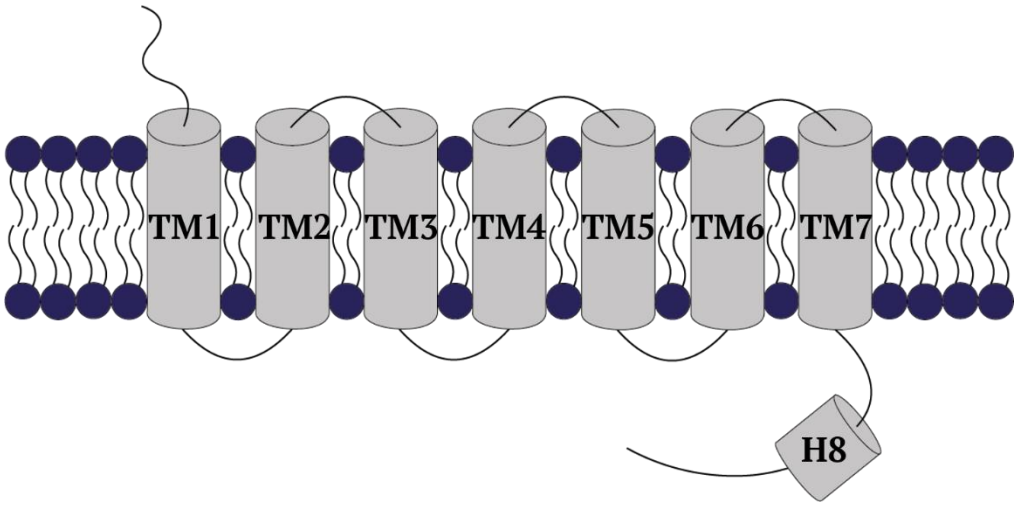

Abbildung 3.3 | GPCR snake-plot schematischer Aufbau von GPCRs, TM= transmembranäre Helix, H= Helix.

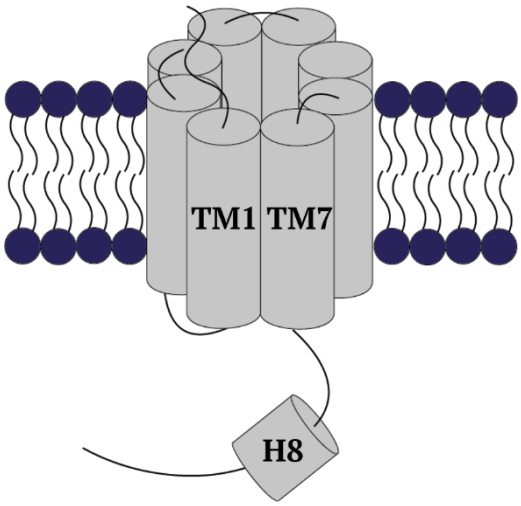

Abbildung 3.4 | Dreidimensionaler Aufbau GPCR, schematisch.

3.1.4 Aktivierung von GPCRs

Die Aufgabe von GPCRs als membranständige Rezeptoren ist die Weiterleitung von Signalen von außerhalb in die Zellen. GPCRs sind ligandengesteuert. Diese Liganden binden in der Regel von der extrazellulären Seite an den Rezeptor und können je nach Struktur unterschiedliche Effekte auslösen. Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwischen partiellen, vollen und Super-Agonisten, welche einen aktivierenden Effekt haben und Antagonisten, welche eine Konformationsänderung des Rezeptors blockieren und den Aktivierungszustand somit auf Basalaktivität-Niveau halten. Zusätzlich gibt es inverse Agonisten (partielle, volle), die durch Bindung eine inaktivere Konformation stabilisieren (Rosenbaum et al., 2009).

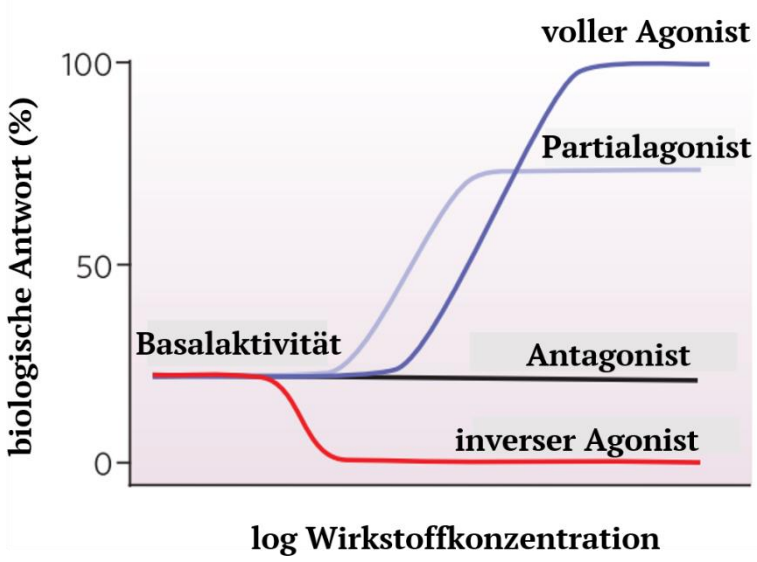

Abbildung 3.5 | Ligandeneffekte modifiziert nach (Rosenbaum et al., 2009).

Die meisten GPCRs besitzen eine intrinsische Aktivität (Basalaktivität), was bedeutet, dass die Rezeptoren auch in Abwesenheit von Liganden eine gewisse Bandbreite an verschiedenen Aktvierungszuständen (Konformationen) annehmen. Durch die Bindung eines Agonisten findet eine Konformationsänderung des GPCRs in eine aktivere Konformation statt, beziehungsweise eine aktivere Konformation wird

stabilisiert. Durch Fortschritte in der Kristallographie konnten in den letzten Jahren immer mehr Kristallstrukturen sowohl von GPCRs in Verbindung mit Agonisten (aktive Konformation) als auch mit Antagonisten (inaktive Konformation) erhalten werden, wodurch weitere Erkenntnisse zur Konformationsänderung gewonnen werden konnten (Congreve et al., 2020). Der Aktivitätszustand wird dabei maßgeblich durch eine strukturelle Neuordnung der Helices gesteuert, hauptsächlich durch die prägnante Auswärtsbewegung von Helix 6 (aber auch der Helices 5 und 7). Die Konformationsänderung bei Agonistbindung führt auf der intrazellulären Seite zum Freiwerden der Bindestelle für Effektormoleküle (Kobilka, 2012). Diese Effektormoleküle sind hauptsächlich G-Proteine, wodurch sich der Name GPCR (G-Protein-gekoppelter Rezeptor) ableitet, aber auch andere Proteine, beispielsweise Arrestine können intrazellulär an GPCRs binden.

Abbildung 3.6 | Konformationsänderung modifiziert nach (Latorraca et al., 2017), beispielhafte, schematische Darstellung der Konformationsänderung bei der Aktivierung eines GPCR (in diesem Fall des β2-adrenergen Rezeptors) mit Fokus auf TM6 (hervorgehoben).

3.1.5 G-Proteine

G-Proteine sind Proteine, welche Guanosintriphosphat (GTP) binden können. Abgesehen von den im Cytosol liegenden kleinen G-Proteinen (*small G proteins*), sind G-Proteine membranständige Heterotrimere und lassen sich somit in die drei Untereinheiten Gα, Gβ und Gγ unterteilen. Die Gα-Untereinheit bestehen aus der GTPase-Domäne und der α-helikalen Domäne, zwischen denen in der inaktiven Form GDP gebunden ist (Oldham und Hamm, 2008) und besitzt zusätzlich einen lipidischen Membrananker. Gβ- und Gγ-Untereinheiten treten gemeinsam (als Dimer) auf. Die Gβ-Untereinheit besitzt keinen Membrananker und wird durch die Bindung an der Gγ-Untereinheit an der Membran gehalten (Hillenbrand et al., 2015). G-Proteine können von der intrazellulären Seite an GPCRs binden. Diese Bindung ist von der Art und vom Aktivierungszustand des GPCRs und von der Art des G-Proteins abhängig. Während auch die Gβγ-Untereinheiten Effekte in der Zelle auslösen können (beispielsweise durch die Bindung an GIRK(*G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels*)-Kanäle (Glaaser und Slesinger, 2015) bei $G\alpha_i$-Aktivierung), werden die charakteristischen Signalkaskaden im Wesentlichen durch Gα-Untereinheiten bestimmt. Es wurden fünf Gβ- und zwölf Gγ-Isoformen entdeckt, wobei zurzeit nicht abschließend geklärt ist, welche Auswirkungen unterschiedliche Dimere auf die Interaktion mit der Gα-Untereinheit und GPCRs haben und ob durch verschiedene Dimere unterschiedliche Signalkaskaden oder Effekte in der Zellen angestoßen werden.

Im menschlichen Genom gibt es 16 Gene, die für Gα-Untereinheiten codieren. Die 16 daraus entstehenden Gα-Untereinheiten lassen sich in die vier Familien $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12/13}$ einteilen (Downes und Gautam, 1999). Diese vier Familien aktivieren unterschiedliche Signalkaskaden in Zellen.

$G\alpha_s$-Untereinheiten aktivieren Adenylylcyclasen, welche cAMP aus ATP synthetisieren. Durch die Aktivierung der Proteinkinase A durch cAMP werden intrazelluläre Proteine phosphoryliert, wodurch je nach Proteinausstattung der Zelle

unterschiedliche Signalkaskaden und Effekte in der Zelle angestoßen werden können (Wettschureck und Offermanns, 2005). $G\alpha_s$-Untereinheiten sind unter anderem an der (positiven) Regulierung der Herzfunktion (positiv inotrop, chronotrop, bathmotrop und lusitrop) beteiligt (Lohse et al., 2003), zudem kann $G\alpha_s$-Aktivierung zu Vasodilatation und Freisetzung von Hormonen führen. $G\alpha_s$-Untereinheiten wirken in diesem Sinne stimulierend, wohingegen $G\alpha_i$-Untereinheiten den gegenteiligen Effekt ausüben und somit inhibierend wirken. Sie inhibieren Adenylylcyclasen, wodurch die cAMP-Produktion und folglich auch die Aktivität der Proteinkinase A verringert wird (Simon et al., 1991). $G\alpha_i$-Untereinheiten bewirken beispielsweise eine (hemmende) Beeinflussung des Herzens und nimmt inhibierende Aufgaben im ZNS wahr (Harvey und Belevych, 2003; Glaaser und Slesinger, 2015).

Untereinheiten der $G\alpha_q$-Familie aktivieren Phospholipasen des Typs Cβ (PLCβ), durch welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die *second messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) hydrolysiert wird (McCudden et al., 2005). Während DAG in der Plasmamembran verbleibt und dort die Proteinkinase C (PKC) aktivieren kann, bindet IP_3 an den IP_3-Rezeptor, welcher die Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum bewirkt (Mizuno und Itoh, 2009). Über $G\alpha_q$-Untereinheiten werden unter anderem der Tonus von Glattmuskelzellen, die Plättchenaktivierung bei der Blutgerinnung und hormonabhängige Effekte reguliert (Sánchez-Fernández et al., 2014).

Mitglieder der $G\alpha_{12/13}$-Familie aktivieren RH-RhoGEFs (RH-Domäne besitzende *RhoGTPase Nucleotide Exchange Factor*), welche durch ihre GEF-Funktion wiederrum RhoA aktivieren, was über die Aktivierung verschiedener Proteine und somit weiter Signalkaskaden unter anderem zur Regulation des Zytoskelettes führt (Siehler, 2009; für mehr Informationen siehe 3.2.3).

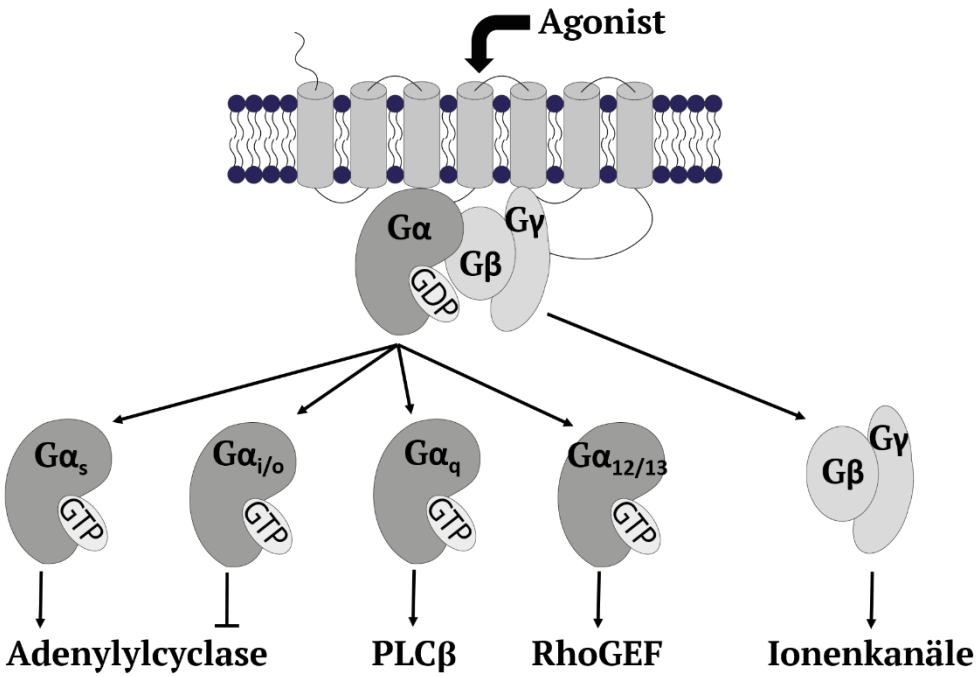

Abbildung 3.7 | Signalwege von G-Proteinen

3.1.6 GPCR Signaltransduktion und Abschaltung

Durch die Bindung eines Agonisten wird eine Konformationsänderung des GPCRs ausgelöst. Diese führt zur Aktivierung des Rezeptors, wodurch sich die Bindestelle für dessen Effektormoleküle, die G-Proteine, bildet (Kobilka, 2011). Das inaktive, GDP-bindende G-Protein-Heterotrimer kann spätestens jetzt an den aktiven Rezeptor binden. Ob und in welchem Ausmaß G-Proteine schon vor der Aktivierung des Rezeptors an diesen binden können (*precoupling*) wird zurzeit noch diskutiert (Nobles et al., 2005). Durch die Bindung an den aktiven Rezeptor erfährt das G-Protein selbst auch eine Konformationsänderung. Diese Konformationsänderung führt zur Freigabe des zuvor gebunden GDP durch die Gα-Untereinheit und zur Bindung eines GTP, was wiederum zur Aktivierung des G-Proteins führt. Die Aktivierung des G-Proteins führt zur Separation vom Rezeptor und (in den meisten Fällen) zur Trennung der Untereinheiten (Vilardaga et al., 2009). Sowohl die Gα-Untereinheit, als auch die Gβγ-Untereinheit kann spezifische Ziele an der Zellmembran adressieren (Milligan und Kostenis, 2006). Da der Rezeptor noch aktiv ist (sofern der Agonist noch gebunden ist)

können darauffolgend weitere G-Proteine aktiviert werden. Somit kommt es zu einer Potenzierung des Signals/ des Effektes. Die Deaktivierung des G-Proteins selbst erfolgt durch die Hydrolyse des an die Gα-Untereinheit gebundenen GTPs. Diese Hydrolyse wird durch die GTPase-Domäne der Gα-Untereinheit katalysiert, G-Proteine deaktivieren sich somit mit der Zeit automatisch selbst. Die Zeit, in der diese Deaktivierung geschieht, ist abhängig von der Art der Untereinheiten und der Beeinflussung durch RGS (*Regulators of G protein signaling*)-Proteine (Johnston und Siderovski, 2007).

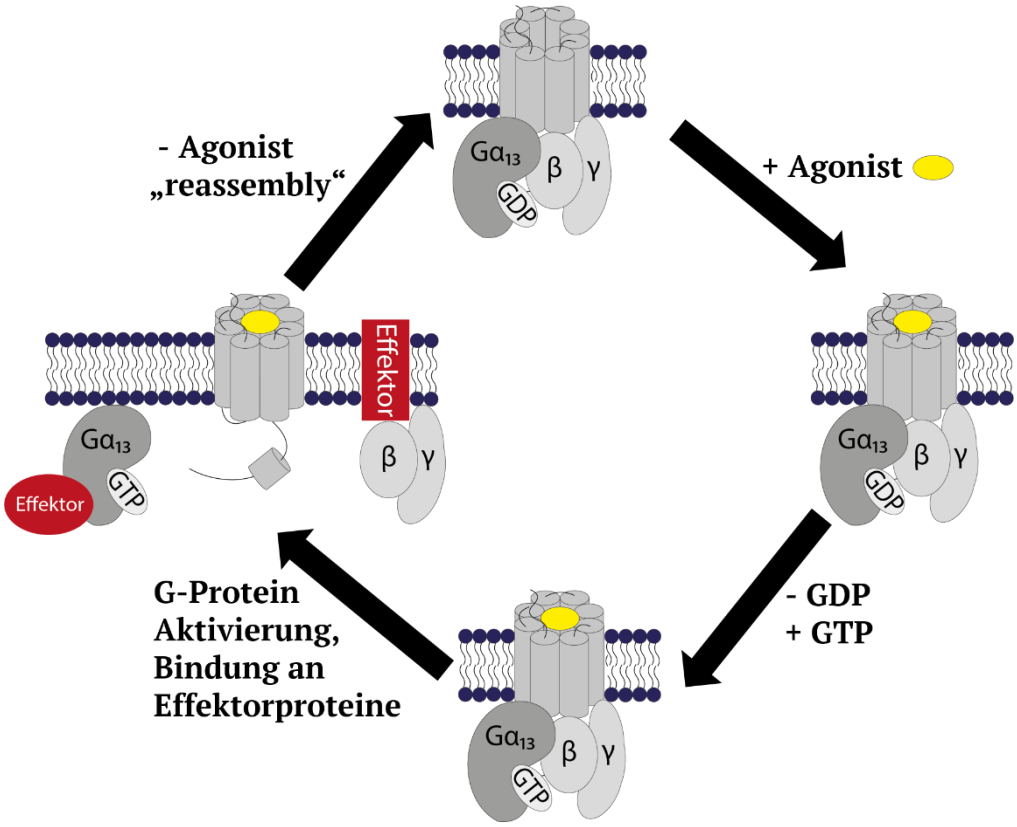

Abbildung 3.8 | Kreislauf der G-Protein-Aktivierung

Während durch die Aktivierung von GPCRs hauptsächlich G-Proteine aktiviert werden, existiert auch ein zweiter Signalweg. Aktive GPCRs können von der intrazellulären Seite durch GRKs (G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen) phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung an Serin und Threonin im C-

Terminus und den ICL (Yang et al., 2017) dient als Markierung für Arrestine. Arrestine binden phosphorylierte Rezeptoren und verhindern somit einerseits die Bindung (und Aktivierung) weiterer G-Proteine durch den Rezeptor, andererseits kann die Bindung zur Internalisierung des Rezeptors führen (Sente et al., 2018). Dieser Schutzmechanismus verhindert durch die Blockade der G-Protein-Bindestelle sowohl die akute Dauerstimulation, durch die Internalisierung und den dadurch möglichen Abbau des Rezeptors auch die chronische Dauerstimulation, wie sie beispielsweise bei der Asthmatherapie durch den Einsatz von LABAs (long acting beta2-agonists = langwirksame beta2-Sympathomimetika) entsteht (Hausdorff et al., 1990).

Die hauptsächliche Signalabschaltung findet, neben der Selbstdeaktivierung der G-Proteine und dem Arrestin-Signalweg, durch den Entzug des Liganden statt. Abhängig von der Art des Rezeptors und des Liganden, hat der Ligand unterschiedlich lange Bindezeiten am Rezeptor. Die Bindezeit eines Liganden an den Rezeptor beeinflusst die Affinität des Liganden zum Rezeptor. Um zu verhindern, dass der Ligand ein weiteres Mal an einen Rezeptor bindet, muss der Ligand abgebaut, oder (beispielsweise durch die Aufnahme in Zellen) vom Wirkort entfernt werden. Ein Beispiel für diesen Abbau wäre die Hydrolyse von Acetylcholin durch die Acetylcholinesterase.

3.1.7 Der Thromboxan-Rezeptor

Der in dieser Arbeit verwendete Thromboxan-Rezeptor (auch TP-Rezeptor) ist einer der fünf Prostanoidrezeptoren. Prostanoidrezeptoren werden durch Prostanoide innerviert, welche im Körper aus der Arachidonsäure durch Cyclooxygenasen synthetisiert werden. Der endogene Ligand des Thromboxan-Rezeptors ist das Thromboxan A_2 (Devillier und Bessard, 1997). Während der Thromboxan-Rezeptor in sehr vielen Organen und Geweben, wie beispielsweise Lunge, Aorta, Herz, GIT, Augen, Niere und Gehirn, exprimiert ist, ist seine bekannteste Funktion die Aktivierung der Thrombozytenaggregation während der primären Hämostase. Der Thromboxan-

Rezeptor kann G-Proteine der G_q und der $G_{12/13}$ (und eventuell auch der G_s) Familien aktivieren (Woodward et al., 2011), jedoch wurde in Studien der $G\alpha_{12/13}$-Rho als hauptsächlicher Signalweg identifiziert (Huang et al., 2004; Nakahata, 2008; Saito et al., 2010). Da der endogene Ligand Thromboxan A_2 instabil ist, wurde in dieser Arbeit das stabile Prostaglandin H_2 (PGH_2)-Analogon U-46619 verwendet (Bundy und Ch, 1975).

3.2 Rho-GEFs

3.2.1 Allgemeines zu RhoGEFs

RhoGEFs stellen das Bindeglied zwischen GPCRs und die durch RhoA (und anderen Vertretern der kleinen GTPasen der Rho-Familie) angestoßenen Signalkaskaden dar. Dabei können eine Vielzahl von RhoGEFs durch $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ (Abbildung 3.10) aktiviert werden (Aittaleb et al., 2009). GEF steht für Guanosin-Nukleotid Austauschfaktor (***g****uanine nucleotide* ***e****xchange* ***f****actor*), was bedeutet, dass aktive RhoGEFs inaktive kleine GTPasen (*small GTPases*) der Rho-Familie dabei unterstützen das von ihnen gebundene GDP freizugeben und GTP zu binden. Diese Bindung von GTP führt bei den kleinen GTPasen der Rho-Familie, namentlich RhoA, Rac1 und Cdc42, wiederum zur Aktivierung, wodurch weitere Signalkaskaden angestoßen werden. Diese sind hauptsächlich für die Regulation des Zytoskelettes, der Bildung von Aktin-Stressfasern und der Kontraktilität von Actomyosin verantwortlich, wodurch zahlreiche zelluläre Funktionen wahrgenommen werden (Ridley, 2015). Das Strukturelement, welches alle RhoGEFs auszeichnet, ist die DH-Domäne (Dbl-Homologie). Dieses Motiv ist in allen RhoGEFs vorhanden und tritt fast immer in Kombination mit einer PH-Domäne (Pleckstrin-Homologie) auf, wodurch die DH/PH-Domäne gebildet wird (Fort und Blangy, 2017). Die 71 im Menschen vorkommenden Dbl-ähnlichen RhoGEFs lassen sich in 20 Unterfamilien einteilen (Abbildung 3.9).

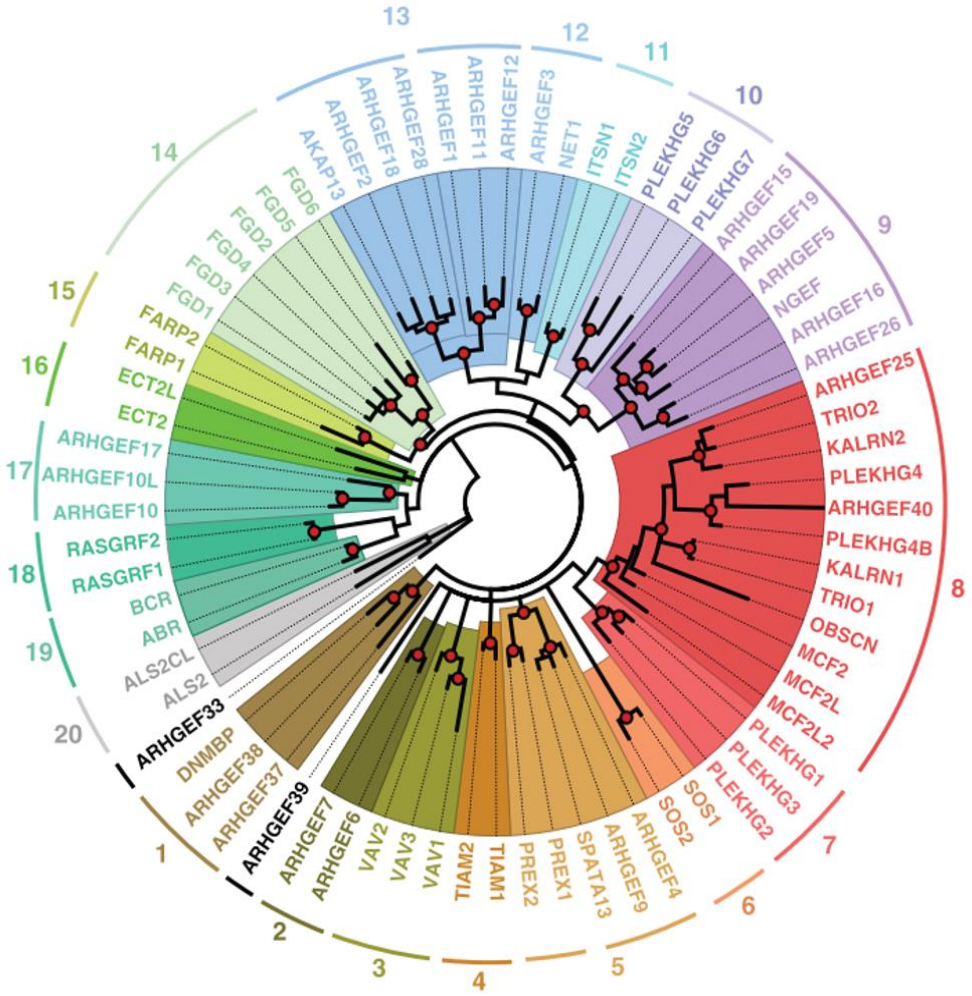

Abbildung 3.9 | Phylogenetisches Kladogramm der Rho-GEFs im Menschen entnommen aus (Fort und Blangy, 2017) ARHGEF1=p115, ARHGEF11=PDZ, ARHGEF12= LARG.

RhoGEFs können unter anderem über GPCRs durch G-Protein Untereinheiten aktiviert werden. Dies geschieht primär durch $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten. Durch $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten lassen sich die sogenannten RH-RhoGEFs (für mehr Informationen siehe 3.2.2) und Lbc (***l**ymphocyte **b**last **c**risis*)-RhoGEF aktivieren. Lbc-RhoGEF wurde ursprünglich als Onkogen identifiziert (Toksoz und Williams, 1994) und ist das einzige durch $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten aktivierte RhoGEF, welches keine RH-Domäne enthält (siehe Abbildung 3.10). Studien belegen, dass Lbc-RhoGEF vorrangig durch $G\alpha_{12}$-

Untereinheiten aktiviert wird (Diviani et al., 2001; Dutt et al., 2004). Während die Bindestelle für $G\alpha_{12}$ nicht vollständig geklärt ist, besitzt Lbc-RhoGEF C-terminal der PH-Domäne ein Motiv mit struktureller Ähnlichkeit zur RH-Domäne (welche die Bindedomäne in den RH-RhoGEFs darstellt) (Dutt et al., 2004).

Während die Aktivierung von RhoA über RhoGEFs, welche durch $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten reguliert werden, eine stärkere Aktivierung zeigten (Vogt et al., 2003), lassen sich auch einige RhoGEFs über $G\alpha_q$-Untereinheiten aktivieren. Ein Beispiel hierfür ist p63RhoGEF, welches in bestimmten Geweben mit der PLCβ um die Aktivierung durch $G\alpha_q$ konkurriert (Lutz et al., 2005). Im Gegensatz zu den RH-RhoGEFs besitzt p63RhoGEF keine RH-Domäne, welche als Bindestelle für G-Proteine dienen könnte. Stattdessen wurde eine Helix C-terminal der PH-Domäne als Bindestelle (auch bei den anderen beiden, von $G\alpha_q$ aktivierten RhoGEF Trio und Kalirin) identifiziert (Lutz et al., 2007). p63RhoGEF ist beispielsweise an der Regulierung von Glattmuskelzellen und an der Vesikelentleerung beteiligt (Williams et al., 2007). Zusätzlich wurde für die beiden RhoGEFs Trio und Kalirin eine Aktivierbarkeit durch $G\alpha_q$-Untereinheiten nachgewiesen (Rojas et al., 2007). Beide spielen unter anderem eine kritische Rolle in der neuronalen Entwicklung.

Die letzte Möglichkeit, durch die Aktivierung von GPCRs Rho-GTPasen zu steuern ist über Gβγ-Untereinheiten. Die Regulation von RhoGEFs durch Gβγ ist bisher wenig untersucht, konnte jedoch für einige Vertreter der RhoGEF nachgewiesen werden. Ein Beispiel hierfür ist die P-Rex-Unterfamilie (P-Rex1, P-Rex2 und P-Rex2b), welche direkt durch Gβγ und indirekt durch PIP_3 und PKA reguliert werden kann (Welch et al., 2002). Weitere Beispiele sind p114-RhoGEF (Niu et al., 2003), Clg (Common-site lymphoma GEF, auch PLEKHG2) ein RhoGEF, welches selektiv für Cdc42 ist (Ueda et al., 2008) und Tim/Arhgef5 (Wang et al., 2009).

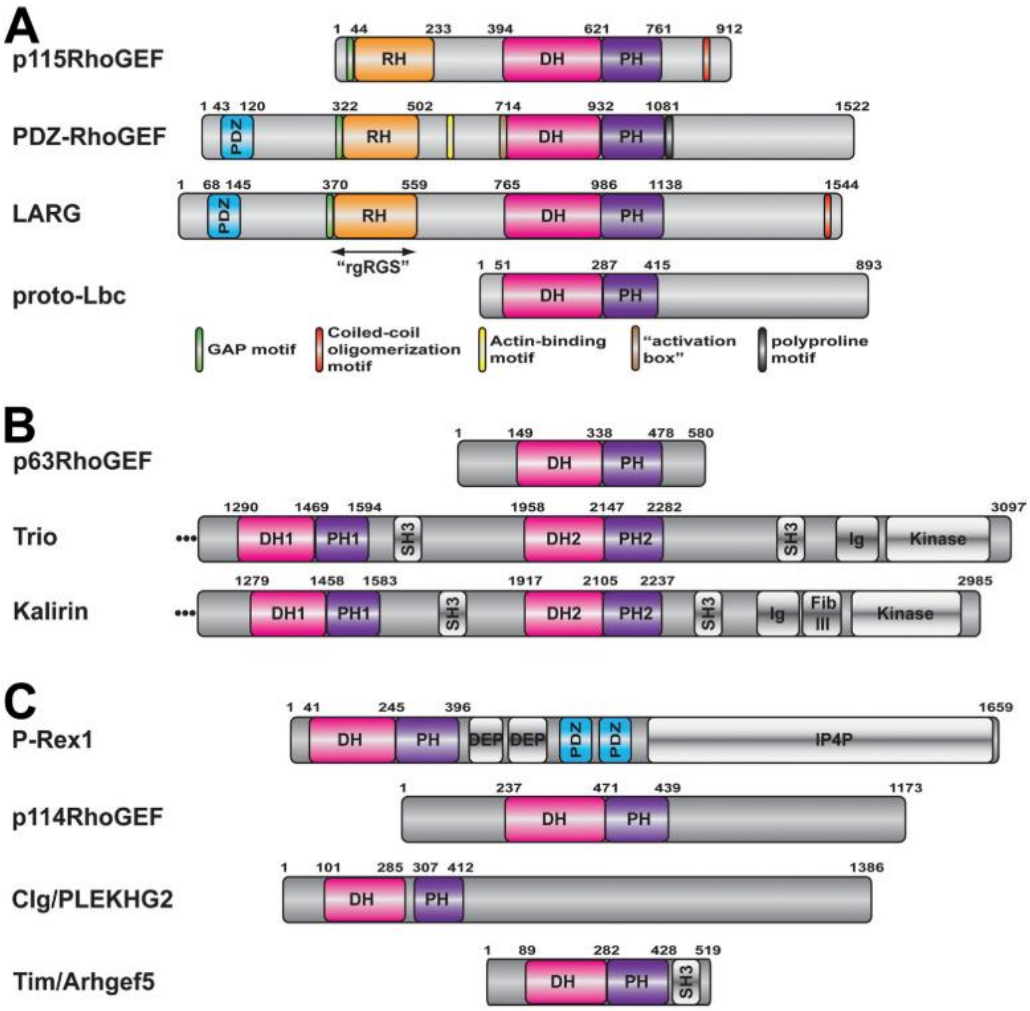

Abbildung 3.10 | Durch G-Proteine regulierte RhoGEFs entnommen aus (Aittaleb et al., 2010) **A** Durch $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten regulierte RhoGEFs **B** Durch $G\alpha_q$-Untereinheiten regulierte RhoGEFs **C** Durch Gβγ-Untereinheiten regulierte RhoGEFs.

Zusätzlich wurde kürzlich gezeigt, dass PDZ-RhoGEF, welches normalerweise durch $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten aktiviert wird, auch durch konstitutiv aktive $G\alpha_s$-Untereinheiten aktiviert werden kann, wobei in diesem Fall ein spezieller Effektor (Cdc42) durch PDZ-RhoGEF aktiviert wurde (Castillo-Kauil et al., 2020). Dieses Beispiel zeigt, dass die Zusammenhänge in der Signalkaskade GPCR → G-Protein → RhoGEF → Effektor noch nicht vollständig aufgeklärt sind und weiterführende Untersuchungen benötigt werden.

3.2.2 RH-RhoGEFs und deren Struktur

Bei drei der vier RhoGEFs die durch $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten aktiviert werden können, stellt die RH-Domäne (RH= RGS [*regulators of G protein signalling*] *homology*) die Bindedomäne für $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten dar. Die drei Vertreter p115-RhoGEF (auch ARHGEF1), LARG (***l****eukemia-****a****ssociated* ***R****ho****GEF***; auch ARHGEF12) und PDZ-RhoGEF (***p****ostsynaptic density 95,* ***d****isk large,* ***z****ona occludens-1*; auch ARHGEF11) werden somit als RH-RhoGEFs bezeichnet. Neben der namensgebenden RH-Domäne besitzen die drei RH-RhoGEFs auch eine DH-Domäne, welche in allen RhoGEFs vorhanden ist und zusammen mit der PH-Domäne als DH/PH-Domäne die Bindedomäne für Effektorproteine (in diesem Fall kleine GTPasen der Rho-Familie) bildet. Während die *Dbl-homology* (DH)-Domäne essentiell für die Bindung an den Effektor ist (Rossman et al., 2005), wird die *pleckstrin-homolgy* (PH)-Domäne für die vollständige Aktivierung von RhoA und zur zusätzlichen Bindung an andere Signalproteine benötigt (Fukuharaa et al., 2001). Zusätzlich besitzen LARG und PDZ-RhoGEF eine PDZ-Domäne, welche neben $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten auch anderen Rezeptoren die Aktivierung dieser RhoGEFs ermöglicht. Beispielsweise dem IGF-1-Rezeptor (***i****nsulin-like* ***g****rowth* ***f****actor 1*) und den LPA (Lysophosphatidsäure)-Rezeptoren (Taya et al., 2001; Yamada et al., 2005), wobei bei diesen gezeigt wurde, dass sie, obwohl die LPA-Rezeptoren GPCRs sind, direkt an RhoGEFs binden und nicht immer über G-Proteine wirken. Darüber hinaus sind LARG und PDZ-RhoGEF mit über 1500 Aminosäuren deutlich größer als p115-RhoGEF mit einer Länge von 912 Aminosäuren. Somit sind LARG und PDZ-RhoGEF näher miteinander verwandt als mit p115-RhoGEF (siehe Kladogramm in Abbildung 3.9).

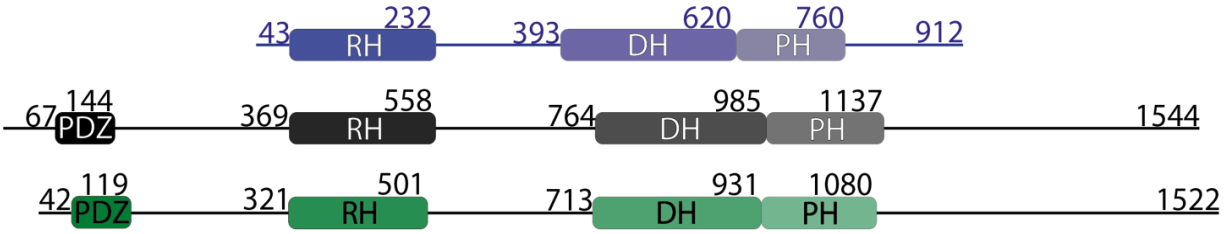

Abbildung 3.11 | Aufbau der RH-RhoGEFs blau= p115, schwarz= LARG, grün= PDZ-RhoGEF.

RhoGEFs können sowohl Homo- als auch Hetero-Oligomere (nur LARG und PDZ-RhoGEF) bilden, was die Signalweiterleitung negativ beeinflussen kann (Chikumi et al., 2004).

3.2.3 $G\alpha_{12/13}$ – RH-RhoGEF – Rho-GTPase Signalkaskade

Wie bereits beschrieben verbinden RH-RhoGEFs die GPCR-Signalwirkung mit den durch die kleinen GTPasen der Rho-Familie angestoßenen Signalkaskaden. Damit ein GPCR diesen Signalweg adressieren kann, muss dieser an $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten koppeln können. Beispiele für GPCRs, die an $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten koppeln, sind neben vielen anderen, der TPα-Rezeptor (Thromboxanrezeptor), der Agiotensin II Typ I-Rezeptor, der Endotehlin-1 Rezeptor, der Bradykininrezeptor B2 und der $5HT_{2C}$-Rezeptor (vollständige Liste: https://gproteindb.org/signprot/statistics_tree) wobei diese GPCRs häufig auch über $G\alpha_q$ koppeln. Auch über $G\alpha_q$ kann die Signalkaskade der Rho-GTPasen aktiviert werden, was durch die gleichzeitige Kopplung an $G\alpha_{13}$ und $G\alpha_q$ einen synergistischen Effekt bezüglich der Aktivierung der Rho-GTPasen bewirken könnte. Es ist nachgewiesen, dass die $G\alpha_{13}$-Aktivierung beispielsweise auch die $G\alpha_q$-vermittelte Vasokonstriktion verstärkt (Gohla et al., 2000).

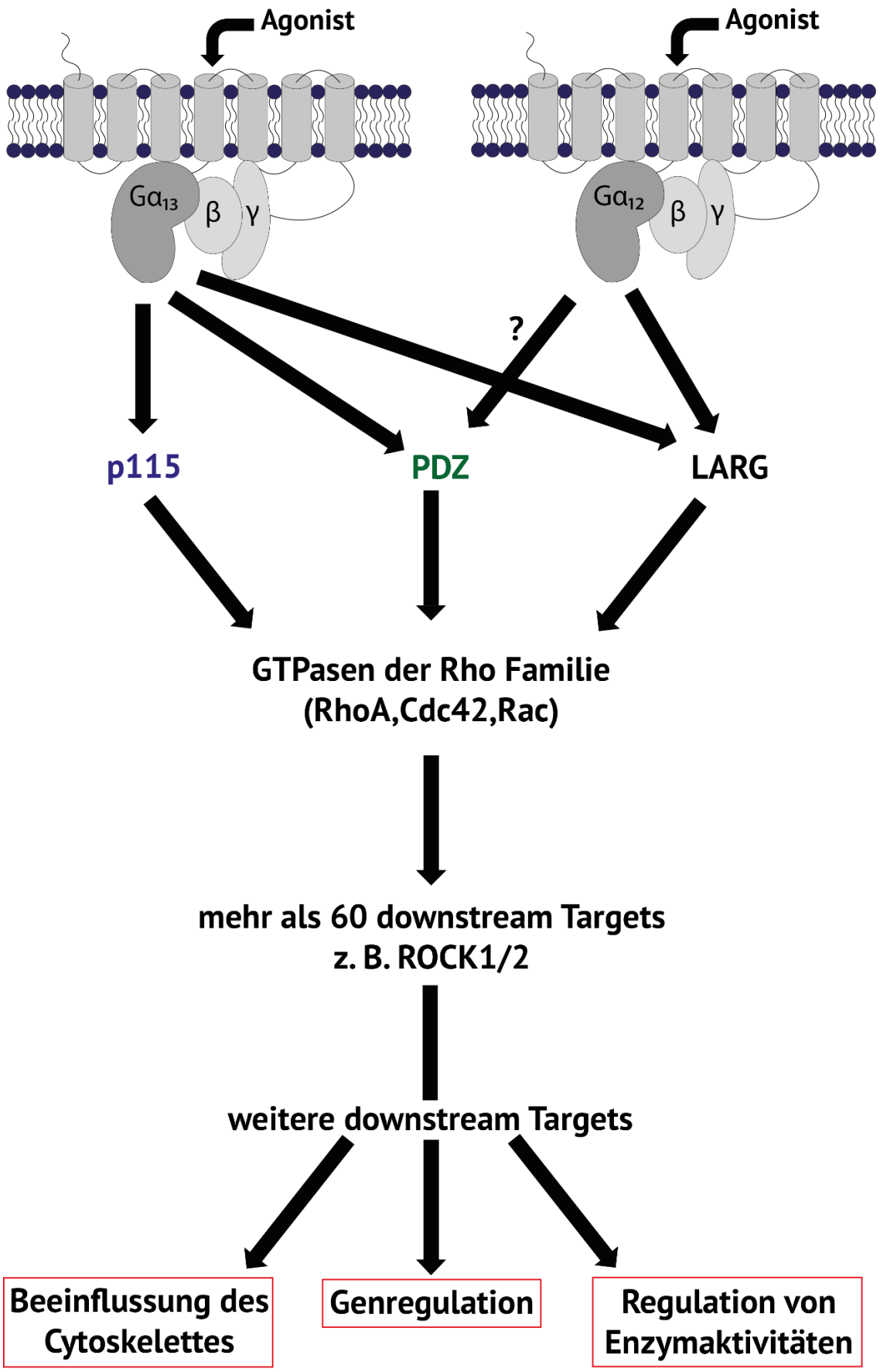

Abbildung 3.12 | Der RhoGEF-Signalweg

$G\alpha_{12/13}$ → RH-RhoGEFs

Aktivierte $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten können folglich ihre direkten Effektoren aktivieren: die RH-RhoGEFs p115-RhoGEF, LARG und PDZ-RhoGEF (und Lbc-RhoGEF). RH-RhoGEFs befinden sich im inaktiven Zustand im Cytosol und werden durch die Bindung an aktive $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten an die Zellmembran rekrutiert, da aktive G-Proteine weiterhin durch einen Membrananker an diese gebunden sind (Meyer et al., 2008). Diese Re-Lokalisation (Standortwechsel) kann auch in fluoreszenzmikroskopischen Versuchen nachgewiesen werden und ist somit ein Indikator für die Funktionalität der verwendeten RH-RhoGEFs (oder von diesen abgeleiteten Konstrukten), beziehungsweise des Assays. Während p115-RhoGEF im inaktiven Zustand ganz überwiegend zytosolisch vorliegt, ist das bei PDZ-RhoGEF und LARG nicht immer der Fall (Goulmari et al., 2008). Dies lässt sich durch die Bindung an zelluläre Strukturen über die PDZ-Domäne erklären. $G\alpha_{13}$ kann alle drei RH-RhoGEFs aktivieren, während für $G\alpha_{12}$ lediglich die Aktivierung von LARG gezeigt wurde (Suzuki et al., 2003), was auf unterschiedliche physiologische Rollen der Untereinheiten hindeutet. Ob PDZ-RhoGEF durch $G\alpha_{12}$ aktiviert werden kann ist noch nicht abschließend geklärt (Suzuki et al., 2003; Siehler, 2009).

Im Gegensatz zu den $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten ist die Expression der RH-RhoGEFs im Körper nicht ubiquitär, sodass sich auch hier die physiologischen Rollen stark unterscheiden können. p115-RhoGEF ist stark in Hämozyten exprimiert, in anderen Zellen nur auf geringerem Level. Auch PDZ-RhoGEF wird in den meisten Zellen nur in geringerem Maße exprimiert, während im ZNS hohe Proteinkonzentrationen nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu wird LARG im Körper ubiquitär exprimiert (Siehler, 2009). Dieser Umstand und die Tatsache, dass LARG als einziges RhoGEF über $G\alpha_{12}$ aktiviert werden kann, macht es sehr wahrscheinlich, dass LARG im Körper eine universelle Aufgabe erfüllt, die die anderen RhoGEFs in diesem Maße nicht haben. Durch die gewebsspezifische Expression von p115-RhoGEF und PDZ-RhoGEF, ist es wahrscheinlich, dass diese beiden Vertreter speziellere Aufgaben im

Körper erfüllen. Es wurde beispielsweise bereits gezeigt, dass p115-RhoGEF in einer Signalkaskade den entgegengesetzten Effekt zu LARG hat (Lane et al., 2021).

Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Aktivität der RH-RhoGEFs über die Phosphorylierung durch bestimmte Kinasen erhöht werden kann (Holinstat et al., 2003).

RH-RhoGEFs → GTPasen der Rho-Familie

Aktive RhoGEFs aktivieren kleine GTPasen der Rho-Familie durch die Stabilisation der aktiven Konformation. Wie auch bei G-Proteinen wird zur Aktivierung GDP freigegeben und GTP gebunden, weshalb kleine GTPasen auch kleine G-Proteine (*small G proteins*) genannt werden (Wheeler und Ridley, 2004). Die kleinen GTPasen der Rho-Familie bestehen aus den Unterfamilien RhoA (RhoA-RhoC), Rac (Rac1-Rac3 und RhoG) und Cdc42 (Cdc42, RhoJ und RhoQ) (Heasman und Ridley, 2008). Es ist nicht abschließend geklärt, welche dieser Unterfamilien durch welche RH-RhoGEFs aktiviert werden können. Es gibt insgesamt 82 RhoGEFs welche die Aktivität von RhoGTPasen positiv beeinflussen, wovon 71 „*Dbl-like*“ (Fort und Blangy, 2017) und 11 „*DOCK-like*“ (Meller et al., 2005) sind. Somit ist der über GPCRs-$G\alpha_{12/13}$-RH-RhoGEF bei weitem nicht der einzige Weg, diesen Signalweg zu adressieren.

RhoA kann durch RhoGDIs (***G**DP-**d**issociation **i**nhibitor*) inhibiert werden (Dovas und Couchman, 2005) und durch RhoGAP (***G**TPase **a**ctivating **p**rotein*) deaktiviert werden (Amin et al., 2016).

RhoA-Effektoren

Für das vollständige Verständnis des Signalweges kommt erschwerend hinzu, dass mehr als 60 *downstream* (nachgelagerte) Effektoren für RhoGTPasen bekannt sind (Entienne-Manneville und Hall, 2002). Einer der am weitreichendsten untersuchten Signalwege ist dabei die über RhoA zu ROCK1/2zB vermittelte Signalkaskade. RhoA

kann von allen drei RH-RhoGEFs aktiviert werden (Rossman et al., 2005). Die Bindung durch RhoGEFs führt auch hier zu einer Rekrutierung zur Plasmamembran (Michaelson et al., 2001) und die durch die Konformationsänderung ermöglichte Bindung von GTP führt zur Aktivierung von RhoA (Bhattacharya et al., 2004). Durch aktives RhoA kann anschließend ROCK1/2 zur Zellmembran rekrutiert werden. Dadurch verliert die ubiquitär exprimierte Kinase ihre autoinhibitorische Funktion und kann wiederum mehr als 15 verschiedene Substrate in der Zelle phosphorylieren. Dazu zählen beispielsweise die PTK2 (*protein tyrosine kinase 2*), JNK (c-Jun-N-terminale Kinasen), MLCP (Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase), LIMK (LIM-Kinase) und mDia (Diaphanous) (Narumiya et al., 1997; Sah et al., 2000; Jaffe und Hall, 2005).

Endpunkte der Signalkaskade

Durch die zahlreichen Interaktionspartner besitzt diese Signalkaskade eine hohe Komplexität, was dazu führt, dass noch längst nicht alle Zusammenhänge aufgeklärt und verstanden wurden. Jedoch konnten einige Endpunkte dieser Kaskade klar beschrieben werden. Durch die Hemmung der MLCP kommt es zur stärkeren Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins (MLC - *myosin light chain*) und somit zu einem erhöhten Muskeltonus (Jaffe und Hall, 2005).

F-Aktin wird durch die Blockade des Depolimerisationsfaktors Cofilin stabilisiert (Marinissen und Gutkind, 2005). Über mDia kommt es zusätzlich zur erhöhten Polymerisation von F-Aktin und zur Stabilisierung von Mikrotubuli (Ghanem et al., 2021). Durch die gesteigerte Polymerisationsrate von F-Aktin kommt es zu einer Abnahme von G-Aktin, wodurch das an G-Aktin gebundene *myocardin related transcription factor A* (MRTFA) freigesetzt wird. MRTFA ist schließlich in der Lage, aus dem Cytosol in den Zellkern zu translozieren, wo es als Co-Aktivator des *Serum-Response*-Faktors (SRF) fungiert (Miralles et al., 2003; Posern und Treisman, 2006; Reed et al., 2021). Dadurch kommt es über die RhoA-Aktivierung zur Aktivierung des SRF, welches durch die Bindung an das *Serum-Response*-Element (SRE) eine

Genregulation bewirkt. Als primärer Effekt ist eine Aktivierung von IEGs (*Immediate early genes*) beschrieben, was zu einer unmittelbaren Expression bestimmter Proteine, welche für die physiologischen Funktionen dieses Signalweges essentiell sind und zu einer schnellen zellulären Antwort führt. Zusätzlich werden Proteine des Zytoskelettes wie β–Aktin und Vinculin verstärkt exprimiert (Marinissen und Gutkind, 2005; Posern und Treisman, 2006). Dabei kommt es bei einem Signalweg über LARG oder PDZ-RhoGEF zu einer höheren SRF-Aktivität als über p115-RhoGEF (Suzuki et al., 2003). Weitere Transkriptionsfaktoren, welche durch den RhoA-Signalweg aktiviert werden, sind AP-1, MRFT-A, YAP und NFκB, welche alle eine Vielzahl an zellulären Effekten auslösen (Yu und Brown, 2015).

Auch die Regulation von Enzymaktivitäten kann durch diesen Signalweg beeinflusst werden, beispielsweise der Lipidstoffwechsel und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Jaffe und Hall, 2005).

3.2.4 RH-RhoGEFs als RGS-Proteine

Wie in 3.2.3 beschrieben, sind $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten in der Lage, RH-RhoGEFs zu binden und zu aktivieren. Diese Bindung unterliegt jedoch auch einer negativen Rückkopplung. Gα-Untereinheiten besitzen eine intrinsische GTPase-Funktion, was bedeutet, dass sie sich mit der Zeit selbst deaktivieren, indem sie das gebundene GTP zu GDP hydrolysieren (Johnston und Siderovski, 2007). Dieser Vorgang kann durch die Bindung an RH-RhoGEFs unterstützt werden, wodurch es zu einer schnelleren Deaktivierung des Signals kommt. Diese Eigenschaft nennt man GAP-Aktivität (**G**TPase **a**ktivierendes **P**rotein) und Proteine, die diese Eigenschaft ausüben, nennt man RGS-Proteine (***R**egulators of **G** Protein **S**ignaling* - Regulatoren der G-Protein Signalgebung). Somit sind die RH-RhoGEFs neben GEFs für GTPasen der Rho-Familie auch RGS-Proteine für $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten und nehmen damit eine ambivalente Rolle ein, indem sie die Signalkaskade in „beide Richtungen“ beeinflussen. Für die GAP-Aktivität der RH-RhoGEFs wurde gezeigt, dass die Aminosäuresequenz N-

terminal der RH-Domäne, welche zusammen mit dieser die „rgRGS“-Domäne bildet, von entscheidender Bedeutung ist (Chen et al., 2003). Das Vorhandensein der rgRGS-Domäne wurde in allen drei RH-RhoGEFs nachgewiesen, *in vitro* GAP-Aktivität konnte jedoch nur in p115-RhoGEF und LARG gezeigt werden (Suzuki et al., 2009). Für PDZ-RhoGEF konnte keine intrinsische *in vitro* GAP-Aktivität nachgewiesen werden, jedoch konnte diese durch das Einfügen einer Bindedomäne für $G\alpha_{13}$ von p115 auf PDZ-RhoGEF übertragen werden (Chen et al., 2008).

3.2.5 Physiologie und Pathophysiologie

An folgenden physiologischen oder pathophysiologischen Vorgängen im Körper ist der $G\alpha_{12/13}$ – RH-RhoGEF – Rho-GTPase Signalweg beteiligt.

Zellentwicklung

Der Signalweg über $G\alpha_{12/13}$ hat sich als unerlässlich für die Entwicklung bestimmter Zellen und Organe herausgestellt. Mäuse ohne $G\alpha_{13}$ (*knockout*-Mäuse) starben durchschnittlich im Alter von 9.5 Tagen als Embryo, Mäuse ohne $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ noch früher. Als Ursache hierfür wurde eine fehlerhafte Angiogenese (Neubildung von Blutgefäßen) identifiziert, wobei es hauptsächlich zur fehlerhaften Regulation der Endothelzellen kam (Offermanns et al., 1997; Zahra et al., 2019). Dabei hat sich $G\alpha_{13}$ als erforderlich für die Zellmigration von Endothelzellen und auch Fibroblasten herausgestellt (Shan et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass LARG und PDZ essentiell für die embryonale Entwicklung sind (Mikelis et al., 2013), unter anderem auch durch den regulierenden Einfluss auf den Zellzyklus (Hall, 1998).

Im zentralen Nervensystem kommt es durch gestörte Zellmigration zu Entwicklungsstörungen in Abwesenheit von $G\alpha_{12/13}$ (Moers et al., 2008). Darüber hinaus wurde für LARG eine regulatorische Rolle bei der Erythropoese beschrieben (Xie et al., 2019).

Immunsystem

Der Signalweg über $G\alpha_{12/13}$ nimmt wichtige Aufgaben im Immunsystem über die Regulierung des Cytoskeletts wahr, beispielsweise die gerichtete Migration von Immunzellen und deren Adhäsion (Xu et al., 2003; Rieken et al., 2006; Chang et al., 2021). Auch wird eine Rolle in der Entwicklung von Lymphozyten diskutiert (Jiang et al., 1998). Der $G\alpha_{12/13}$-Signalweg übernimmt außerdem wichtige Aufgaben in der Zellmigration und der Apoptose (Xu et al., 2021; Guo et al., 2022), so ist beispielsweise die Differenzierung und Funktion von Helfer-T-Zellen vom $G\alpha_{13}$-Signalweg abhängig (Kuen et al., 2021). Bei Mutationen von RhoA oder RhoGEFs wurden immunologische Defekte beschrieben (Hashim und Ahmad Mokhtar, 2021).

Gefäßsystem und Herz

Durch die Beeinflussung der MLC hilft der Signalweg über $G\alpha_{12/13}$ bei der Aufrechterhaltung des Vasotonus. Dies geschieht über die Aktivierung von GPCRs, die sowohl an $G\alpha_q$ als auch $G\alpha_{12/13}$ koppeln, wobei jedoch gezeigt wurde, dass $G\alpha_{12/13}$ nicht zwingend notwendig ist, um den Blutdruck im Normalbereich aufrecht zu erhalten (Somlyo und Somlyo, 2003). Im Kontrast dazu basiert die myogenische (von den Muskelzellen selbst ausgehende) Aufrechterhaltung des Vasotonus auf $G\alpha_{12/13}$ und LARG (Chennupati et al., 2019). Ein Einfluss bei der Entstehung von Hypertonie wurde gezeigt. So wurde beispielsweise speziell für LARG gezeigt, dass es eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Salz-induzierter Hypertonie spielt (Wirth et al., 2008). Eine Überexpression sowohl von LARG (Chiu et al., 2020) als auch p115-RhoGEF führt zu Bluthochdruck (Porchia et al., 2008). Des Weiteren sind RhoGEFs an der Schädigung der Niere bei Bluthochdruck beteiligt (Johnson et al., 2020).

Zusätzlich untermauern Studien einen Zusammenhang der $G\alpha_{12/13}$-Signalkaskade mit der Entwicklung der koronaren Herzkrankheit (Ohmori et al., 2003) und Herzinfarkten

(Brown et al., 2006). Einige Untersuchungen deuten ebenfalls auf einen Einfluss von RhoGEFs und RhoA auf die Entstehung von Atherosklerose hin (Li et al., 2022).

Aktivierung von Blutplättchen

Die Aktivierung von Blutplättchen ist wichtig für Hämostase und somit für die Entstehung von Thromben in pathophysiologischen Zusammenhängen. Dieser Vorgang wird neben $G\alpha_q$ auch über $G\alpha_{12/13}$ (Offermanns, 2006; Williams et al., 2015) und somit auch über RhoGEFs und RhoA vermittelt (Comer, 2022). Dabei hat sich gezeigt, dass in Abwesenheit von $G\alpha_{13}$ die durch Aktivierung ausgelöste Veränderung der Plättchenform, die Aggregation und Sekretion deutlich reduziert waren (Moers et al., 2003).

Tumorerkrankungen

GTPasen der Rho-Familie sind schon seit längerem als Onkogene bekannt. Durch ihre Rolle in der Entwicklung, dem Wachstum, der Differenzierung von Zellen und den Einfluss auf den Zellzyklus ist es nicht verwunderlich, dass hier eine Fehlregulation zu Krebserkrankung führen kann. Während im Tiermodell gezeigt wurde, dass eine Überexpression von $G\alpha_{12/13}$ tumorigen ist, wurde auch in menschlichen Tumoren eine Überexpression von $G\alpha_{12/13}$ beobachtet (Worzfeld et al., 2008). Zusätzlich wurden aktivierende Mutationen in $G\alpha_{12/13}$ entdeckt, welche tumorigene Signalwege fördern (Maziarz et al., 2020). Bei folgenden Krebserkrankungen wurde eine Fehlregulation des $G\alpha_{12/13}$-RhoGEF-RhoA Signalweges nachgewiesen (beispielhafte nicht vollständige Liste): Leukämie (Kourlas et al., 2000), Mammakarzinom (Kelly et al., 2006), Magenkarzinom (Zhang et al., 2016), Pankreaskarzinom (Mu et al., 2018), Glioblastom (Ding et al., 2018, 2020), Leberkarzinom (Du et al., 2020), Schilddrüsenkrebs (Feng et al., 2021), Lungenkrebs (Zeng et al., 2021), Lymphome (O'Hayre et al., 2016; Schafernak et al., 2021).

Andere

Posttranslationale Modifikationen an $G\alpha_{12/13}$ und der $G\alpha_{12/13}$-Signalweg generell sind wichtig für die Physiologie und Pathophysiologie der Energie-Homöostase, des Immunsystems, des Kardiovaskuläre Systems und des Glucosestoffwechsels im Körper. Expressionslevel von $G\alpha_{12/13}$ unterscheiden sich in Stoffwechelorganen wie Leber und Muskeln und bei metabolischen Krankheiten (Yang et al., 2020), so trägt eine Überexpression $G\alpha_{12}$ zur Entstehung von Leberfibrosen bei (Kim et al., 2018). Eine über GPCRs vermittelte RhoA Aktivierung ist an T-Zell-vermittelten Entzündungsprozessen beteiligt (Yu und Brown, 2015; Guo, 2021). Für PDZ-RhoGEF wurde ein Einfluss auf die Anfälligkeit für Übergewicht und Diabetes Typ-2 gezeigt (Chang et al., 2015). RhoA/ROCK-Fehlregulation führte in Studien zu Arthrose (Deng et al., 2019).

3.3 Zielsetzung

GPCRs stellen die größte Rezeptorgruppe im Menschen dar und bestimmen oder beeinflussen dabei eine undenkbare Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse im Körper. Daher ist die Forschung an GPCRs und den von ihnen angestoßenen Signalkaskaden unabdingbar, um die Funktionsweise des Körpers in seiner Gänze zu verstehen. Obwohl GPCRs ihre Signale nur über vier Familien von Gα-Untereinheiten ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$) weitergeben, ist die Familie der $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten und deren Signalweg der mit Abstand am wenigsten untersuchte. Das Ziel dieser Arbeit war es, einen bisher wenig untersuchten Signalweg näher zu beleuchten: die Interaktion zwischen $G\alpha_{13}$ und den RH-RhoGEFs und damit dem Bindeglied zwischen GPCRs und den durch die kleinen GTPasen der Rho-Familie angestoßenen Signalkaskaden (siehe 3.2.3).

Das erste Projekt dieser Arbeit war dabei, die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der drei RH-RhoGEFs in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$ zu untersuchen. In vorherigen Arbeiten der AG Bünemann wurde bereits gezeigt, dass die Interaktion zwischen $G\alpha_{13}$ und LARG deutlich langanhaltender war als mit p115. Parallel zur langanhaltende Interaktion wurde unter Gleichgewichtsbedingungen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Agonisten beschrieben (Bodmann et al., 2017 und unveröffentlichte Daten). Die Interaktionen von $G\alpha_{13}$ mit p115, LARG und zusätzlich auch PDZ-RhoGEF sollten nun im Rahmen dieser Arbeiten, mit besonderem Augenmerk auf den strukturellen Aufbau der einzelnen RhoGEFs, näher untersucht werden. Dafür war das Ziel, Unterschiede in den Interaktionskinetiken der einzelnen Interaktionspartner mit strukturellen Ursachen zu begründen. Hierfür wurde die hohe räumliche und zeitliche Auflösung FRET-basierter Assays genutzt, welche zusätzlich auch Informationen über die Agonistsensitivität der einzelnen Vertreter geben sollten. Um strukturelle Ursachen zu ermitteln, wurden selbst entwickelte Konstrukte kloniert, wobei sowohl Mutanten (Proteine mit Punktmutationen) als auch Chimären (ein aus verschiedenen Proteinen zusammengesetztes Protein) von RhoGEFs verwendet wurden. Somit stand am

Anfang des Projekts eine Vielzahl von Methoden und Wegen zur Verfügung um die initiale Problemstellung zu untersuchen.

Ein weiteres Projekt sollte die Untersuchung der Interaktion der Gβγ-Untereinheit mit den RH-RhoGEFs sein. Auch hierfür gab es bereits Hinweise durch Arbeiten aus der AG Bünemann, dass hier eine Signaländerung im FRET-basierten Assay zu beobachten sei (unveröffentlichte Daten). Aus diesem Grund sollten auch in diesem Projekt die Interaktion und die eventuell daraus entstehende Interaktionskinetik näher untersucht werden, indem sowohl mit einer markierten Gβ-Untereinheit, als auch mit einer markierten Gγ-Untereinheit und den verschiedenen RH-RhoGEFs gearbeitet wurde. Bei den entstandenen Signaländerungen sollte ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um ein Zufallssignal handelt (*bystander*-FRET) und es sollte die Ursache für die Entstehung der Signaländerung ermittelt werden.

Kapitel 4: Material

4.1 Verbrauchsmaterialien

96-well Platte cellGrade white	Brand, Wertheim
Deckgläschen (25 mm)	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen (6 ml)	Neolab, Heidelberg
Eppendorf-Gefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	VWR, Darmstadt
Petrischale (10 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (2 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000 µl)	Gilson, Limburg-Offenheim
Whatman FP Sterilfilter	VWR, Darmstadt
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm, 6-well-Platten)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Tabelle 4.1 | Verbrauchsmaterial aus Glas und Kunststoff.

4.2 Chemikalien

1 kb DNA-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt am Main
100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Acetylcholin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar	Applichem, Darmstadt
Agarose (LE)	Biochrom, Berlin
Ampicillin	Applichem, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA), delipidiert	Sigma Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim

Coelenterazin h	AG Schlitzer, Marburg
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Promega, Mannheim
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Immersionsöl (Immersol 518F)	Zeiss, Jena
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium nach Lennox	Applichem, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
NEB® 5-alpha Competent E. Coli	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Polyethylenimine (PEI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main
U-46619	Biomol, Hamburg

Tabelle 4.2 | Reagenzien

DMEM (High Glucose, 4,5 g/L)	Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund
FCS (fetales Kälberserum)	Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund
L-Glutamin (200 mM)	Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund
PBS	Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund
Penicillin/Streptomycin 100x	Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund
Poly-(L)-Lysin-Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA (0,05%)	Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund

Tabelle 4.3 | Reagenzien für die Zellkultur

4.3 Geräte

Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Attofluor Cell Chamber	Invitrogen, Darmstadt
Autoklav (VX-95)	Systec GmbH, Linden
Digitalwaage	Kern u. Sohn, Baligen-Frommern
Eismaschine Ice Flaker F100 Compact Incubator	Icematic, Düsseldorf
Eismaschine DBA Manitowoc Ice	Manitowoc, USA
Feinwaage 770 (precision balance)	Kern u. Sohn, Baligen-Frommern
Gefrierschrank (-20°C) Liebherr GP 2716	Liebherr, Biberach an der Riß
Gefrierschrank (-80 °C) FORMA 900 Series	Thermo Scientific, Dreieich
Hitzesterilisator	Thermo Scientific, Dreieich
Inkubator APT.line C150	Binder, Tuttlingen
Inkubator CB-S 170	Binder, Tuttlingen
Labcycler Gradient (PCR-Maschine)	SensoQuest, Göttingen
Leica TC-SP5 Konfokalmikroskop	Leica, Wetzlar
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach
Mehrkanalpipette 200 µl PIPETMAN	Gilson, Limburg-Offenheim
Mikrowelle	Sharp
NanoPhotometer NanoDrop	Implen, München
Pipetten Gilson Pipetman 2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Limburg-Offenheim
Reinstwasseranalage Ultra Clear UV plus	SG, Sundern
Schüttler für Bakterien	GFL, Burgwedel
Sterilwerkbank Esco ac2-4e8-tu sentinel gold	Esco Technologies, Inc., Hatboro, USA
Sterilwerkbank LabGard ES NU 437-400E Klasse II	NuAire, Plymouth, USA
Spark 20M Multimode Microplate Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex – Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge (Heraeus Fresco 17)	Thermo Scientific, Dreieich
Zentrifuge (Heraeus Megafuge 16R)	Thermo Scientific, Dreieich

Tabelle 4.4 | Geräte

Absorptionsfilter ET430/24x	Chroma, Bellows Falls, USA
CCD-Kamera Evolve 512	Photometrics, Tucson, USA
Druckluftgefederter Tisch	Newport Corp., Stahnsdorf
Dualbandstrahlenteiler mit CFP/YFP-Emissionsfilter 59017bs+ 59017m	Chroma, Bellows Falls, USA
Emissionsfilter ET 480/40	Chroma, Bellows Falls, USA
Emissionsfilter HC 534/20	Semrock, Rochester, NY, USA
LED-Lichtquelle: pE-2	CoolLED, Andover,UK
Mikromanipulator MMJ	Märzhäuser, Wetzlar
Mikroskop Eclipse Ti	Nikon, Japan
Objektiv: Plan Apo VC 100X/1,40 Öl; ∞ /0,17 Dic N2	Nikon, Japan
Optosplit II	Cairn Research, Faversham, UK
Perfusionssystem ALA VC3-8xP	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, NY, USA
Strahlenteiler T455LP	Chroma, Bellows Falls, USA
Strahlenteiler im Optosplit z488/800-1064rpc	Chroma, Bellows Falls, USA

Tabelle 4.5 | Geräte Mikroskop Nikon-Setup

4.4 Software und Datenbanken

A plasmid Editor- ApE	M. Wayne Davis (University of Utah, Salt Lake City, USA)
Adobe Illustrator CC 2019	Adobe Inc., San José, USA
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), blast.ncbi.nlm.nih.gov	National Library of Medicine, Bethesda, USA
FPbase, fpbase.org	Open-source, Harvard Medical School, USA
GPCRdb, gpcrdb.com	David Gloriam group, University of Copenhagen, Denmark
GraphPad Prism 8	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Guide to PHARMACOLOGY guidetopharmacology.org	University of Edinburgh, Scotland
Mendeley Desktop	Mendeley, London, UK
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NIS Elements 4.6	Nikon, Japan

Origin Pro 2018	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Protein Data Bank (PDB), rcsb.org	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)
Pubmed, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov	National Library of Medicine, Bethesda, USA
SnapGene Viewer	GSL Biotech LLC, Chicago, USA

Tabelle 4.6 | Software und Datenbanken

4.5 Kits

Name	Hersteller	Funktion
Dual-Luziferase Assay-System	Promega, Walldorf	SRF Reporter Assay
Effectene® Transfection Kit	Qiagen, Hilden	Transfektion
Gibson Assembly® Cloning Kit	New England Biolabs, USA	Klonierung: Gibson Assembly
Monarch® DNA Gel Extraction Kit	New England Biolabs, USA	Gel-Extraktion
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Kit	New England Biolabs, USA	Klonierung: Gibson Assembly
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs, USA	Klonierung
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden	Midi-Präparation
Qiagen Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden	Gel-Extraktion

Tabelle 4.7 | Kits

4.6 Plasmide

Die folgenden Plasmide verwendeten den Expressionsvektor pcDNA3. Ausnahmen sind die IRES-Konstrukte (haben IRES im Namen) und Gγ2-mTurq2, welche den Clonetech N1 Vektor besitzen. Alle verwendeten Vektoren besitzen Selektionsmarker für eukaryotische und prokaryotische Zellen und Promotoren zur Expressionssteigerung. Alle verwendeten Fluorophore sind Derivate von CFP oder YFP und stammen somit vom Fluorophor GFP (*green fluorescent protein*) ab, welches aus dem Organismus *Aequorea victoria* isoliert wurde.

Plasmid	Spezies	Referenz
Chimera1-YFP p115 AS 1-43+ LARG AS 360-561	Mensch	Diese Arbeit
Chimera2-YFP p115 AS1-43+ LARG AS 370-561	Mensch	Diese Arbeit
Chimera3-YFP p115s RH-Domäne (AS 44-232) ersetzt LARGs RH-Domain in fl-LARG	Mensch	Diese Arbeit
Chimera4-YFP LARGs RH-Domäne (AS 1110-1677) ersetzt p115s RH-Domain in fl-p115	Mensch	Diese Arbeit
Chimera5-YFP LARG-fl mit AS 20-43 p115 statt AS 346-369	Mensch	Diese Arbeit
Chimera6-eYFP LARG-fl mit AS 2-43 p115 statt AS 328-369	Mensch	Diese Arbeit
Chimera7-YFP p115s N-Terminus (AS 1-43) statt LARGs N-Terminus (AS 1-369) an fl-LARG	Mensch	Diese Arbeit

Chimera8-YFP p115 (AS 1-232) mit LARGs C-Terminus (AS 559-1544)	Mensch	Diese Arbeit
Chimera9-YFP Chimera5 ohne C-Terminus (AS 559-1544)	Mensch	Diese Arbeit
Gα12-CFP	Maus	Diese Arbeit
Gα13-mTurq2 127 (Fluorophor nach AS 127)	Maus	(Bodmann et al., 2017)
Gα13-mTurq2 135 (Fluorophor nach AS 135)	Maus	Diese Arbeit
Gα13-mTurq2 135 R128A	Maus	Diese Arbeit
Gα13-NLuc 127	Maus	Diese Arbeit
Gα13-NLuc 135	Maus	Diese Arbeit
Gα13-WT	Maus	(Krett, 2015)
Gα13-WT R128A	Maus	Diese Arbeit
Gαi-CFP	Ratte	(Hein and Bünemann, 2009)
Gαo-WT	Ratte	(Jelinek et al., 2021)
Gαq-WT	Maus	(Hughes et al., 2001)
Gβ1-WT	Mensch	(Bünemann et al., 2003)
Gβ1-mTurq2	Mensch	(Ruland et al., 2020)
Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gαi2-mTurq2	Ratte/Mensch/Maus	(van Unen et al., 2016) Addgene Plasmid #69624 (Watertown, USA)
Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gα13-WT	Ratte/Mensch/Maus	Diese Arbeit
Gβ1-2a-mTurq2-Gγ2-IRES-Gα13-WT	Ratte/Mensch/Maus	Diese Arbeit
Gβ1-2a-Gγ2-IRES-Gα13-WT	Ratte/Mensch/Maus	Diese Arbeit
Gγ2-WT	Rind	(Bünemann et al., 2003)
Gγ2-mTurq2	Rind	(Jelinek et al., 2021)
Gγ2-YFP	Rind	Diese Arbeit
GRK2-mTurq2	Mensch	(Wolters et al., 2015)
GRK2-WT	Mensch	(Winstel et al., 1996)
GRK2 K220R	Mensch	(Fu et al., 2013)
(YFP-)LARG	Mensch	(Bodmann et al., 2017)
(YFP nach AS 299)LARG	Mensch	Diese Arbeit

(YFP-)LARG-PR LARG ohne C-Terminus- bis AS 561	Mensch	(Krett, 2015)
(YFP-)LARG-PR2 LARG ohne C-Terminus- bis AS 558	Mensch	Diese Arbeit
(YFP-)LARG-R	Mensch	(Krett, 2015)
(YFP-)LARG-RH-Domäne + Linker	Mensch	Diese Arbeit
(YFP-)LARG-Rshort	Mensch	Diese Arbeit
(YFP-)LARG G359E	Mensch	Diese Arbeit
(YFP-)LARG G359E ohne C-Terminus (AS 559-1544)	Mensch	Diese Arbeit
(YFP-)p115	Mensch	(Kurz et al., 2020)
(YFP-)p115-CAAX	Mensch	diese Arbeit
(YFP-)p115-R	Mensch	(Krett, 2015)
(YFP-)p115-RH-Domäne + Linker	Mensch	Diese Arbeit
(YFP-)p115-Rs	Mensch	Diese Arbeit
(YFP-)p115 E32G	Mensch	Diese Arbeit
pcDNA3	-	-
(YFP-)PDZ-RhoGEF	Mensch	(Krett, 2015)
pSRE.L	Photinus pyralis	(Krett, 2015)
pRL-TK	Renilla reniformis	(Krett, 2015)
TPα-R (TXA2-R)	Mensch	(Bodmann et al., 2017)

Tabelle 4.8 | Plasmide

4.7 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden als PCR-Primer für Klonierungen (für die verschiedenen Strategien zur Klonierung siehe 5.3) verwendet. Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe von selbst erstellten Zielplasmidkarten designt und von Eurofins Genomics nach Auftrag synthetisiert.

#	Sequenz	Vector	Fragment	Zielplasmid
1(1)	GCT TCT AGA GGG CCG CGA (18)	Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gαi2-mTurq2	Gα13-mTurq2 127	Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gα13-WT
2(1)	ATT ATC ATC GTG TTT TTC AAA GGA AAA CCA CG (32)	Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gαi2-mTurq2	Gα13-mTurq2 127	Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gα13-WT
3(1)	CCT TTG AAA AAC ACG ATG ATA ATA TGG CGG ACT TCC TGC C (40)	Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gαi2-mTurq2	Gα13-mTurq2 127	Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gα13-WT
4(1)	AGT CGC GGC CCT CTA GAA GCT CAC TGC AGC ATG AGC TG (38)	Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gαi2-mTurq2	Gα13-mTurq2 127	Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gα13-WT
5(2)	CTG TAC AAG TCC GGA CTC AGA TCT ATG GCC AG (32)	Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gα13-WT	Gα13-mTurq2 75	Gβ1-2a-mTurq2-Gγ2-IRES-Gα13-WT
6(2)	TGC TCA CCA TAC CGG TAG GGC CGG (24)	Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gα13-WT	Gα13-mTurq2 75	Gβ1-2a-mTurq2-Gγ2-IRES-Gα13-WT
7(2)	CCT ACC GGT ATG GTG AGC AAG GGC GAG (27)	Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gα13-WT	Gα13-mTurq2 75	Gβ1-2a-mTurq2-Gγ2-IRES-Gα13-WT

8(2)	CTG AGT CCG GAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG (32)	Gβ1-2a-cpVen-Gγ2-IRES-Gα13-WT	Gα13-mTurq2 75	Gβ1-2a-mTurq2-Gγ2-IRES-Gα13-WT
9(3)	CGA GCT GTA CGC TGC ATC TCG GCC CAG TAG TGA CAA TG (38)	LARG-WT	(YFP-) p115-R	(YFP nach AS 299)LARG
10(3)	GCT CAC CAT TGC AGC AGC ATC TCC ACT GCT ACA GTC AG (38)	LARG-WT	(YFP-) p115-R	(YFP nach AS 299)LARG
11(3)	AGC AGT GGA GAT GCT GCT GCA ATG GTG AGC AAG GGC GAG (39)	LARG-WT	(YFP-) p115-R	(YFP nach AS 299)LARG
12(3)	TAC TGG GCC GAG ATG CAG CGT ACA GCT CGT CCA TGC CGA (39)	LARG-WT	(YFP-) p115-R	(YFP nach AS 299)LARG
13(4)	CCC TAC CGG TTC CGG ACT CAG ATC TAT GGC CA (32)	Gβ1-2a-mTurq2-Gγ2-IRES-Gα13-WT	- (Deletion)	Gβ1-2a-Gγ2-IRES-Gα13-WT
14(4)	TCT GAG TCC GGA ACC GGT AGG GCC GG (26)	Gβ1-2a-mTurq2-Gγ2-IRES-Gα13-WT	- (Deletion)	Gβ1-2a-Gγ2-IRES-Gα13-WT
15(5)	TGG GAG TAA AAG TGA AAG AGT GAC TCG AGC ATG CAT CTA GAG G (43)	(YFP-) p115-R	(YFP-) LARG-Rshort	Chimera1-YFP p115 AS 1-43+ LARG AS 360-561
16(5)	TGT TCA TGT TCA GTG TTT TGC TCT TCT GAG TTT GTC TCC AG (41)	(YFP-) p115-R	(YFP-) LARG-Rshort	Chimera1-YFP p115 AS 1-43+ LARG AS 360-561
17(5)	GAAGAG CAA AAC ACT GAA CAT GAA CAG ATC AAT GGA CAG T (40)	(YFP-) p115-R	(YFP-) LARG-Rshort	Chimera1-YFP p115 AS 1-43+ LARG AS 360-561
18(5)	CTC TTT CAC TTT TAC TCC CAA ATG CTT CA (29)	(YFP-) p115-R	(YFP-) LARG-Rshort	Chimera1-YFP p115 AS 1-43+ LARG AS 360-561

19(6)	ACA AAC TCA GAA GAG CAA CAA AAC AGC TGT TTC CAG AGC ATT GAA TTA CTA AAA T (52)	(YFP-) p115-R	(YFP-) LARG-Rshort	Chimera2-YFP p115 AS1-43+ LARG AS 370-561
20(6)	GTT TGG CTC TTC TGA GTT TGT CTC CAG (27)	(YFP-) p115-R	(YFP-) LARG-Rshort	Chimera2-YFP p115 AS1-43+ LARG AS 370-561
21(7)	GGT GCG GGT GAA AGA GCC TCG AAA TTT GGA GCA (33)	(YFP-) LARG-Rshort	(YFP-) p115-R	Chimera3-YFP p115s RH-Domäne (AS 44-232) ersetzt LARGs RH-Domain in fl-LARG
22(7)	TGG AAC TGG CTG CAC TGT CCA TTG ATC TGT T (31)	(YFP-) LARG-Rshort	(YFP-) p115-R	Chimera3-YFP p115s RH-Domäne (AS 44-232) ersetzt LARGs RH-Domain in fl-LARG
23(7)	ATG GAC AGT GCA GCC AGT TCC AGA GCC TG (29)	(YFP-) LARG-Rshort	(YFP-) p115-R	Chimera3-YFP p115s RH-Domäne (AS 44-232) ersetzt LARGs RH-Domain in fl-LARG
24(7)	GAG GCT CTT TCA CCC GCA CCC CAA GGT GG (29)	(YFP-) LARG-Rshort	(YFP-) p115-R	Chimera3-YFP p115s RH-Domäne (AS 44-232) ersetzt LARGs RH-Domain in fl-LARG
25(8)	GGG AGT AAA AAC CAA GAG TGG AGA CAA GAA GTC G (34)	(YFP-) p115	(YFP-) LARG	Chimera4-YFP LARGs RH-Domäne (AS 1110-1677) ersetzt p115s RH-Domain in fl-p115

26(8)	GGA AAC AGC TGT TTT GCT CTT CTG AGT TTG TCT C (34)	(YFP-) p115	(YFP-) LARG	Chimera4-YFP LARGs RH-Domäne (AS 1110-1677) ersetzt p115s RH-Domain in fl-p115
27(8)	AGA GCA AAA CAG CTG TTT CCA GAG CAT TGA ATT ACT AAA AT (41)	(YFP-) p115	(YFP-) LARG	Chimera4-YFP LARGs RH-Domäne (AS 1110-1677) ersetzt p115s RH-Domain in fl-p115
28(8)	CAC TCT TGG TTT TTA CTC CCA AAT GCT TCA TAT ACA TGA GAA TAA CA (47)	(YFP-) p115	(YFP-) LARG	Chimera4-YFP LARGs RH-Domäne (AS 1110-1677) ersetzt p115s RH-Domain in fl-p115
29(9)	GGG AGT AAA ATG ACT CGA GCA TGC ATC TAG AGG G (34)	(YFP-) LARG	(YFP-) LARG	(YFP-)LARG-RH-Domäne + Linker
30(9)	CGC CTC CGC CGG AAC CGC CTC CGC CCT TGT ACA GCT CGT CCA TG (44)	(YFP-) LARG	(YFP-) LARG	(YFP-)LARG-RH-Domäne + Linker
31(9)	AGG CGG TTC CGG CGG AGG CGG TTC CAG CTG TTT CCA GAG CAT TGA ATT ACT AAA AT (56)	(YFP-) LARG	(YFP-) LARG	(YFP-)LARG-RH-Domäne + Linker
32(9)	CAT GCT CGA GTC ATT TTA CTC CCA AAT GCT TCA TAT ACA TGA GAA TAA CA (50)	(YFP-) LARG	(YFP-) LARG	(YFP-)LARG-RH-Domäne + Linker
33(10)	TGG GGT GCG GTG ACT CGA GCA TGC ATC TAG AGG (33)	(YFP-) p115-R	(YFP-) p115-R	(YFP-)p115-RH-Domäne + Linker

34(10)	CGC CTC CGC CGG AAC CGC CTC CGC CCT TGT ACA GCT CGT CCA TGC C (46)	(YFP-) p115-R	(YFP-) p115-R	(YFP-)p115-RH-Domäne + Linker
35(10)	AGG CGG TTC CGG CGG AGG CGG TTC CAG CCA GTT CCA GAG CCT G (43)	(YFP-) p115-R	(YFP-) p115-R	(YFP-)p115-RH-Domäne + Linker
36(10)	GCT CGA GTC ACC GCA CCC CAA GGT GG (26)	(YFP-) p115-R	(YFP-) p115-R	(YFP-)p115-RH-Domäne + Linker
37(11)	AGA GCA AAA CAG CTG TTT CCA GAG CAT TGA ATT ACT AAA A (40)	(YFP-) LARG	(YFP-) p115	Chimera5-YFP LARG-fl mit AS 20-43 p115 statt AS 346-369
38(11)	TGA TGC TGA CTG CTA TAC GGG TTG AGG GAC TCC (33)	(YFP-) LARG	(YFP-) p115	Chimera5-YFP LARG-fl mit AS 20-43 p115 statt AS 346-369
39(11)	CCG TAT AGC AGT CAG CAT CAT CGG GGC TGA (30)	(YFP-) LARG	(YFP-) p115	Chimera5-YFP LARG-fl mit AS 20-43 p115 statt AS 346-369
40(11)	CTG GAA ACA GCT GTT TTG CTC TTC TGA GTT TGT CTC (36)	(YFP-) LARG	(YFP-) p115	Chimera5-YFP LARG-fl mit AS 20-43 p115 statt AS 346-369
41(12)	GGA TGA GGA TTT TGG GAA CGA GCT GGA GAC (30)	(YFP-) p115	- (Mutagenese)	(YFP-) p115 E32G
42(13)	GAA GAT GAT GAT TTT GAA ACT GAA CAT GAA CAG (33)	(YFP-) LARG	- (Mutagenese)	(YFP-) LARG G359E
43(14)	GCC GCC CCT CGG GCG AAG TCT TCA CTT TTC TCT GGG TTT TCC TCT AGA TAA ATT (54)	(YFP-) LARG	(YFP-) p115	Chimera6-eYFP LARG-fl mit AS 2-43 p115 statt AS 328-369
44(14)	GAA GAC TTC GCC CGA GGG (18)	(YFP-) LARG	(YFP-) p115	Chimera6-eYFP LARG-fl mit AS 2-43 p115 statt AS 328-369

45(15)	GCC CCT CGG GCG AAG TCT TCC ATG GAT CCC TTG TAC AGC TCG (42)	(YFP-) LARG	(YFP-) p115	Chimera7-YFP p115s N-Terminus (AS 1-43) statt LARGs N-Terminus (AS 1-369) an fl-LARG
46(15)	ATG GAA GAC TTC GCC CGA G (19)	(YFP-) LARG	(YFP-) p115	Chimera7-YFP p115s N-Terminus (AS 1-43) statt LARGs N-Terminus (AS 1-369) an fl-LARG
47(16)	TGG GGT GCG GGT GAA AGA GCC TCG AAA TTT GGA GC (35)	(YFP-) LARG	(YFP-) p115	Chimera8-YFP p115 (AS 1-232) mit LARGs C-Terminus (AS 559-1544)
48(16)	GCT CTT TCA CCC GCA CCC CAA GGT GG (26)	(YFP-) LARG	(YFP-) p115	Chimera8-YFP p115 (AS 1-232) mit LARGs C-Terminus (AS 559-1544)
49(17)	GG AGT AAA ATG ACT CGA GCA TGC ATC TAG AGG (33)	(YFP-) p115	(YFP-) LARG	(YFP-)LARG-PR2 LARG ohne C-Terminus- bis AS 558
50(17)	ACT GTG TGC CAC TCA TGG ATC CCT TGT ACA GCT CGT CCA TGC C (43)	(YFP-) p115	(YFP-) LARG	(YFP-)LARG-PR2 LARG ohne C-Terminus- bis AS 558
51(17)	ATG AGT GGC ACA CAG TCT ACT ATC AC (26)	(YFP-) p115	(YFP-) LARG	(YFP-)LARG-PR2 LARG ohne C-Terminus- bis AS 558
52(17)	GCT CGA GTC ATT TTA CTC CCA AAT GCT TCA TAT ACA TGA GAA TAA CA (47)	(YFP-) p115	(YFP-) LARG	(YFP-)LARG-PR2 LARG ohne C-Terminus- bis AS 558

53(18)	TGG GAG TAA AAT GAC TCG AGC ATG CAT CTA GAG G (34)	(YFP-) LARG G359E	(YFP-) p115-R	(YFP-) LARG G359E ohne C-Terminus (AS 559-1544) + Chimera9
54(18)	GAC TGT GTG CCA CTC ATA CCG GTC TTG TAC AGC TCG (36)	(YFP-) LARG G359E	(YFP-) p115-R	(YFP-) LARG G359E ohne C-Terminus (AS 559-1544) + Chimera9
55(18)	ACC GGT ATG AGT GGC ACA CAG TCT ACT ATC AC (32)	(YFP-) LARG G359E	(YFP-) p115-R	(YFP-) LARG G359E ohne C-Terminus (AS 559-1544) + Chimera9
56(18)	GCT CGA GTC ATT TTA CTC CCA AAT GCT TCA TAT ACA TGA GAA TAA C (46)	(YFP-) LARG G359E	(YFP-) p115-R	(YFP-) LARG G359E ohne C-Terminus (AS 559-1544) + Chimera9
57(19)	GTT GAT GGC ATT TGA TAC CGC CGC CCC CAT G (31)	Gα13-WT	- (Mutagenese)	Gα13-WT R128A
58(20)	ACG AGC TGT ACA AGG CTA GCA TGG TGG AGA CTC GAG TGT TCC (42)	Gα13-WT	Gα13-mTurq2 127 (Fluorophor nach AS 127)	Gα13-mTurq2 135 (Fluorophor nach AS 135)
59(20)	CCC TTG CTC ACC ATG CTA GCC CCC TGG GCA GCC ATG (36)	Gα13-WT	Gα13-mTurq2 127 (Fluorophor nach AS 127)	Gα13-mTurq2 135 (Fluorophor nach AS 135)
60(20)	GCT AGC ATG GTG AGC AAG GG (20)	Gα13-WT	Gα13-mTurq2 127 (Fluorophor nach AS 127)	Gα13-mTurq2 135 (Fluorophor nach AS 135)
61(20)	GCT AGC CTT GTA CAG CTC GTC (21)	Gα13-WT	Gα13-mTurq2 127 (Fluorophor nach AS 127)	Gα13-mTurq2 135 (Fluorophor nach AS 135)
62(21)	GAT GGC ATT TGA TAC CGC CGC CCC CAT GGC TGC (33)	Gα13-mTurq2 135	- Mutagenese	Gα13-mTurq2 135 R128A

63(22)	CAT GAG CTG CAA GTG TGT GCT CTC CTA GGC GGC CGC TCG AGC ATG C (46)	(YFP-) p115	- Mutagenese	(YFP-)p115-CAAX
64(22)	CAG CCC GGG CCA CTC TCA TCA GGA GGG TTA GTG CAG CCA GGC TGG GG (47)	(YFP-) p115	- Mutagenese	(YFP-)p115-CAAX
65(23/24)	ATG GTC TTC ACA CTC GAA GAT TTC GT (26)	Gα13-mTurq2 127/135	Gγ-NLuc	Gα13-NLuc 127+135
66(23/24)	CGC CAG AAT GCG TTC GCA (18)	Gα13-mTurq2 127/135	Gγ-NLuc	Gα13-NLuc 127+135
67(23)	TGC GAA CGC ATT CTG GCG GCT AGC CGC GCC C (31)	Gα13-mTurq2 127	Gγ-NLuc	Gα13-NLuc 127 (Fluorophor nach AS 127)
68(23)	TCT TCG AGT GTG AAG ACC ATG CTA GCG GTA TCA AAT GC (38)	Gα13-mTurq2 127	Gγ-NLuc	Gα13-NLuc 127 (Fluorophor nach AS 127)
69(24)	TGC GAA CGC ATT CTG GCG GCT AGC ATG GTG GAG ACT CG (38)	Gα13-mTurq2 135	Gγ-NLuc	Gα13-NLuc 135 (Fluorophor nach AS 135)
70(24)	TCT TCG AGT GTG AAG ACC ATG CTA GCC CCC TGG (33)	Gα13-mTurq2 135	Gγ-NLuc	Gα13-NLuc 135 (Fluorophor nach AS 135)

Tabelle 4.9 | Oligonukleotide

4.8 Verwendete Zelllinien

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurden DH5α *E. coli* verwendet.

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen (beispielsweise Messungen) fanden mit HEK293T-Zellen statt, welche regelmäßig auf Infektionen mit Mykoplasmen getestet wurden. Diese Zellen stammen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Lohse (Universität Würzburg).

4.9 Puffer/ Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden im Labor auf Vorrat hergestellt und entsprechend verwendet.

4.9.1 Zellkultur

450 ml **Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)**	Nährmedium mit 4,5 g/l Glucose
50 ml **Fetal Calf Serum (FCS)**	Fetales Kälberserum
5,5 ml **L-Glutamin**	200 mM
5,5 ml **100 U/ml Penicillin + 0,1 mg/ml Streptomycin**	Penicillin/Streptomycin 100x

Tabelle 4.10 | DMEM-Medium Lagerung bei 4°C.

4.9.2 Mikroskopie

Zum Waschen von Zellen und als Grundlage für den BSA-haltigen Puffer für FRET-Messungen (siehe 5.5.4) wurde Puffer für FRET-Messungen auf Vorrat hergestellt. Dieser Puffer enthielt Salze in physiologischen Konzentrationen und wurde zusätzlich auf einen physiologischen pH von 7,3 eingestellt und sterilfiltriert.

Reagenz	Volumen	Konzentration	Endkonzentration
NaCl	27,4 ml	5 M	127 mM
KCl	5,4 ml	1 M	5,4 mM
$CaCl_2$	2 ml	1 M	2 mM
$MgCl_2$	1 ml	1 M	1 mM
HEPES	2,38 g	-	10 mM
H_20	auf 1000 ml	-	-

Tabelle 4.11 | Puffer für FRET-Messungen

Der verwendete Agonist U-46619 wurde regelmäßig in einer Menge von einem Milligramm erworben. Das ursprüngliche Lösungsmittel wurde verdampft und U-46619 wurde in 1,141 ml Ethanol gelöst, wodurch eine Konzentration von 2,5 mM entstand. Die gesamte Menge wurde dann zu je 20 µl in Eppendorfgefäßen aliquotiert und eingefroren. Für weitere Verdünnungsschritte der Aliquots direkt vor der Messung siehe 5.5.4.

4.9.3 Weitere Lösungen und Puffer

Die folgenden Puffer und Lösungen wurden bei den diversen molekularbiologischen Methoden (siehe Kapitel 5: Methoden) im Labor verwendet.

Ampicillin-Stammlösung 1000x

Ampicillin wurde in Wasser gelöst, sodass eine Konzentration von 100 mg/ml erhalten wurde. Die Stammlösung wurde anschließend in Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren. In Selektionsmedien und Agar wurde die Stammlösung 1:1000 verdünnt, wodurch eine Endkonzentration von 100 µg/ml erhalten wurde.

Ampicillin	2 g
H_2O	ad 20 ml

Tabelle 4.12 | Ampicillin-Stammlösung

Kanamycin-Stammlösung 1000x

Kanamycin wurde in Wasser gelöst, sodass eine Konzentration von 50 mg/ml erhalten wurde. Die Stammlösung wurde anschließend in Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren. In Selektionsmedien und Agar wurde die Stammlösung 1:1000 verdünnt, wodurch eine Endkonzentration 50 µg/ml erhalten wurde.

Kanamycin	500 mg
H_2O	ad 10 ml

Tabelle 4.13 | Kanamycin-Stammlösung

KCM-Puffer 5x

KCM-Puffer wurde für die Transformation in chemisch kompetenten E. coli verwendet (siehe 5.2.8). KCM-Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

Reagenz	Menge	Endkonzentration
$CaCl_2$	1,66 g	150 mM
KCl	3,73 g	500 mM
$MgCl_2$	2,38 g	250 mM
H_2O	ad 100 ml	-

Tabelle 4.14 | KCM-Puffer

LB-Medium

Flüssiges LB-Nährmedium für Bakterien wurde hergestellt, indem 100 g LB-Medium nach Lennox (bestehend aus 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt und 0,5 % NaCl) in 5 l Einstwasser gelöst wurde. Die Lösung wurde in 500 ml Flaschen aliquotiert und autoklaviert.

LB-Medium nach Lennox	100 g
H_2O	ad 5 l

Tabelle 4.15 | LB-Medium

LB-Agar/LB-Platten

Zur Herstellung von LB-Agar, welcher für das Ausplattieren von Bakterien verwendet wurde, wurden 250 ml LB-Medium, 3,75 g Agar (Endkonzentration 1,5 %) und ein Rührfisch hinzugefügt und autoklaviert. Durch Erhitzen und Rühren konnte der LB-Agar verflüssigt werden, um LB-Platten zu gießen.

Agar	3,75 g
LB-Medium	250 ml

Tabelle 4.16 | LB-Agar

TAE-Puffer 50x

TAE-Puffer wurde für die Herstellung von Agarose-Gelen und zum Befüllen von Laufkammern bei der Gelelektrophorese verwendet. Die Stammlösung wurde vor Verwendung 1:50 verdünnt.

0,5 M EDTA (pH 8)	100 ml
Eisessig	57,1 ml
Tris-Base	242 g
H_2O	ad 1 l

Tabelle 4.17 | TAE-Puffer

Kapitel 5: Methoden

5.1 Zellkultur

Alle unter Kapitel 5.1 aufgeführten Methoden wurden unter Nutzung einer Sterilwerkbank mit Laminar-Air-Flow-System durchgeführt. Dadurch wurden aseptische Arbeitsbedingungen geschaffen, um Infektionen durch Mikroorganismen (bspw. Bakterien und Pilze) zu erschweren.

5.1.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Alle fluoreszenzmikroskopischen Experimente dieser Arbeit wurden mit Hilfe von HEK293T-Zellen durchgeführt. Diese wurden in Inkubatoren mit einer Temperatur von 37 °C und einer wasserdampfgesättigten, fünfprozentigen CO_2 Atmosphäre kultiviert. Inkubiert wurden die Zellen in DMEM-Nährmedium (*Dulbeccos´s Modified Eagle´s Medium*, 4,5 g/l Glucose), welches mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/l Streptomycin supplementiert wurde.

Da HEK293T-Zellen adhärent wachsen (d.h. am Boden haftend), mussten diese regelmäßig gesplittet/passagiert werden, um ein Vollwachsen der 10 cm-Zellkulturschalen und somit das Absterben der Zellen zu verhindern. Hierzu wurden die Zellen montags und freitags mit Hilfe von 2 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) von der Zellkulturschale abgelöst. Nach wenigen Minuten Inkubationszeit wurden 9 ml frischen DMEM-Mediums hinzugegeben, durch dessen Kationen die Enzymaktivität von Trypsin gestoppt wird. Im Folgenden wurden die Zellen durch das frische Medium komplett von der Zellkulturschale abgelöst, aufgenommen und in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt. Dieses wurde zwei Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das entstehende Zellpellet mit 5 ml Medium resuspendiert und der Wachstumszeit entsprechend in neue 10 cm-Zellkulturschalen

mit 10ml frischem Medium ausgesät. Beispiel: montags-freitags: vier Tage Wachstum: 200 µl (1:25) ausgesät, freitags bis montags: drei Tage Wachstum: 400 µl (1:12,5) ausgesät.

Um die HEK293T-Zellen zu transfizieren, mussten diese vorher in 6 cm-Zellkulturschalen gesplittet werden. Dies geschah analog zum oben beschriebenen Splitten auf 10 cm-Schalen, wobei das geringere Volumen der 6 cm-Schalen bedacht werden muss. Die Zellen wurden so gesplittet, dass am Tag der Transfektion eine Konfluenz (Zelldichte) von 60-80 % bestand.

5.1.2 Transiente Transfektion mit Effectene®

Für einen Großteil der durchgeführten Transfektionen an HEK293T-Zellen wurde das Effectene® Transfection Reagent Kit von QIAGEN verwendet. Die Plasmide wurden den Transfektionsprotokollen (siehe 5.1.5) entsprechend in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Anschließend wurden 150 µl EC-Puffer und 8 µl Enhancer pro µg DNA hinzugegeben, durch Pipettieren und Anschnipsen gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden 10 µl Effectene pro µg DNA hinzugegeben und erneut 10 Minuten inkubiert. Das Gemisch wurde mit etwas Medium aus der 6 cm-Zellkulturschale aufgenommen und gleichmäßig auf die Zellen gegeben. Die Plasmide konnten nun in die HEK293T-Zellen aufgenommen werden, bevor die Transfektion ungefähr 24 Stunden später durch das Splitten auf beschichtete Deckgläschen und somit durch das Wechseln des Mediums gestoppt wurde.

5.1.3 Transiente Transfektion mit Metafectene® PRO

Aufgrund von Beschaffungsschwierigkeiten des Effectene® Transfection Reagent Kit von QIAGEN, wurde bei einigen Transfektionen das Metafectene® PRO Kit verwendet. Hierbei benötigt man zwei Eppendorfgefäße pro Transfektion, wobei in eines der beiden die gewünschten Plasmide pipettiert werden. Anschließend werden in beide

Eppendorfgefäße 300 µl PBS-Puffer gegeben. In das Eppendorfgefäß, welches keine Plasmide enthält, wurden 4 µl Metafectene PRO pro µg zu transfizierender DNA gegeben. Die Inhalte beider Eppendorfgefäße wurden nun gemischt und nach einer Inkubationszeit von 15 min auf die Zellen gegeben. Die Transfektion wurde wie in 5.1.2 beschrieben gestoppt. Assays, in welchen Zellen genutzt wurden, die mit dem Effectene® Transfection Reagent Kit transfiziert wurden, wurden mit dem Metafectene® PRO Kit wiederholt, um die Vergleichbarkeit der Expression und der Ergebnisse zu gewährleisten.

5.1.4 Transiente Transfektion mit PEI

PEI (Polyethylenimine) wurde für die Transfektion in 96-well Platten verwendet (BRET-Assay siehe 5.6, Dual-Luciferase Assay siehe 5.7). Im Vergleich zur transienten Transfektion mit Effectene oder Metafectene (5.1.2, 5.1.3) wurde hier die doppelte Menge an Plasmid verwendet (z.B. 2 µg YFP-p115 statt 1 µg YFP-p115). Wie bei der Transfektion mit Metafectene wurden zwei Eppendorfgefäße pro Kondition vorbereitet. In eines wurden die Plasmide vorgelegt, in ein zweites die dreifache Plasmid-Menge PEI. Beide Eppendorfgefäße wurden mit 50 µl DMEM ohne FCS pro µg DNA aufgefüllt, zusammengeführt und 30 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend konnte die Mischung mit Zellen zusammengeführt und ausgesät werden.

5.1.5 Transfektionsprotokolle

Das Standard-Transfektionsprotokoll für die $G\alpha_{13}$-RhoGEF-Interaktion sah wie folgt aus:

Name des Plasmids	Menge in µg
TPα-R	0,8
$G\alpha_{13}$-mTurquoise2	1,0
Gβ-wt	0,5
Gγ-wt	0,4
YFP-RhoGEF	1,0- p115-RhoGEF 1,5- LARG und PDZ-RhoGEF*

Tabelle 5.1 | Transfektionsprotokoll $G\alpha_{13}$-RhoGEF-Interaktion *aufgrund unterschiedlicher Expressionseffizienz.

Das Standard-Transfektionsprotokoll für die Gγ-RhoGEF-Interaktion sah wie folgt aus:

Name des Plasmids	Menge in µg
TPα-R	0,8
IRES: Gα13-wt, Gβ-wt, Gγ-mTurquoise2	1,5
YFP-RhoGEF	1,0- p115-RhoGEF 1,5- LARG und PDZ-RhoGEF

Tabelle 5.2 | Transfektionsprotokoll Gγ-RhoGEF-Interaktion

Das Standard-Transfektionsprotokoll für den G-Protein-Aktivierungsassay sah wie folgt aus:

Name des Plasmids	Menge in µg
TPα-R	0,8
$G\alpha_{13}$-mTurquoise2	1,0
Gβ-wt	0,5
Gγ-YFP	0,5
RhoGEF	0,8- p115-RhoGEF

Tabelle 5.3 | Transfektionsprotokoll G-Protein-Aktivierungsassay

5.1.6 Beschichten v. Deckgläschen mit PLL u. Aussäen transfizierter Zellen

Um die Messung der transfizierten Zellen am Mikroskop zu ermöglichen, mussten diese auf Deckgläschen aus Glas gesplittet werden. Da die Deckgläschen nicht steril sind, wurden diese durch das Eintauchen in 70 % Ethanol sterilisiert und anschließend in ein *well* (Wanne) einer 6-*Well Multiwell*-Platte gegeben, in welche vorher 2 ml PBS-Puffer gegeben wurde. Danach wurde der PBS-Puffer abgesaugt, sodass sich pro *well* ein sterilisiertes und gewaschenes Deckgläschen befand. Auf jedes dieser Deckgläschen wurden mittig einige Tropfen Poly-L-Lysin (PLL) gegeben. Diese Tropfen wurde mindestens eine Stunde auf dem Deckgläschen gelassen, damit sich an dessen Oberfläche das Polymer ausbilden kann, an welchem die Zellen wachsen können. Die Tropfen wurden dann abgesaugt und die Deckgläschen erneut mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen.

Einen Tag vor der Messung am Fluoreszenzmikroskop wurden die transfizierten Zellen, analog zur Beschreibung in 5.1.1, mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) von der 6cm-Zellkulturschale abgelöst und in 5 ml DMEM-Medium aufgenommen. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen in 9 ml DMEM-Medium resuspendiert und in jedes *well*, in das vorher bereits 1 ml Medium vorgelegt wurde, 1 ml der resuspendierten, transfizierten Zellen gegeben. Diese konnten nun über Nacht am Polymer festwachsen und waren somit bereit für die Messung.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (= *Polymerase Chain Reaction*: PCR) ist eine Methode zur enzymatischen Vervielfältigung von DNA, welche für alle Klonierungsmethoden, beschrieben in 5.3, benötigt wurde. Bei der PCR-Maschine handelt es sich um einen Thermocycler, der unterschiedliche Temperaturen für die eingestellte Zeit halten kann. Diese unterschiedlichen Temperaturen werden für die drei Hauptschritte der Polymerase-Kettenreaktion benötigt. Welche Komponenten für die PCR zusammenpipettiert wurden ist, abhängig von der Klonierungsstrategie, welche in 5.3 beschrieben ist. Immer benötigt wird jedoch die Template-DNA, welche den zu vervielfältigenden Teil enthält, zwischen einem und vier Primern, welche den zu vervielfältigenden Teil eingrenzen, eine Polymerase, um den zu vervielfältigenden Teil zu polymerisieren und dNTPs, welche die Bausteine des zu vervielfältigenden Teils darstellen. Die drei Hauptschritte der PCR sind folgende: Denaturierung: die Doppelstränge der DNA trennen sich; *Annealing*: die Primer binden an entsprechenden Bindestellen; Polymerisation: die Polymerase elongiert den Primer zum kopierten DNA-Abschnitt. Durch das „*cyclen*“ der drei Hauptschritte kommt es zur exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz. Die Temperaturen und Zeiten lassen sich aus folgender Tabelle entnehmen:

Reaktionsschritt	Temp.	Wiederholungen	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	1	3 min
Denaturierung	98 °C	30-35	10-30 s
Annealing	65 °C (variabel)	30-35	20-30 s
Polymerisation	72 °C	30-35	30 s/kb der Ziel-DNA
Finale Polymerisation	72 °C	1	5-10 min
Aufbewahrung	4 °C	1	∞

Tabelle 5.4 | Ablauf einer PCR

5.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte können mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt werden. Hierzu wurde ein 1 %iges Agarose-Gel gegossen. Diese Mischung aus 1 % Agarose in TAE-Puffer wurde in der Mikrowelle zum Schmelzen gebracht, sodass eine klare Flüssigkeit entstand. Diese wurde dann in einen eingespannten Schlitten mit Kamm gegeben, zusätzlich mit einem Tropfen Ethidiumbromid versetzt und mindestens eine halbe Stunde trocknen lassen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Schlitten in eine Elektrophoresekammer gegeben, welche mit TAE-Puffer aufgefüllt wurde. Vor Befüllen der Taschen wurden die PCR-Produkte mit einem violetten 6x Ladepuffer versetzt, welcher die Laufweite der Proben anzeigt und die Beladung der Taschen durch die erhöhte Dichte der Proben vereinfacht. Abhängig von der Länge des Zielproduktes wurde entweder eine 100 bp oder 1 kb DNA-Leiter als Referenz aufgetragen. Nach Anschluss der Elektroden erfolgte die Gelelektrophorese bei 80V für mindestens 30 min. Hierbei wandert die negativ geladene DNA zum Pluspol, wobei die einzelnen DNA-Fragmente anhand ihrer Masse (bzw. ihres Masse zu Ladung-Verhältnisses) aufgeteilt werden. Das gewollte Fragment konnte anschließend mit Hilfe der DNA-Leiter identifiziert werden und aus dem Gel geschnitten werden. Dies geschah unter UV-Licht, da die DNA durch das Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht wurde. Im nächsten Schritt kann die DNA aus dem Gelstück extrahiert werden.

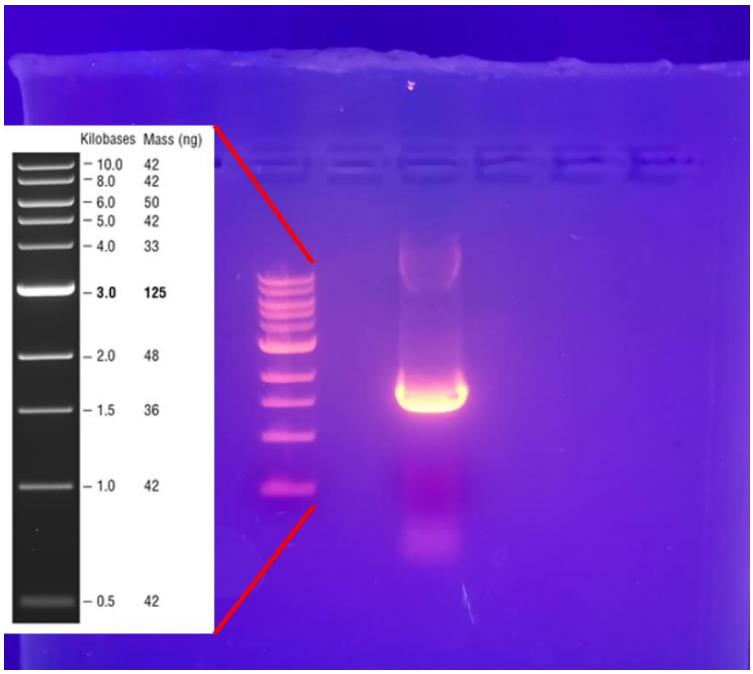

Abbildung 5.1 | Gelelektrophorese Beispielhafte Darstellung eines für diese Arbeit angefertigten Agarose-Gels mit Probe und 1 kb DNA-Leiter.

5.2.3 Gel-Extraktion/Aufreinigung

Zur Extraktion der DNA aus dem Gel wurde eines der beiden Kits verwendet: das Qiaquick Gel Extraction-Kit, oder das NEB® Monarch DNA Gel Extraction Kit. Das Prinzip und der Ablauf beider Kits ist jedoch derselbe. Zu dem Gelstück, welches sich in einem Eppendorfgefäß befindet und die gewünschte DNA enthält, wurde die dreifache beziehungsweise vierfache Menge eines Lösepuffers gegeben. Das Eppendorfgefäß wurde dann einige Minuten bei 50 °C in den Thermomixer gestellt, bis das Gel komplett aufgelöst war. Die Flüssigkeit wurde anschließend auf eine Aufreinigungssäule übertragen und für eine Minute bei 13300 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde zweimal ein Ethanol-basierter Waschpuffer auf die Säule gegeben und zentrifugiert, sodass sich nach diesen drei Zentrifugierschritten nur noch DNA in der Säule befand und alle nicht erwünschten Substanzen durchgeflossen waren. Die DNA konnte dann mit Wasser oder Elutionspuffer aus der Säule eluiert werden und in einem Eppendorfgefäß

aufgefangen werden. Zur Erhöhung der Ausbeute bei besonders langen Fragmenten wurde die Säule gelegentlich, nach dem Zugeben von Wasser oder Elutionspuffer, für einige Minuten auf 37 °C erwärmt, um somit die Lösung der DNA zu fördern. Das hier beschriebene Prozedere wurde auch als Aufreinigungsmethode verwendet, wenn es sich nicht um ein Gel handelte, sondern um gelöste DNA mit Verunreinigungen.

5.2.4 Restriktionsverdau

Eine weitere Methode, neben der Agarose-Gelelektrophorese ein PCR-Produkt vom eingesetzten Template zu trennen, ist der Restriktionsverdau. Hierbei wurde dem nach 5.2.3 aufgereinigten Produkt 2 µl Cutsmart-Puffer und 1 µl DpnI (20000 *units*/µl) zugegeben und dieses Gemisch für mindestens eine Stunde bei 37 °C und leichtem Schütteln in den Thermomixer gegeben. Hierdurch wird das Template abgebaut, da dieses, im Gegensatz zum PCR-Produkt, in Bakterien hergestellt wurde und somit an bestimmten Stellen methyliert ist, an welchen DpnI schneidet.

Restriktionsenzyme können auch als Klonierungsansatz dienen, wurden in dieser Arbeit jedoch nicht zum Klonieren verwendet.

5.2.5 Ligation

Bei einer Ligation werden DNA-Stränge durch Ligasen verknüpft. Dafür sind einzelstängig überhängende Enden (sogenannte *sticky ends*) oft von Vorteil. Ligasen wurden in dieser Arbeit nur in Form von Enzymgemischen wie dem Gibson Assembly Master Mix oder dem KLD Enzyme Mix eingesetzt.

5.2.6 Kultivierung von E. coli

Zum Kultivieren von E. coli-Bakterien wurden LB-Agar-Platten verwendet. Diese enthielten die Antibiotika Ampicillin oder Kanamycin, wodurch gewährleistet werden konnte, dass nur Bakterien mit entsprechender Resistenz (durch das Plasmid was bei der Transformation erhalten wurde; siehe 5.2.8 und 5.3.9) auf den Platten wachsen konnten. Die LB-Agar-Platten wurden hergestellt, indem ein in der Mikrowelle verflüssigtes Gemisch aus 1,5 % Agar in LB-Medium in sterile Plastikschalen gegossen wurde und dieses durch Abkühlen fest geworden war. Nach dem Ausplattieren von Bakterien auf den Platten wurden diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Auf diesen Platten gewachsene Bakterien-Kolonien wurden mit Hilfe von Plastikspitzen der Eppendorf-Pipetten gepickt und in 100 ml antibiotikaversetztes LB-Medium gegeben, welches sich in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben befand. Diese Erlenmeyerkolben wurden erneut über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert, wodurch eine starke Vermehrung der Bakterien stattfand.

5.2.7 Generierung chemisch kompetenter E. coli

Die Aufnahmefähigkeit von Bakterien für (plasmidische) DNA nennt man Kompetenz. Zur Generierung dieser kompetenten E. coli wurden erworbene DH5α kompetente E. coli (NEB® *5-alpha Competent E.coli*) auf antibiotikafreien LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurde eine, wie in 5.2.6 beschrieben, in 10 ml flüssigem LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler wachsen lassen. 5-10 ml dieser Vorkultur wurden erneut in 250 ml flüssiges LB-Medium gegeben und so lange bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert, bis eine optische Dichte von OD_{600} 0,3-0,6 erreicht wurde. Zur Lagerung wurden die bei 4 °C und 5000 U/min in 10 min abzentrifugierten Bakterien in 25 ml gekühltem TSV-Puffer (LB-Medium mit 10 % PEG 3000, 5 Volumenprozent DMSO und 20 mM Mg2+ versetzt) resuspendiert und in Eppendorfgefäße aliquotiert. Nach ein-

bis zweistündiger Lagerung auf Eis wurden die Aliquots mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

5.2.8 E. coli-Transformation mittels KCM-Methode

Zur Vervielfältigung von Plasmiden in *E. coli*, wie beschrieben in 5.2.6, müssen die *E. coli* die entsprechenden Plasmide erst aufnehmen. Diesen Vorgang nennt man Transformation. Für die Transformation mittels TSB/KCM wurden die chemisch kompetenten *E. coli* aus 5.2.7 auf Eis aufgetaut. Auf 2 µl DNA (beziehungsweise 0,2 µl DNA bei einer re-Transformation, eine Transformation von einem bereits präparierten Plasmid) zusammen mit 78 µl Reinstwasser und 20 µl KCM 5x-Puffer (enthält KCl, $CaCl_2$ und $MgCl_2$) wurden 100 µl dieser chemisch kompetenten *E. coli* gegeben. Anschließend wurde 20 min auf Eis, 10 min auf Raumtemperatur und 30 min auf 37 °C bei 600 rpm im Thermomixer inkubiert. Vor dem Inkubationsschritt im Thermomixer wurde 1 ml antibiotikafreies LB-Medium hinzugegeben. Das Gemisch wurde wenige Sekunden bei 13300 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit dem Haftwasser resuspendiert und komplett auf die LB-Agar Platte gegeben, wo (gegebenenfalls im „zickzack“) ausgestrichen wurde. Bei re-Transformationen wurden 20 µl aus dem Gemisch aus dem Thermomixer verwendet.

5.2.9 E. coli-Transformation mittels Hitzeschock

Alternativ zur in 5.2.8 verwendeten Methode wurden bei Klonierungsmethoden, bei denen von einer geringen Ausbeute ausgegangen werden konnte (beispielsweise Mutagenesen), superkompetente E. coli verwendet (NEB® *5-alpha competente E. coli*). Hierzu wurden 2 µl DNA zu 12,5 µl der auf Eis aufgetauten superkompetenten E. coli gegeben, durch kurzes Anschnippen gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubieren lassen. Anschließend erfolgte der Hitzeschock, bei dem diese speziellen Bakterien in

der Lage sind, plasmidische DNA aufzunehmen. Der Ansatz wurde für 30 Sekunden auf 42 °C im Thermomixer erhitzt und dann wieder für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl des mitgelieferten SOC-Mediums wurde erneut für 30-60 Minuten bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Die Bakterien wurden dann analog zu 5.2.8 auf den LB-Agar-Platten ausplattiert.

5.2.10 Midi-Präparation

Um die in *E. coli* vervielfältigten Plasmide zu isolieren, wurde eine Midi-Präparation durchgeführt. Hierbei wurden im ersten Schritt das nach 5.2.6 angeimpfte LB-Medium, in dem sich die Bakterien über Nacht vermehrt hatten, in zwei 50 ml Falcons aufgeteilt und anschließend bei 4500 Umdrehungen pro Minute und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und beide Zellpellets aus den Falcons zusammen in 4ml Resuspensionspuffer (Puffer P1) resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen durch 4 ml des basischen Lysepuffer (Puffer P2) lysiert. Dabei wurde auf die homogene Verteilung der blauen Farbe des Indikators geachtet, sodass alle Zellen lysiert wurden. Durch Zugabe des Neutralisationspuffers (Puffer P3) verlor die Lösung ihre Farbe und es wurde erneut für 30 Minuten bei 4 °C und 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Hierbei sammelten sich die Zellbestandteile am Boden des Falcons, oder schwammen auf der Flüssigkeit, in welcher sich die plasmidische DNA und andere lösliche Teile befanden. Diese Flüssigkeit wurde nun auf eine Anionenaustauschersäule gegeben, welche vorher mit 4ml Equilibrationspuffer (QBT-Puffer) inkubiert wurde. In dieser Säule blieb die negativ geladene DNA hängen, während andere Bestandteile durch das zweimalige Waschen mit 10 ml ethanolhaltigem Waschpuffer (QC-Puffer) aus der Säule gewaschen wurden. Die plasmidische DNA wurde mit 5 ml Elutionspuffer (QF-Puffer) aus der Säule gelöst und in ein Falcon mit 3,5 ml Isopropanol tropfen lassen, in welchem die DNA erneut ausfällt. Die Lösung wurde gevortext und erneut 20 Minuten bei 4 °C und 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand

wurde erneut verworfen und das DNA-Pellet mit 2 ml 80 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde durch das Absaugen und Verdunsten (im 37 °C Raum) des 80 %igen Ethanols getrocknet und anschließend in 100 µl Reinstwasser gelöst.

5.2.11 Messung und Einstellung der DNA-Konzentration

Die Plasmide, welche für die Transfektionen verwendet wurden, wurden idealerweise bei einer Konzentration von 1 µg/µl gelagert. Dafür mussten die aus der DNA-Präparation (siehe 5.2.10) erhaltenen Plasmide auf diese Konzentration eingestellt werden. Zur Messung der initialen Konzentration nach dem Lösen der DNA in 100 µl Reinstwasser wurde ein Nano-Photometer verwendet. Hierbei wurde die Extinktion der Probelösung bei 260 nm im Verhältnis zu Reinstwasser gemessen. Nach dem Reinigen der Küvette und des Deckels wurde die Extinktion von 3 µl Reinstwasser als Referenz gemessen, anschließend konnte die Extinktion von 3 µl der Proben gemessen werden. Zusätzlich wurde durch das Photometer auch die Extinktion bei 230 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Dabei zeigte der Quotient von A_{260}/A_{280} die Reinheit der DNA an. Der Wert sollte bei einer Midi-Präparation zwischen 1,8 und 2,0 liegen, wobei Proteine tiefere und RNA höhere Werte liefert. Der Quotient A_{260}/A_{230} sollte über 2 liegen, um eine Verunreinigung durch Polysaccharide auszuschließen. Eine Absorption bei 320 nm entsteht durch Trübungen oder Fremdstoffe in der Probe, beispielsweise durch ungelöste Partikel und sollte somit so gering wie möglich sein. Wenn alle Parameter passen, wurde solange Reinstwasser zur Probe gegeben, bis diese eine Konzentration von 1 µg/µl erreichte.

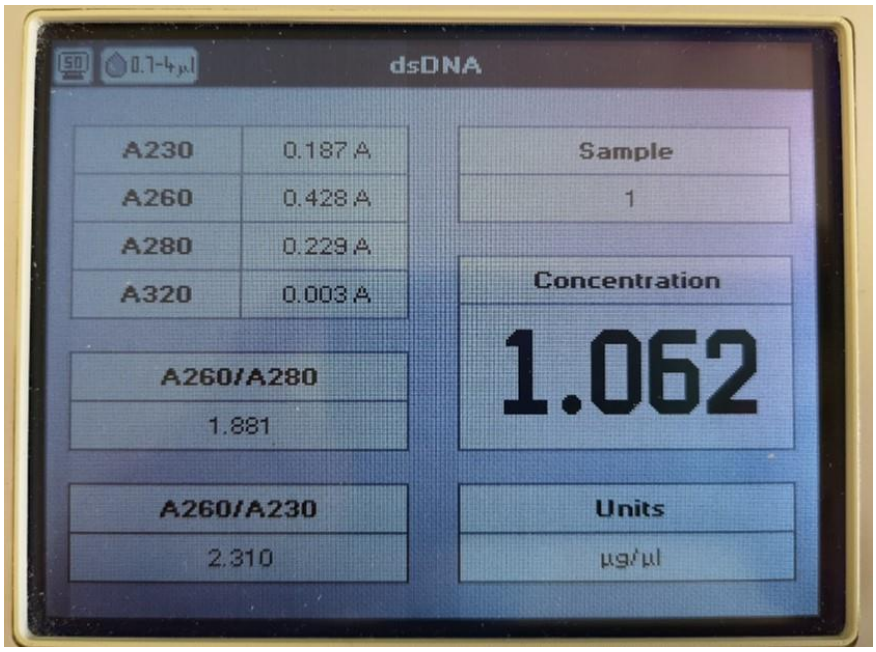

Abbildung 5.2 | Messung der DNA-Konzentration Beispielhafte Messung der DNA-Konzentration. Wie gewollt liegt der A_{260}/A_{280}-Quotient zwischen 1,8 und 2. A_{260}/A_{230} liegt über 2.

5.2.12 DNA-Sequenzierung

Um zu kontrollieren, dass Klonierungen funktioniert haben und die Sequenz des erhaltenen Plasmids dem des Wunschplasmids entspricht, wurde 1 µg des erhaltenen Plasmids in 14 µl Reinstwasser verdünnt und an Eurofins Genomics geschickt, wo die Plasmide nach der Sanger-Methode sequenziert wurden. Da die erhaltenen Sequenzierungen nur circa 1000 Basenpaare beinhalten, wurden die Sequenzierprimer so gewählt, dass die Sequenzierung in jedem Fall über die veränderten Stellen und/oder Schnittstellen lief, um durch einen Abgleich der Sequenz der Sequenzierung mit der Sequenz der Plasmidkarte die richtige Basenfolge zu gewährleisten. In den meisten Fällen wurden mehrere Sequenzierungen mit unterschiedlichen Sequenzierprimern in Auftrag gegeben (beispielsweise ein *forward*- und ein *reverse*-Primer).

5.3 Klonierung

Um genetisch veränderte Proteine (beispielsweise Mutanten und Chimären) für die Versuche zu erhalten, wurde von verschiedenen Methoden zur Klonierung Gebrauch gemacht, wobei die Erbinformation durch PCRs und spezielle Primer verändert wurde. Der erste Schritt jeder Klonierung ist das Erstellen einer Ziel-Plasmidkarte, um den Erfolg der Klonierung durch Abgleich mit jener zu gewährleisten.

5.3.1 Punktmutationen/Mutagenese mittels Mutageneseprimern

Bei Punktmutationen (auch Mutagenese genannt) handelt es sich um den Austausch einzelner Aminosäuren in Proteinen durch den Austausch von bis zu drei Basen. Dabei wurde ein einzelner Primer entwickelt, welcher circa 15 Basenpaare lang ist und ungefähr in der Mitte die entsprechende Fehlpaarung enthält, die für die einzufügende Aminosäure codiert. In diesem Beispiel wurde eine Glutaminsäure (E, Codierung in diesem Fall GAG) zu einem Glycin (G, Codierung in diesem Fall GGG) mutiert:

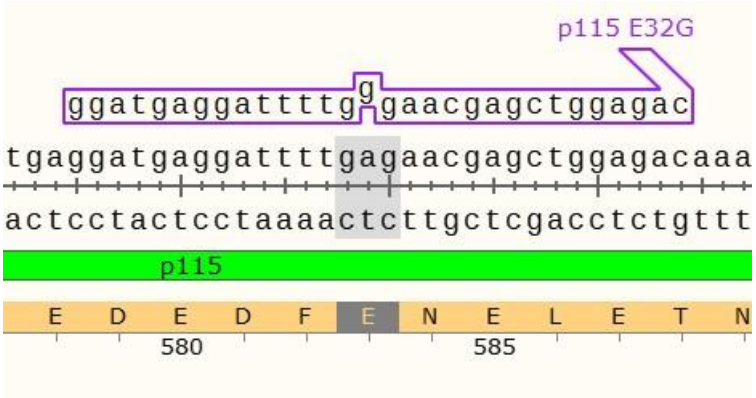

Abbildung 5.3 | Beispiel Mutageneseprimer Der in diesem Beispiel dargestellte Mutageneseprimer verändert das Triplett GAG (welches für Glutaminsäure codiert) zu GGG (welches für Glycin codiert).

Folgende Komponenten wurden für die Mutagenese-PCR (50 µl Ansatz) zusammenpipettiert:

H_2O	35 µl
5x Q5 reaction buffer	10 µl
Mutagenese-Primer (10 pmol/µl)	2,5 µl
DNA-Template (0,01 µg/µl)	1 µl (=10 ng Gesamt-DNA)
dNTPs 10 mM	1 µl
NEB® Q5 Polymerase	0,5 µl

Tabelle 5.5 | Ansatz Mutagenese-PCR

Die folgende Mutagenese-PCR lief wie in 5.2.1 beschrieben mit 30 Zyklen ab. Anschließend wurde wie in 5.2.3 eine Säulenaufreinigung durchgeführt und die Template-DNA wie in 5.2.4 verdaut. Die erhaltene DNA wurde mittels Transformation per Hitzeschock (5.2.9) in E. coli vervielfältigt und die vervielfältigte plasmidische DNA wurde dann mittels Midi-Präparation (5.2.10) gewonnen, auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt (5.2.11) und sequenziert (5.2.12).

5.3.2 Punktmutationen, Insertionen, Deletionen mittels NEB® Q5 Site-Directed Mutagenesis-Kit

Folgende Komponenten wurden für die *Q5 Site-Directed Mutagenesis*-PCR (25 µl Ansatz) zusammenpipettiert:

H_2O	9 µl
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix*	12,5 µl
forward-Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl
reverse-Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl
DNA-Template (0,1 µg/µl)	1 µl (10 ng Gesamt-DNA)

Tabelle 5.6 | Ansatz PCR Site-Directed Mutagenesis-Kit *enthält die Polymerase, die Pufferlösung und dNTPs.

Das NEB® *Q5 Site-Directed Mutagenesis-Kit* eignet sich für Punktmutationen, Insertionen und Deletionen. In dieser Arbeit wurde das Kit ausschließlich für eine Insertion verwendet. Das Besondere an diesem Kit ist die Verwendung von zwei gegenläufigen Primern, welche sich jedoch nicht überlappen, wodurch man am Ende der PCR DNA-Stränge erhält, die *blunt ends* (Enden ohne Überlappung) zueinander besitzen. In einem zweiten Schritt, der KLD-Behandlung, welche direkt nach der PCR erfolgte (siehe 5.2.1), wurden diese *blunt ends* dann zusammengefügt. Der KLD Enzym-Mix enthält eine Kinase, wodurch die *blunt ends* phosphoryliert wurden, eine Ligase, wodurch die phosphorylierten *blunt ends* zusammengefügt wurden und das Restriktionsenzym DpnI, welches das Template abbaute. Abschließend folgten wieder Transformation mittels Hitzeschock (5.2.9), Midi-Präparation (5.2.10), Einstellen der Konzentration (5.2.11) und die Sequenzierung (5.2.12).

5.3.3 Gibson Assembly

Die am häufigsten verwendete Klonierungsmethode in dieser Arbeit ist das Gibson-Assembly. Hierbei handelt es sich um eine vielseitige Methode, welche für Insertionen, Deletionen und besonders für das Erstellen von Chimären geeignet ist. Dabei werden mittels PCR ein Backbone und eines oder mehrere Fragmente vervielfältigt, welche überhängende Enden zueinander besitzen, sogenannte *sticky ends*. Diese stellen das Gegenteil zu den in 5.3.2 beschriebenen *blunt ends* dar. Zur Erschaffung dieser *sticky ends* benötigt man vier Primer, für den Fall, dass man nur ein Backbone und ein Fragment hat.

Primerdesign

Man benötigt für jede Schnittstelle zwischen Backbone und Fragment und zwischen Fragmenten zwei entgegenlaufende Primer:

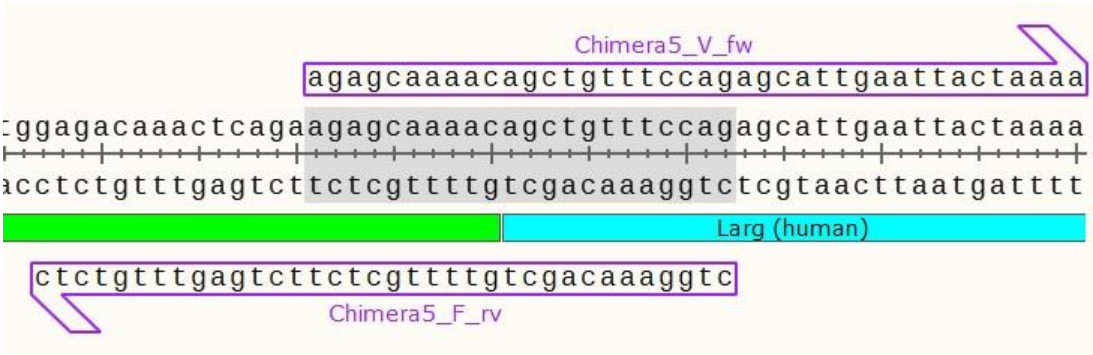

Abbildung 5.4 | Gibson Assembly Primerdesign I

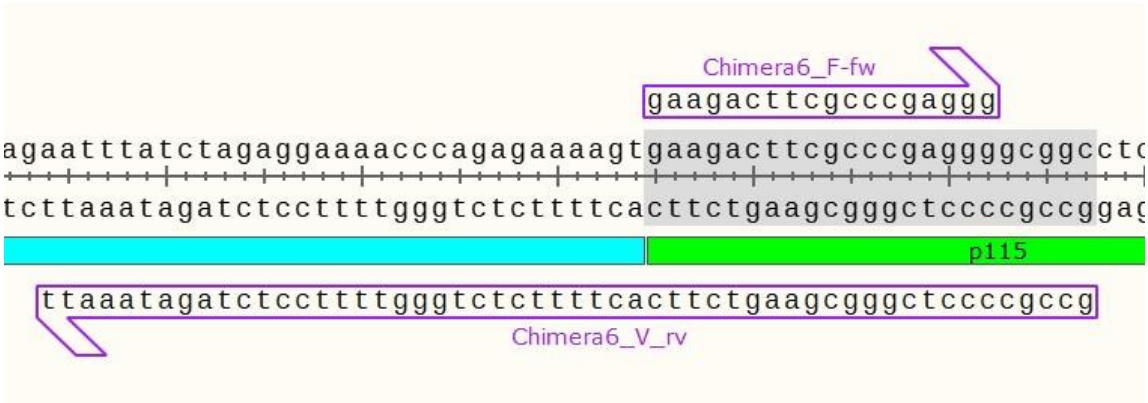

Abbildung 5.5 | Gibson Assembly Primerdesign II

Dabei wurde die Primer erst an der Schnittstelle in die Laufrichtung verlängert, bis eine Schmelztemperatur (=Temperatur bei dem sich der Primer vom Template trennt; wichtig für die PCR) von 60 °C erreicht war. Im zweiten Schritt wurde der Überhang für die *sticky ends* an die Primer gehängt. Dieser Überhang (in Abbildung 5.4 und 5.5 grau markiert) sollte mindestens 20 Basenpaare lang sein und konnte entweder auf beide Primer aufgeteilt werden (Abbildung 5.4) oder nur an einen der beiden Primer gehängt werden (Abbildung 5.5). Der Überhang ist dabei unbedeutend für die Schmelztemperatur, da er nicht an das Template bindet. Um dies sicherzustellen

,wurden die designten Primer in die Ausgangsplasmidkarten eingefügt und abgeglichen, dass nur die entsprechenden Basen binden.

PCR

Für das Backbone und jedes Fragment benötigt man eine PCR. Folgende Komponenten wurden für die Gibson Assembly-PCR (25 µl und 50 µl Ansatz) zusammenpipettiert:

	Insert-PCR (25 µl)	Backbone-PCR (50 µl)
H_2O	16,5 µl	32,5 µl
5x Q5 reaction buffer	5 µl	10 µl
Fw-Primer (10pmol/µl)	1,25 µl	2,5 µl
Rv-Primer (10pmol/µl)	1,25 µl	2,5 µl
DNA-Template	0,2 µl (1 µg/µl)	1 µl (0,01µg/µl)
dNTPS 10mM	0,5 µl	1 µl
NEB Q5 Polymerase®	0,25 µl	0,5 µl

Tabelle 5.7 | Ansatz PCR Gibson-Assembly

Assembly

Nach der PCR wurde das Produkt der Insert-PCR (Fragment) über ein Agarosegel aufgereinigt und ein Gelstück ausgeschnitten, welches DNA in der gewünschten Länge enthält (siehe 5.2.2). Wie in 5.2.3 beschrieben, wurde die DNA aus diesem Gel extrahiert und aufgereinigt. Die *Backbone*-PCR wurde ebenfalls nach 5.2.3 aufgereinigt und nach 5.2.4 verdaut. Von beiden Produkten wurde anschließend die Konzentration gemessen (5.2.11), in diesem Fall jedoch in ng/µl. Im Anschluss folgt die eigentliche *Gibson Assembly*-Reaktion. Dabei wurden bestimmte Mengen von Backbone und Fragment(en) zusammenpipettiert. Die Menge ist abhängig von der gemessenen Konzentration und Länge der DNA. Anschließend wurde mit Reinstwasser auf 10µl aufgefüllt und 10 µl Hifi DNA *Assembly* 2x Mastermix hinzugegeben. Dieser Mastermix enthält, neben einem entsprechenden Puffer, drei Enzyme: eine 5´-Exonuclease, welche 5´-Enden abbaut, wodurch die vorher designten *sticky ends* entstehen und sich aneinander anlagern, eine Ligase, welche die

angelagerten Stücke verbindet und eine DNA-Polymerase, die die durch die Exonuclease entstandenen Lücken auffüllt. Nach der *Gibson Assembly* Reaktion erfolgte die Transformation mit KCM (5.2.8), die Midi-Präparation (5.2.10 und abschließend das Einstellen der Konzentration (5.2.11) und die Sequenzierung (5.2.12).

5.4 Fluoreszenzmikroskopie

Eine Sonderform der Lichtmikroskopie ist die Fluoreszenzmikroskopie. Dass Fluorophore durch die Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge ebenfalls Licht einer anderen Wellenlänge emittieren können, wird sich bei dieser Sonderform zu Nutze gemacht. Dabei können unterschiedlichste Zellbestandteile mit Fluorophoren markiert werden. Somit sind während Fluoreszenzmikroskopie nur diese markierten Zellbestanteile sichtbar und auch nur wenn das entsprechende Anregungslicht benutzt wird. Fluoreszenzmikroskopie eignet sich somit sehr gut dafür, Zellbestandteile zu lokalisieren und untereinander abzugrenzen. Durch die Möglichkeit der genetischen Codierung von Fluorophoren in Zellen und somit die Fusion an zelleigene Strukturen, ohne deren eigentliche Funktion zu stören, können mit der Fluoreszenzmikroskopie auch dynamische Prozesse beobachtet werden.

Proteinische beziehungsweise peptidische Fluorophore, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, basieren auf GFP (*green flourescent protein*), welches 1962 von Osamu Shimomura aus der Quallenart *Aequorea victoria* isoliert wurde (SHIMOMURA et al., 1962). GFP wurde mehrfach modifiziert, sodass mittlerweile viele verschiedene Versionen dieses Proteins mit unterschiedlichsten Eigenschaften zur Verfügung stehen. Diese können sich unter anderem in Absorptionsspektrum (Wellenlänge des Anregungslichtes), Emissionsspektrum (Farbe) und relativer Helligkeit zum Wildtyp-GFP unterscheiden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Unterformen von YFP (yellow fluorescent protein), beispielsweise eYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) und CFP (*cyan fluorescent protein*), beispielsweise mTurquoise2, verwendet.

5.5 FRET- Experimente

FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) wurde erstmals 1946 von Theodor Förster beschrieben (Förster, 1946). FRET beschreibt ein Phänomen, bei dem ein durch Anregungslicht einer bestimmten Wellenlänge angeregtes Fluorophor die aufgenommene Energie strahlungslos an ein weiteres Fluorophor weitergeben kann. Dabei wird das Fluorophor, welches Energie abgibt, als Donor-Fluorophor bezeichnet und das Fluorophor, welches Energie aufnimmt, als Akzeptor-Fluorophor.

5.5.1 Grundlagen und Voraussetzungen von FRET

Fluorophore können durch das Bestrahlen mit elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Wellenlänge (diese ist für die verschiedenen Fluorophore individuell) in einen angeregten Zustand gebracht werden, indem sie die Energie jener elektromagnetischen Strahlung aufnehmen können. Im Normalfall kann diese Energie in Form von Fluoreszenz (Emission von Licht) wieder abgegeben werden, was die Fähigkeit darstellt, welche Fluorophore ausmacht (siehe Abbildung 5.6).

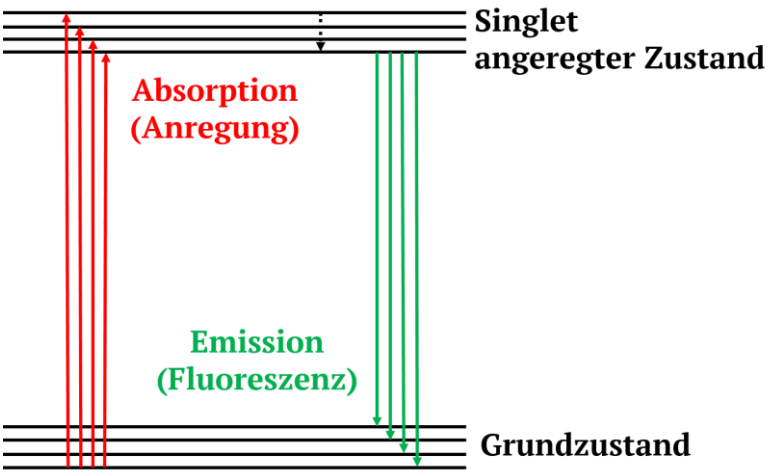

Abbildung 5.6 | Schema Fluoreszenz vereinfacht dargestelltes Jablonski-Termschema.

Bei FRET wird die durch Anregungslicht einer bestimmten Wellenlänge aufgenommene Energie nicht in Form von Emission (Fluoreszenz) abgegeben, sondern kann strahlungsfrei an ein weiteres (Akzeptor-)Fluorophor weitergegeben werden. Dieses Akzeptor-Fluorophor wiederum kann die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz wieder abgeben, obwohl es selbst nicht direkt angeregt wurde. FRET eignet sich dabei hervorragend, um Proteininteraktionen und Konformationsänderungen in lebenden Zellen in Echtzeit zu beobachten, da das Ausmaß des Energietransfers stark entfernungsabhängig ist. Der Energietransfer ist jedoch nur möglich, wenn drei Grundvoraussetzungen erfüllt werden.

Voraussetzung 1: Spektrenüberlappung

Alle Fluorophore besitzen sowohl ein Absorptions- als auch ein Emissionsspektrum. Dabei gibt das Absorptionssprektrum an, in welchem Wellenlängenbereich elektromagnetischer Strahlung das Fluorophor Energie absorbieren kann, wobei es eine Wellenlänge gibt die das Absorptionsmaximum darstellt. Das Emissionsspektrum gibt an, in welchem Wellenlängenbereich elektromagnetischer Strahlung das Fluorophor Energie abgeben kann. Eine Voraussetzung für das Entstehen von FRET ist, dass sich das Emissionsspektrum des Donor-Fluorophors (das Fluorophor, das Energie abgibt) und das Absorptionsspektrum des Akzeptor-Fluorophors (das Fluorophor, das Energie aufnimmt) überlappen. Dass diese Voraussetzung in den Experimenten dieser Arbeit erfüllt wurde, lässt sich an Abbildung 5.7 erkennen. Das in dieser Arbeit am häufigsten eingesetzte Fluorophor-Paar mTurquoise2-eYFP zeigt eine ausgeprägte Überlappung des Emissionsspektrums des Donors (türkis) und des Absorptionsspektrums des Akzeptors (grün).

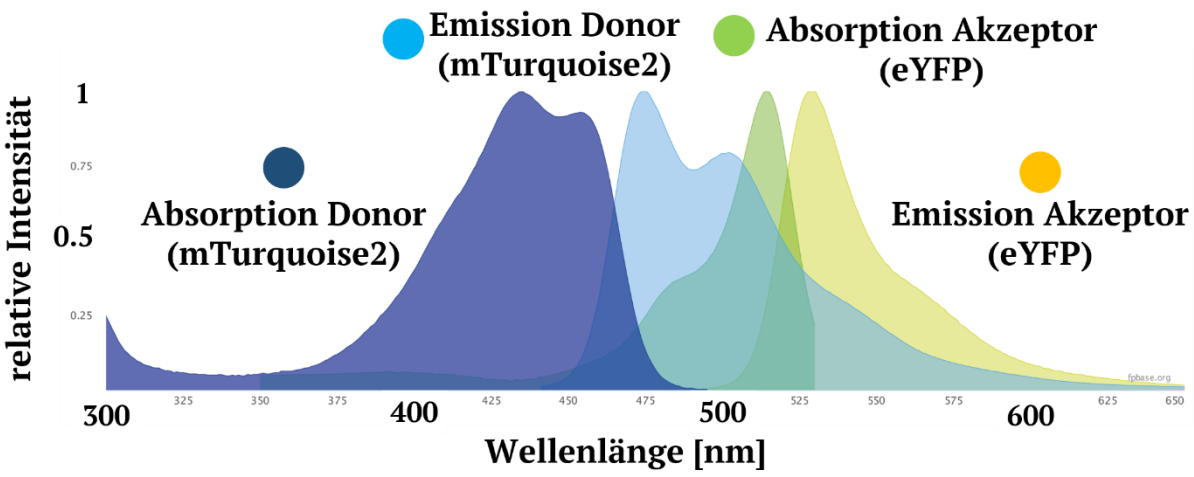

Abbildung 5.7 | Spektrenüberlappung Die gezeigten Daten der Fluorophor-Spektren wurden von https://www.fpbase.org/spectra/ exportiert (Lambert, 2019) und modifiziert. Gezeigt sind die Absorptions- und Emissionsspektren des am häufigsten in dieser Arbeit eingesetzten Fluorophor-Paares mTurquoise2-eYFP.

Voraussetzung 2: Abstand zwischen den Fluorophoren

Ein weiterer Faktor für das Auftreten von FRET ist der Abstand der beiden Fluorophore zueinander. Ein Energietransfer zwischen den Fluorophoren ist nur möglich, wenn sich diese in einem Abstand von unter 10 nm zueinander befinden (Stryer, 1978). Diese Eigenschaft ist entscheidend für den Einsatz von FRET zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen, da somit in Echtzeit gemessen werden kann, ob zwei markierte Proteine in räumliche Nähe kommen, oder sich trennen. Dabei hängt die Effizienz der Energieübertragung (E) von der sechsten Potenz des Abstandes zwischen den Fluorophoren (r) und des Förster-Radius (R_0) ab, was an folgender Formel ersichtlich wird:

$$E = \frac{1}{1 + \frac{r^6}{{R_0}^6}}$$

Der Förster-Radius (R_0) gibt an, bei welchem Abstand zweier Fluorophore die Energieübertragung genau 50 % der maximalen Energieübertragung beträgt. Dieser

Wert ist spezifisch für ein Fluorophor-Paar. Die Effizienz der Energieübertragung im Verhältnis zum Abstand beider Fluorophore lässt sich in Abbildung 5.8 beobachten.

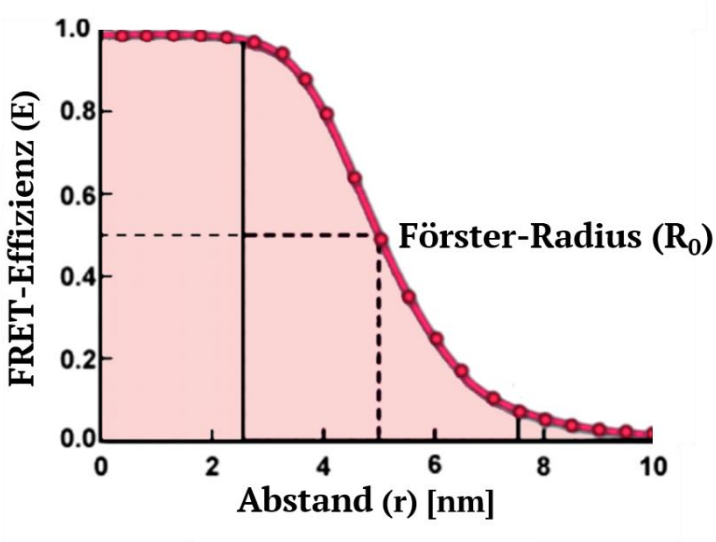

Abbildung 5.8 | FRET-Effizienz Abbildung der Exponentialfunktion, welche den Zusammenhang zwischen dem Abstand zweier Fluorophore und der Effizienz des Energieübertrages darstellt, modifiziert nach (Pelosse et al., 2016).

Voraussetzung 3: Orientierung der Fluorophore zueinander

Der dritte Faktor, welcher den Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren maßgeblich beeinflusst, ist die räumliche Orientierung der Fluorophore zueinander. Dies lässt sich durch die Formel zum Berechnen des Förster-Radius verdeutlichen.

$$R_0{}^6 = 8{,}8 \times 10^{-28} \times \frac{\kappa^2 \times Q_0 \times J}{n^4}$$

Folgende Faktoren sind hierbei von Bedeutung: die Quantenausbeute des Donor-Fluorophors (Q_0), der Brechungsindex des Mediums (n), das Integral der überlappenden Spektren von Donor-Fluorophor und Akzeptor-Fluorophor und der Dipolorientierungsfaktor κ. κ^2 beschreibt dabei die Orientierung der Fluorophore zueinander, wobei κ^2 Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Bei einem Wert von 0 findet kein Energietransfer statt, bei einem Wert von 4 ist der Energietransfer maximal. Die Orientierung in den von uns benutzen FRET-Messungen hängt von der

Insertionsstelle der markierten Proteine, der Orientierung der interagierenden Proteine zueinander und von den benutzten Fluorophoren selbst ab, ist somit eine Größe, die sich in den benutzen Assays nicht aktiv steuern lässt. Um die Übertragungseffizienz zu erhöhen, kann es sich somit rentieren, ein Fluorophor an einer anderen Stelle im Protein zu positionieren.

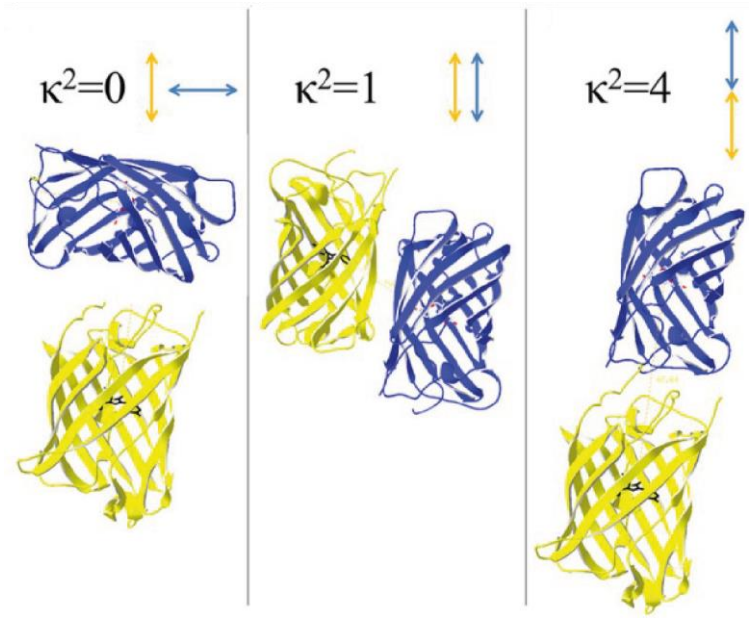

Abbildung 5.9 | Orientierung der Fluorophore zueinander entnommen aus (Müller et al., 2013)**:** Die Orientierung der Fluorophore zueinander bestimmt die Effizienz des Energietransfers. Wenn die Fluorophore im 90° Winkel zueinander stehen, ist kein Energietransfer möglich. Der maximale Energietransfer ist dann möglich, wenn die Dipole der Fluorophore übereinander stehen.

5.5.2 Mikroskop

Für alle FRET-Messungen in dieser Arbeit wurde ein invertiertes Mikroskop (Eclipse Ti; Nikon), ausgerüstet mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv (Nikon, Plan Apo VC 100X/1,40 Öl; ∞ /0,17 Dic N2) verwendet. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und an einzelnen Zellen oder kleinen Zellgruppen, welche nach Kriterien wie Expression der Fluorophore, Umspülbarkeit durch das Perfusionssystem und Haftung am Glasplättchen ausgewählt wurden. Zur Anregung der Fluorophore wurde eine Leuchtdiode (LED= *light-emitting diode*; pE-2; CoolLED) verwendet, wobei für die Anregung des Donors ein Anregungslicht der Wellenlänge 425 nm und für die Anregung des Akzeptors ein Anregungslicht der Wellenlänge 500 nm verwendet wurde. Beide Anregungslichter wurden auf eine Intensität von 2 % gestellt, wobei die Zellen pro Anregung in einem Intervall von 2 Hz durch die LEDs dem Anregungslicht in der Regel zwischen 60 und 100 ms ausgesetzt waren. Diese Zeit richtete sich nach der Helligkeit der Fluorophore. In das Mikroskop wurden mehrere Filter eingesetzt, um zu gewährleisten, dass immer nur eine gewünschte Wellenlänge emittiert wird beziehungsweise detektiert wird. Das Anregungslicht für den Donor (CFP und Derivate) wurde durch den Filter ET 430/24x (Chroma) gefiltert, das Anregungslicht für den Akzeptor (YFP und Derivate) durch den Filter ET 500/20x (Chroma). Zusätzlich wurde für Messungen ein Strahlenteiler verwendet (T455LP, Chroma). Zum Suchen geeigneter Zellen wurde ein CFP/YFP-Strahlenteiler (59017bs, Chroma), verwendet, der mit einem CFP/YFP Emissionsfilter ausgestattet wurde (59017m, Chroma). Auch die Emission beider Fluorophore wurde während der Messung in einem Optosplit II (Cairn Research) getrennt (z488/800-1064rpc) und gefiltert (CFP: ET 480/40; Chroma und YFP: HC 534/20; Semrock). Die bei der Messung eingesetzten Filter können in der folgenden Abbildung in Relation zu den Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorophore betrachtet werden.

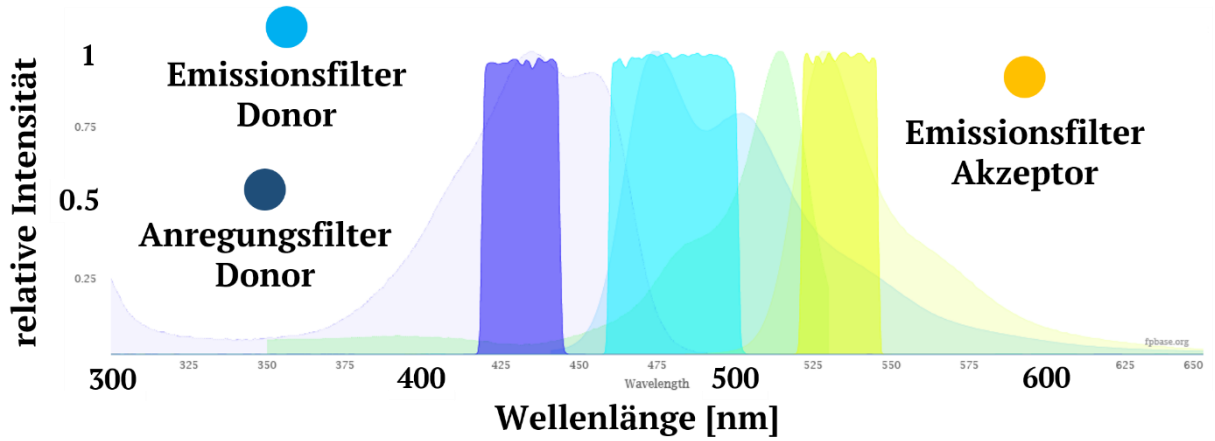

Abbildung 5.10 | Anregungs- und Emissionsfilter: Die gezeigten Daten wurden von https://www.fpbase.org/spectra/ exportiert (Lambert, 2019) und modifiziert. Gezeigt sind die Filterbereiche der bei Messungen eingesetzten Filter für das Anregungslicht und die Emissionen in Relation zu den Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorophore (durchsichtig).

Zur Detektion der Emissionen beider Fluorophore während der Messung, wurde eine sehr schnelle CCD (*charge-coupled device*) Kamera (Evolve512; Photometrics) verwendet. Die einzelnen Komponenten dieses Aufbaus aus Mikroskop, Kamera und Lichtquelle wurden an den PC angeschlossen und konnten von dort über die NIS-*Elements Advanced Research Software* von Nikon gesteuert werden. Die Synchronität von Kamera und Lichtquelle wurde durch die Triggerbox der Software gewährleistet. Während der Messung wurden die Emissionen von Donor und Akzeptor detektiert. Diese konnten zusammen mit der Ratio aus Donorfluoreszenz-Intensität und Akzeptorfluoreszenz-Intensität von der Software in hoher zeitlicher Auflösung dargestellt und gespeichert werden.

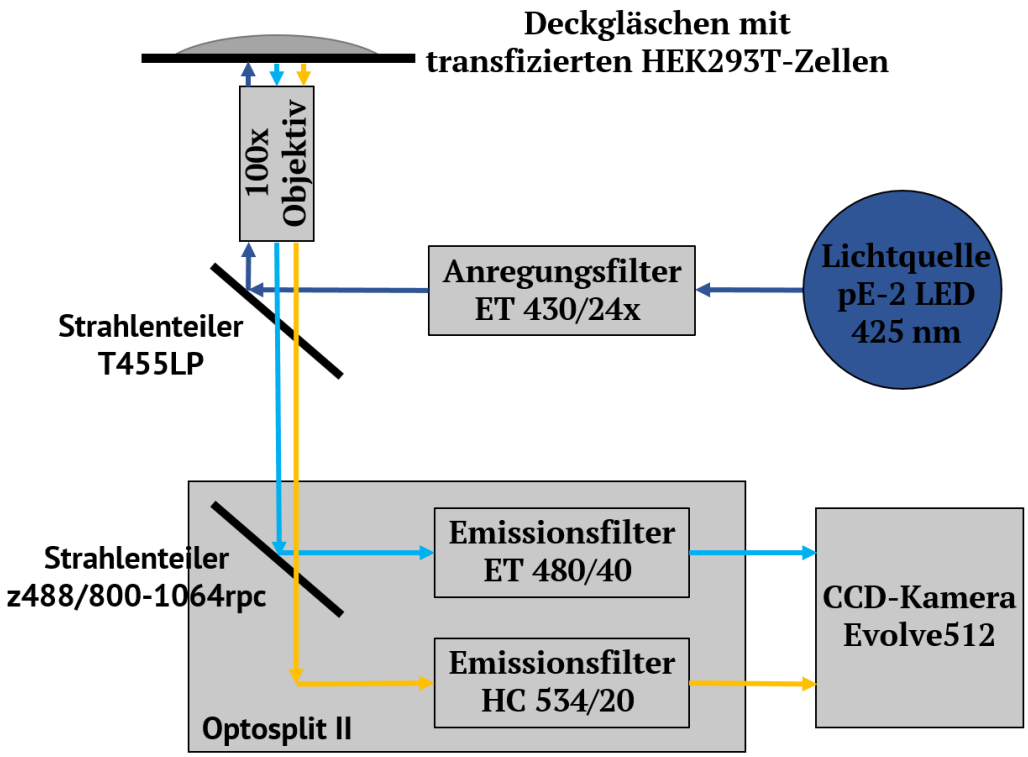

Abbildung 5.11 | Schematischer Aufbau des Mikroskops für FRET-Messungen

5.5.3 Durchbluten und Falschanregung

Wenn man sich die Spektren von Absorption und Emission des Fluorophor-Paares mTurquoise2-eYFP anschaut (siehe Abbildung 5.7), kann man erkennen, dass diese an mehreren Stellen überlappen. Dies ist im Falle von Donor-Emission und Akzeptor-Absorption gewollt und eine Voraussetzung für das Auftreten von FRET, führt jedoch auch zu zwei ungewollten Nebeneffekten: dem Durchbluten und der Falschanregung.

Durchbluten

Bei FRET-Messungen werden die Intensität der Donor- und Akzeptorfluoreszenz gemessen. Die Detektion der Emission des Akzeptors (YFP und Derivate) wird dabei durch einen Emissionsfilter (siehe 5.5.2) auf einen Wellenlängenbereich von 520 bis

546 nm limitiert. In diesem Bereich befindet sich jedoch ein großer Teil der Emission des Donors, sodass ungefähr 40 % der gemessenen Emission vom Donor und nicht vom Akzeptor stammen. Diese 40 % werden als Durchbluten bezeichnet und müssen beim Berechnen der Fluoreszenz berücksichtigt werden. Das Ausmaß des Durchblutens ist für verschiedene Fluorophor-Paare individuell.

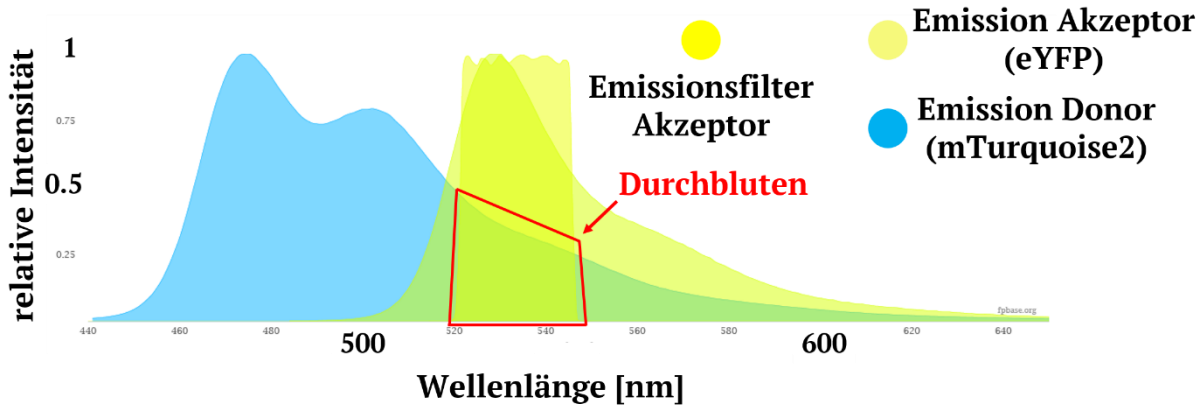

Abbildung 5.12 | Durchbluten Die gezeigten Daten wurden von https://www.fpbase.org/spectra/ exportiert (Lambert, 2019) und modifiziert. Gezeigt ist der Filterbereich des Emissionsfilters für den Akzeptor und die Emissionsspektren von Akzeptor und Donor.

Falschanregung

Der zweite Nebeneffekt ist die Falschanregung, die dadurch entsteht, dass sich im Bereich des Anregungslichtes (418 bis 445 nm) ein Teil des Absorptionsspektrums des Akzeptors befindet. Somit wird durch das Anregungslicht, welches eigentlich nur den Donor anregen soll, auch der Akzeptor zu einem geringen Maß angeregt, was wie das Durchbluten zu einem zu hoch gemessenen Wert der Akzeptor-Emission führt und deshalb auch berücksichtigt werden muss. Dabei werden die gemessenen Werte von Durchbluten und Falschanregung von der Gesamtemission des Akzeptors abgezogen.

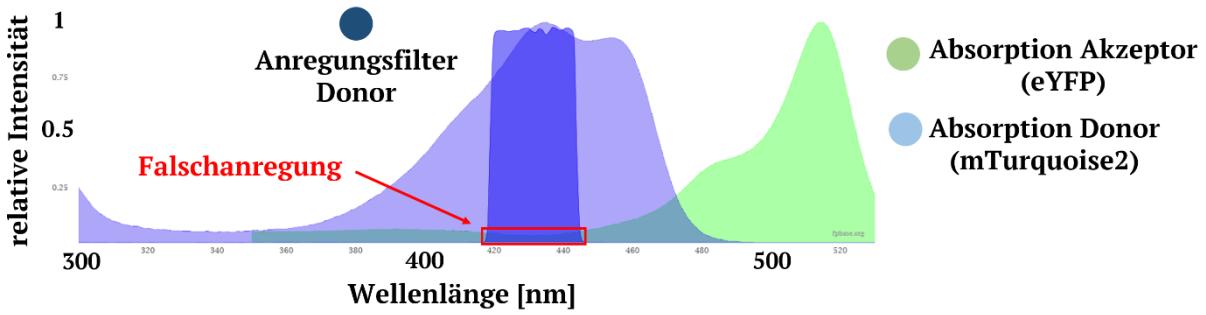

Abbildung 5.13 | Falschanregung Die gezeigten Daten wurden von https://www.fpbase.org/spectra/ exportiert (Lambert, 2019) und modifiziert. Gezeigt sind der Filterbereich des Anregungsfilters und die Absorptionsspektren von Akzeptor und Donor.

5.5.4 Allgemeine Durchführung von FRET-Messungen

Die Vorbereitung für FRET-Messungen sah wie folgt aus: HEK293T-Zellen wurden so gesplittet, dass sie zwei Tage vor dem Messtag eine Konfluenz von 60-80 % hatten (siehe 5.1.1). Zwei Tage vor der Messung erfolgte die Transfektion, bei der die Zellen die Plasmide aufnahmen, welche die gewünschten, zu exprimierenden Proteine enthielten (siehe 5.1.2, 5.1.3 und 5.1.5). Nach einer Inkubationszeit von ungefähr 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen wie in 5.1.6 beschrieben auf mit PLL beschichtete Deckgläschen ausgesät.

Ansetzen der Puffer und Agonistlösungen

Während der FRET-Messungen konnten einzelne Zellen oder Zellgruppen mit Hilfe eines Perfusionssystems (VC3-8xP, ALA Scientific Instruments) mit Pufferlösungen oder Agonistlösungen umspült werden. Diese Lösungen wurden an jedem Messtag frisch angesetzt. Als Grundlage der Lösungen diente der Puffer für FRET-Messungen (siehe 4.9.2). Zusätzlich zu einem Eppendorfgefäß, welches 20 µl von in Ethanol gelöstem U-46619 in einer Konzentration von 2,5 mM enthielt (siehe 4.9.2), wurde ein

zweites Eppendorfgefäß mit 20 µl (ohne U-46619) Ethanol befüllt. In der für die Messung benötigten Menge Puffer für FRET-Messungen wurden 1 mg lipidfreies BSA (bovines Serumalbumin) pro ml Puffer gelöst. Dies war eine Vorsichtsmaßnahme, um zu verhindern, dass der lipidische Agonist U-46619 sich im Perfusionssystem anlagert und stattdessen an BSA bindet. Beide Eppendorfgefäße wurden mit dem BSA-haltigen Puffer für FRET-Messungen auf 1 ml aufgefüllt und gevortext. Aus beiden Eppendorfgefäßen wurden 200 µl entnommen und in jeweils 9,8 ml BSA-haltigem Puffer verdünnt. Die entstehende Agonistlösung mit einer Konzentration von 1 µM wurde erneut 1:10 verdünnt, sodass eine 100 nM Agonistlösung und eine Pufferlösung entstanden, welche dieselbe Menge Ethanol enthielten. Diese 100 nM reichten aus um in allen gemessenen Assays eine Maximalantwort auszulösen. Bei Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden weitere Verdünnungsreihen angesetzt.

Einstellen des Setups

Die entsprechenden Puffer- und Agonistlösungen wurden in das Perfusionssystem gefüllt und 2 ml durch einen Überdruck von 0,8 bar durch die Schläuche laufen lassen, sodass diese komplett mit der entsprechenden Lösung gefüllt waren. Nach der Steuerung des Perfusionssystems wurden das Mikroskop, die Lichtquelle, die Kamera und der PC angeschaltet. Die Software wurde 5.5.2 entsprechend eingestellt.

Ablauf der Messung und Zeitprotokoll

Die mit PLL beschichteten Deckgläschen, auf denen sich die transfizierten HEK293T-Zellen befanden, wurden in ein Attofluor *Cell Chamber* (eine Haltevorrichtung für Deckgläschen, bestehend aus zwei zu verschraubenden Metallteilen) gesetzt, mit Puffer für FRET-Messungen (siehe 4.9.2) gewaschen und erneut mit Puffer benetzt und anschließend auf den Objekttisch gesetzt. Das mit Immersionsöl benetzte 100x Objektiv wurde auf die entsprechende Zellebene eingestellt. Die Spitze des

druckgesteuerten Perfusionssystems wurde so eingestellt, dass die Zellen, die sich in der Mitte des Sichtfeldes befanden, kontinuierlich angespült werden konnten. Durch die Direktanregung von Donor- und Akzeptor-Fluorophor konnte die Transfektionseffizienz und Lokalisierung der markierten Proteine abgeschätzt werden. Zellen zum Messen wurden anhand der Kriterien relative Expression, Anspülbarkeit durch das Perfusionssystem und daran, wie fest die Zelle am Deckgläschen verankert war, gewählt. Wenn eine geeignete Zelle gefunden wurde, wurde diese in der Nikon NIS-*Elements Advanced Research Software* mit Hilfe der Kamera aufgenommen und fokussiert. Das Perfusionssystem wurde angeschaltet, sodass die Zelle mit einem Überdruck von 0,4 bar mit Pufferlösung überspült wurde. Sowohl die zu messende Zelle als auch der Hintergrund wurden mit ROIs (*region of interest*) belegt. Anschließend konnte die eigentliche Messung gestartet werden, bei der durch die Kamera die Emissionen von Donor und Akzeptor detektiert wurden. Der Quotient aus Donor-Fluoreszenz und Akzeptor-Fluoreszenz dient in dieser Arbeit als generelle Darstellungsart für Daten.

Mit Ausnahme der Konzentrations-Wirkungs-Kurven (siehe 5.5.7) betrug die Messzeit pro Zelle 18 Minuten, wobei zwei Mal zwei Minuten Agonist appliziert wurde, mit einer zehnminütigen Auswaschphase zwischen den Agonistapplikationen.

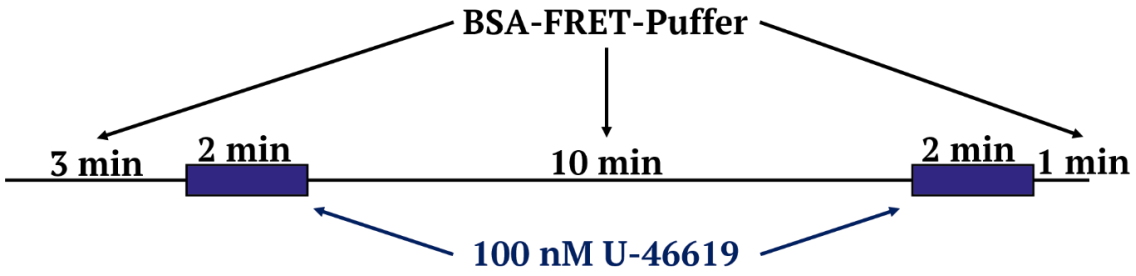

Abbildung 5.14 | Zeitprotokoll von FRET-Messungen

Baselinekorrektur und Normalisierung

Durch die Bestrahlung mit dem Anregungslicht können bei Fluorophoren irreversible Schäden auftreten. Dies führt dazu, dass diese ihre Fähigkeit zur Emission verlieren. Dadurch nimmt die gemessene Gesamtfluoreszenz mit der Zeit ab, was dazu führt, dass der *Trace* der Messung mit der Zeit „absinkt“ (siehe Abbildung 5.15). Dieses Phänomen bezeichnet man als Bleichen. Das Bleichen ist abhängig von der Art der Fluorophore, der Expression, der Stärke des Anregungslichts und der Länge der Anregung. Dabei kann die Stärke des Bleichens bei FRET-Messungen von starkem Bleichen bis hin zu subjektiv keinem Bleichen reichen.

Da Bleicheffekte für die Auswertung der Messungen nicht miteinbezogen werden sollten, wurde versucht, den Bleicheffekt so gut wie möglich zu negieren. Dies geschah dadurch, dass man sich eine virtuelle Linie (*Baseline*) durch den Graphen legt und zwei oder mehrere Werte auf diese Linie legt, bei denen man sich ihrer Werte sicher ist. Im Normalfall wären dies die Grundwerte vor der ersten Agonistapplikation und nach dem Auswaschen der letzten Agonistapplikation. Dies ist jedoch nur möglich wenn der *Trace* nach Agonistapplikation schnell wieder zu Baseline zurückkehrt (schnelle Off-Kinetik). Da die Off-Kinetik in den in dieser Arbeit verwendeten *Assays* sehr langsam war, wurden stattdessen die Amplituden der Agonistapplikationen (die jeweils eine 100 % Antwort auslösten) als Fixpunkte für die Baselinekorrektur genommen. Die Baselinekorrektur wurde mit der Software OriginPro 2018 (Originlab) durchgeführt.

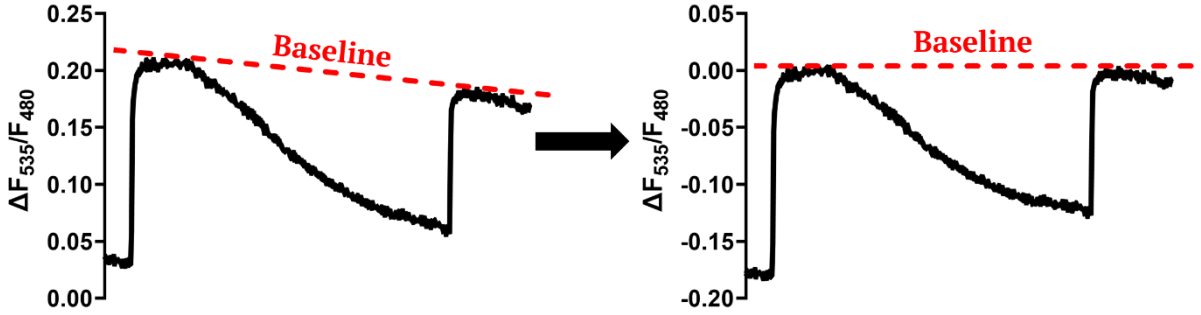

Abbildung 5.15 | Baselinekorrektur Für die Baselinekorrektur wurden die *Peaks* der Agonistapplikationen als Fixpunkte genommen, da diese eine Maximalantwort auslösten.

Zusätzlich wurde in allen Fällen, in denen es angebracht war, eine Normalisierung vorgenommen. Dabei wurde der niedrigste Wert des *Traces* auf 0 gesetzt und der höchste auf 1. Dies erlaubte es, einen Mittelwert aus den Einzelmessungen zu bilden, was wiederum der Vergleichbarkeit bei Messungen mit unterschiedlichen Konstrukten diente. Auch die Normalisierung wurde mit OriginPro 2018 durchgeführt.

5.5.5 $G\alpha_{13}$-RhoGEF-Interaktionsassay

Wie der Name schon sagt, wurden bei diesem Assay die Interaktionen zwischen $G\alpha_{13}$ und den RH-RhoGEFs gemessen. Dabei wurde $G\alpha_{13}$ mit dem Donor-Fluorophor mTurquoise2 (ein CFP-Derivat) markiert und die RH-RhoGEFs mit eYFP (Transfektionsprotokoll siehe 5.1.5). Die bei der Aktivierung des TPα-R entstandene Konformationsänderung durch den Agonist U-46619, wird dabei an $G\alpha_{13}$ weitergeleitet, wodurch dieses GDP freigibt und GTP bindet. Die Bindung von GTP führt zur Aktivierung von $G\alpha_{13}$, welches wiederum RH-RhoGEFs aus dem Cytosol rekrutiert und diese an der Zellmembran bindet. Dadurch kommen die beiden Fluorophore in räumliche Nähe, was FRET ermöglicht.

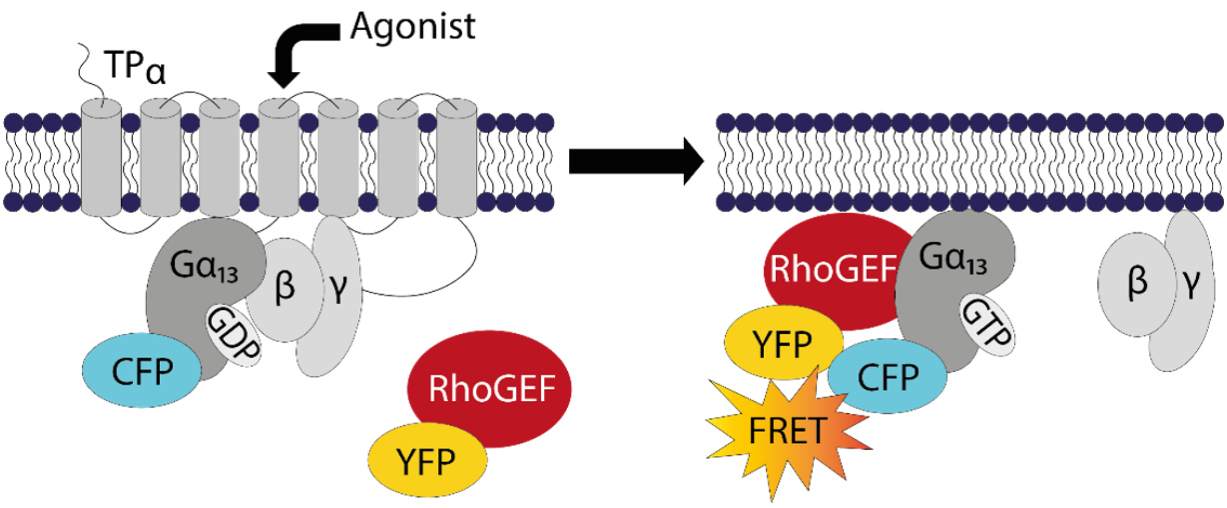

Abbildung 5.16 | Gα$_{13}$-RhoGEF-Interaktionsassay

5.5.6 Gβγ-RhoGEF-Interaktionsassay

Bei diesem Assay wurden entweder die Gβ- oder die Gγ-Untereinheit mit einem CFP-Derivat markiert und mit verschiedenen YFP-markierten RhoGEF-Varianten gemessen. Auch bei diesem Assay würde es durch eine räumliche Nähe zu einem FRET-Anstieg kommen. Weitere Ausführungen hierzu im Ergebnisteil (6.2).

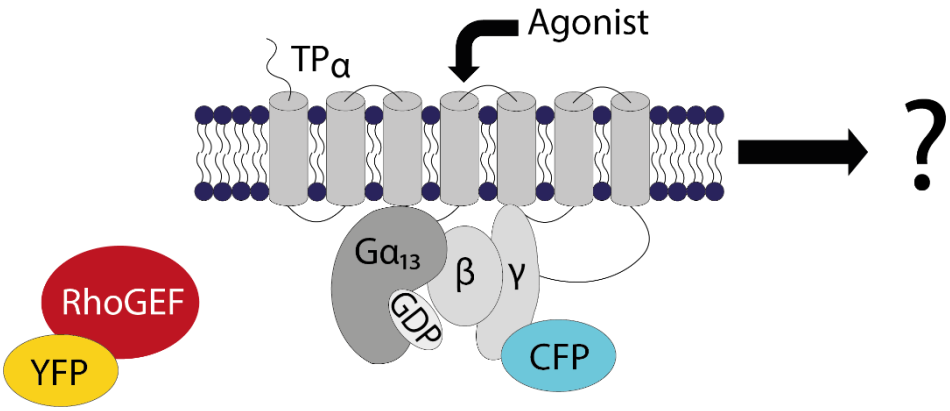

Abbildung 5.17 | Gβγ-RhoGEF-Interaktionsassay

5.5.7 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Beim Messen von Konzentration-Wirkungs-Kurven gab es einige Abweichung von dem in 5.5.4 beschriebenen Ablauf. Ausgehend von der 100 nM Agonistlösung erfolgten weitere Verdünnungen. Bei 1:10 Verdünnungen wurde 1 ml aus der höheren Konzentration entnommen und auf 10 ml mit BSA-haltigem Puffer für FRET-Messungen aufgefüllt. Bei 7:3, 1:2 und 3:7 Verdünnungen wurden entsprechend 7 ml, 5 ml oder 3 ml der höheren Verdünnung auf 10 ml aufgefüllt. Zusätzlich wurde bei Konzentrations-Wirkungs-Kurven nicht mit dem Standard-Zeitprotokoll gemessen. Beginnend mit der kleinsten Konzentration wurde die Zelle so lange mit der entsprechenden Agonistlösung stimuliert, bis sich ein Plateau bildete (keine Zu- oder Abnahme der $\Delta_{535}/\Delta_{480}$-Ratios). Als letzte Agonistlösung wurde immer 100 nM U-46619 verwendet, da diese Konzentration eine Maximalantwort auslöste, welche zur Normalisierung verwendet wurde. Mit Graph-Pad Prism wurde mit den resultierenden Werten eine Kurve mit variabler Steigung gefittet, wobei die Werte zwischen 0 und 1 fixiert wurden.

5.5.8 G-Protein-Aktivierungsassay

Zur Messung des G-Protein-Aktivierungsassays wurde $G\alpha_{13}$ mit einem CFP-Derivat markiert, während Gγ mit einem YFP-Derivat markiert wurde. Dadurch sind beide Fluorophore initial relativ nah beieinander, wodurch das initiale $\Delta_{535}/\Delta_{480}$-Signal relativ hoch ist, da hier bereits FRET stattfindet. Durch die Agonistapplikation kommt es zur Aktivierung des Rezeptors und somit auch zur Aktivierung des G-Proteins. Im Normalfall trennt sich die Gα Untereinheit während der Aktivierung von der Gβγ-Untereinheit. Hierbei würde die $\Delta_{535}/\Delta_{480}$-Ratio abnehmen, da der Abstand zwischen den Fluorophoren steigt. Es wurde jedoch schon gezeigt, dass sich Gα- und Gβγ-Untereinheiten nicht immer trennen. In diesem Fall könnte es durch Neuorientierung der Fluorophore zueinander sowohl zu einer Steigerung als auch zu einer Abnahme

der $\Delta_{535}/\Delta_{480}$-Ratio kommen, somit stellt die Abnahme der $\Delta_{535}/\Delta_{480}$-Ratio beim G-Protein-Aktivierungsassay keinen Beweis für die Trennung der Untereinheiten dar.

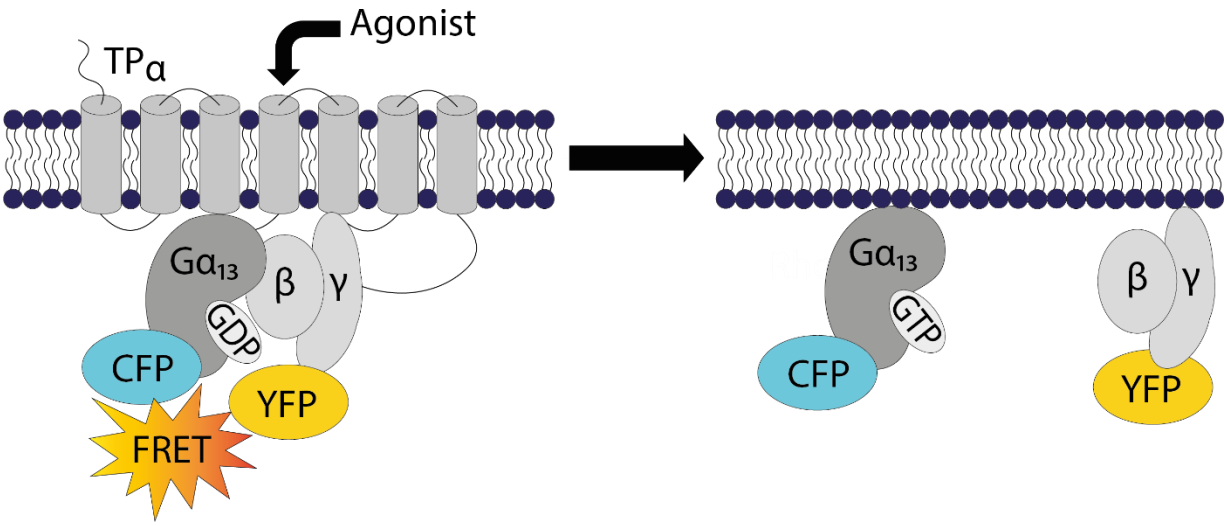

Abbildung 5.18 | G-Protein Aktivierungsassay

5.6 BRET-Experimente

BRET (Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer) bezeichnet wie FRET eine strahlungsfreie Energieübertragung von einem Donor-Fluorophor zu einem Akzeptor-Fluorophor. Die in 5.5.1 beschriebenen Grundlagen und Voraussetzungen gelten somit auch für BRET Experimente. Der Unterschied zwischen BRET und FRET ist jedoch, dass bei BRET als Donor-Fluorophor eine Biolumineszenzquelle (verschiedene Luciferasen) verwendet wird. Ein Vorteil gegenüber FRET ist, dass das Donor-Fluorophor nicht durch Licht angeregt werden muss, somit kommt es auch nicht zum Bleichen der Fluorophore. Nachteilig ist, dass Luciferasen ein Substrat umsetzen müssen um Biolumineszenz zu erzeugen. Dieses muss vor der Messung entsprechend hinzugegeben werden.

5.6.1 BRET-Assay

Einige Konzentrations-Wirkungs-Kurven in dieser Arbeit wurden mit Hilfe von BRET in einem 96-well Mikroplatten-Format im Tecan Spark 20M *Multimode Microplate Reader* gemessen. Der experimentelle Aufbau und Ablauf wurde bereits beschrieben (Flöser et al., 2021). Zwei Tage vor der Messung wurden die Zellen mittels PEI transfiziert (siehe 5.1.4). Für die erste Applikation wurden steigende Agonistkonzentrationen verwendet, welche durch die zweite Applikation einer Konzentration, welche einen maximalen Effekt auslöste, normalisiert werden konnte. Um BRET zu ermöglichen, wurde das Fluorophor mTurq2 in den Konstrukten $G\alpha_{13}$(127) und $G\alpha_{13}$(135) für NLuc (Nanoluciferase) ersetzt.

5.7 Dual-Luciferase Assay-System

Das Dual-Luciferase Assay-System von Promega wurde in dieser Arbeit als „*SRF Reporter Assay*“ verwendet. Es wurde somit getestet, in welchem Ausmaß die Transfektion eines bestimmten Konstruktes den $G\alpha_{13}$-RhoGEF-RhoA-Signalweg aktiviert und somit zu welchem Ausmaß es zur Expression von SRF (*serum response factor*) -einem der Endpunkte des $G\alpha_{13}$-RhoGEF-RhoA-Signalweges- kam.

Dafür wurden HEK293T-Zellen zwei Tage vor den eigentlichen Messungen mittels PEI transfiziert (siehe 5.1.4). Die Zellen wurden so transfiziert, dass jedes zu messende *well* einer 96-well Platte folgende Mengen an Plasmid enthielten: 180 ng pSRE.L, 28,3 ng pRL.TK und 83.3 ng des zu testenden Konstruktes (YFP-p115, YFP-LARG, YFP-p115-R, Chimera1, Chimera5 und pcDNA3). Die Transfektion führt zu einer konstitutiven Expression der Renilla-Luciferase (pRL.TK), die Expression der Firefly-Luciferase ist jedoch abhängig von der SRF-Expression, somit der Aktivierung des $G\alpha_{13}$-RhoGEF-RhoA Signalweges.

Zwei Tage nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen ohne vorherige Stimulation durch Agonist gemäß der Herstelleranleitung behandelt und in einem 96-*well* Platten-Format mit Hilfe des Plattenlesers Tecan Spark 20M gemessen. Nach der jeweiligen Zugabe der Substrate wurden die Fluoreszenzintensitäten beider Luciferasen gemessen. Durch die konstitutive Expression der Renilla-Luciferase konnte die Intensität der Firefly-Luciferase (somit der SRF-Expression) in Relation gesetzt werden, was den erhaltenen Messwert unabhängig von der Anzahl der Zellen im *well* macht. Die Intensität der Messung der Firefly-Luciferase wurde durch die Intensität der Messung der Renilla-Luciferase geteilt, um die in der Messung zur Quantifizierung angegebene relative Luciferase-Aktivität zu erhalten.

5.8 Konfokalmikroskopie

Bei einem Konfokalmikroskop handelt es sich um ein Lichtmikroskop, bei dem im Gegensatz zu normalen Lichtmikroskopen nicht die komplette Zelle fokussiert wird, sondern nur einzelne „Schnitte“ (*z-stacks*) der Z-Ebene der Probe. Dadurch, dass in diesem fluoreszenzmikroskopischem Fall nur Strukturen einer bestimmten Ebene angeregt und angeschaut werden, können störende Hintergrundfluoreszenzen ausgeblendet werden, wodurch sehr hochauflösenden Bildern aufgenommen werden können. Die Detektion der scharfgestellten Ebene und die Ausblendung der anderen Ebenen erfolgt durch eine Lochblende.

In dieser Arbeit wurde die Konfokalmikroskopie dazu verwendet, die Lokalisation einzelner markierter Proteine in der Zelle in Form hochauflösender Bilder darzustellen. Konfokal aufgenommene Bilder wurden mit dem invertierten Fluoreszenzmikroskop TCS SP5 (Leica, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen. Die Datengewinnung wurde zuvor beschrieben (Bodmann et al., 2017).

5.9 Statistik

Alle Daten (außer entsprechend gekennzeichnete) wurden mit mindestens drei unabhängigen Transfektionen gemessen. Die Anzahl der gemessen Zellen (n) ist den jeweiligen Assays im Ergebnisteil zu entnehmen. Sofern nicht anders angegeben, sind in den Abbildungen Mittelwerte zu sehen. Fehlerbalken sind als Standardfehler SEM (*Standard error of the mean*) angegeben. Eine Korrektur der Baseline fand für jede Zelle statt. Ob eine Normalisierung vorgenommen wurde, lässt sich an der Y-Achse ablesen. Statistiken wurden mit GraphPad Prism berechnet. Beim Vergleichen zweier Datenreihen wurde ein einseitiger t-Test verwendet. Bei mehreren Datenreihen wurde eine einfache ANOVA (*Analysis of variance*) mit nachfolgendem Post-Hoc-Test durchgeführt. Die im Einzelnen durchgeführten Tests sind jeweils angegeben, wenn statistische Daten dargestellt werden. Folgende p-Werte (Signifikanzwerte) wurden in dieser Arbeit verwendet: *=P<0,05; **=P<0,01; ***=P<0,001.

Kapitel 6: Ergebnisse

6.1 $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Interaktion

Das initiale Ziel dieser Arbeit war die Darstellung der Interaktion zwischen $G\alpha_{13}$ und den RH-RhoGEFs p115-RhoGEF, LARG und PDZ. Um diese Interaktion in einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung beobachten zu können, wurde ein auf Förster-Resonanzenergietransfer (FRET, siehe 5.5.1)-basierender Assay verwendet.

6.1.1 Interaktionsassay

In Vorarbeiten der AG Bünemann wurde das (blaue) Donor-Fluorophor mTurq2 (mTurquoise2) bei der $G\alpha_{13}$-Untereinheit zwischen den Aminosäuren 127 und 128 eingefügt (Bodmann et al., 2017). An den RH-RhoGEFs wurde N-terminal das als Akzeptor dienende (gelbe) Fluorophor eYFP angehängt.

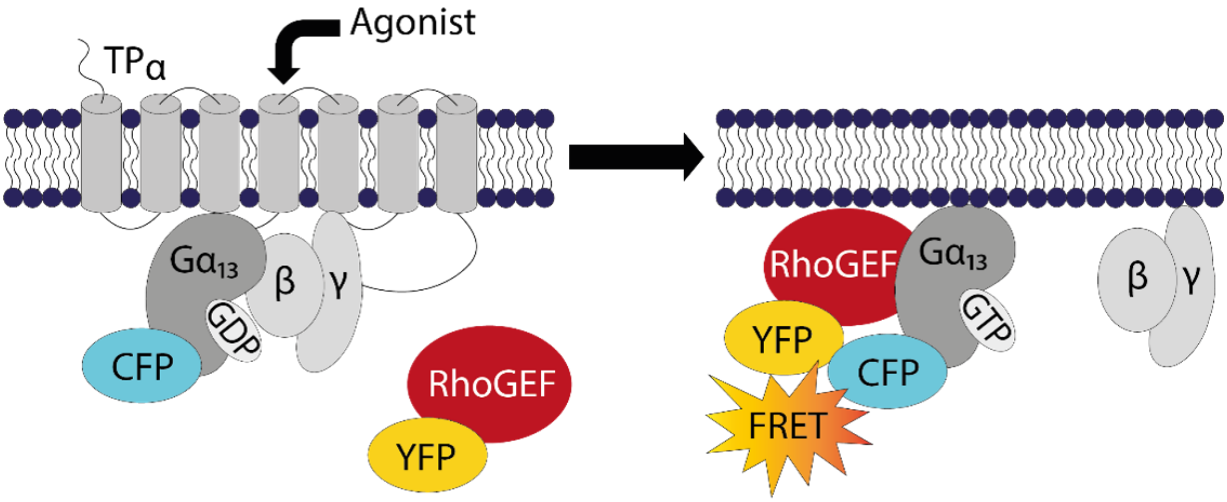

Abbildung 6.1 | $G\alpha_{13}$-RhoGEF-Interaktionsassay Schematische Darstellung der Interaktion von $G\alpha_{13}$ und den RH-RhoGEFs in transfizierten HEK293T-Zellen.

Die Bindung des in dieser Arbeit verwendeten TP_{α}-Rezeptors (Thromboxan A2-Rezeptor) durch den Agonist U-46619 (stabiles Analogon von Postaglandin H_2) führt zu einer Aktivierung und somit Konformationsänderung des Rezeptors. Diese Konformationsänderung kann durch die von der cytosolischen Seite bindende $G\alpha_{13}$-Untereinheit erkannt werden. Durch Bindung an den aktivierten Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung der Gα-Untereinheit, die zur Freigabe des in der inaktiven Form gebundenen GDP (Guanosindiphosphat) führt und der nachfolgenden Bindung von GTP (Guanosintriphosphat), was zur Aktivierung des G-Proteins führt (siehe 3.1.6). Aktive $G\alpha_{13}$-Untereinheiten binden und aktivieren RH-RhoGEFs, wodurch diese an die Zellmembran rekrutiert werden. Dies führt dazu, dass $G\alpha_{13}$ und RH-RhoGEFs in räumliche Nähe kommen (Abbildung 6.1), was einen Energietransfer (FRET) zwischen den integrierten Fluorophoren bei Donoranregung möglich macht. Dies führt zu einer Abnahme der Fluoreszenz-Intensität des Donor-Fluorophors und zu einer Zunahme der Fluoreszenz-Intensität des Akzeptor-Fluorophors. Durch das Dividieren der Fluoreszenz-Intensität des Akzeptor-Fluorophors (Emission gemessen bei 535 nm) durch die Fluoreszenz-Intensität des Donor-Fluorophors (Emission gemessen bei 480 nm, siehe 5.5.2) erhält man die $\Delta F_{535}/F_{480}$-Ratio, welches in dieser Arbeit zur Darstellung von FRET-Interaktionen verwendet wurde. Eine Erhöhung dieser Ratio lässt sich in eine höhere Energieübertragung zwischen den Fluorophoren und somit bedingt in einen geringeren Abstand zwischen den Fluorophoren übersetzen. Analog dazu die Erniedrigung der Ratio in eine geringere Energieübertragung und bedingt in einen höheren Abstand.

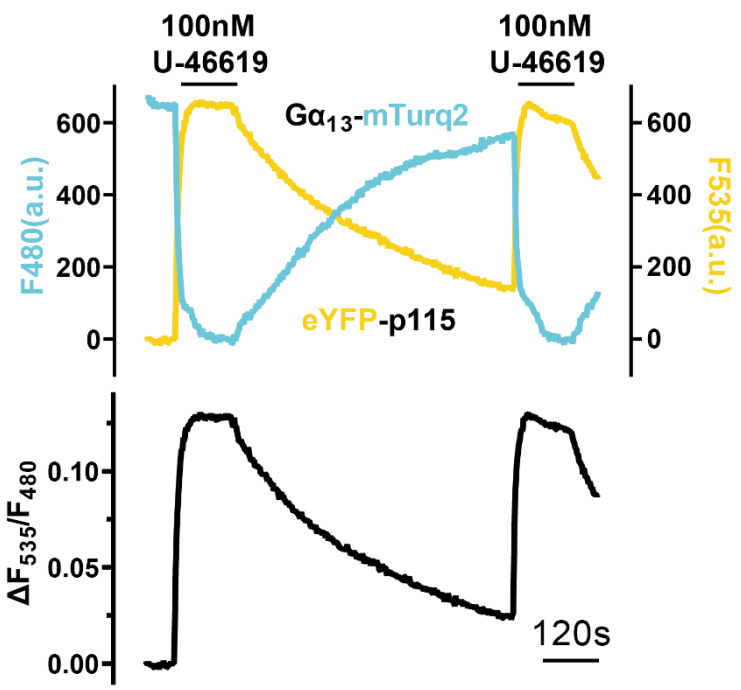

Abbildung 6.2 | Gegenläufige Fluoreszenz-Intensität und $\Delta F_{535}/F_{480}$-Ratio Mikroskopische FRET-Messung der Interaktion zwischen $G\alpha_{13}$-mTurq2 (blau) und eYFP-p115 (gelb) einer Einzelzelle. Bei Anregung des mTurq2 bei 425 nm durch eine LED wurde die Fluoreszenz des Donors bei 480 nm und die Fluoreszenz des Akzeptors bei 535 nm aufgezeichnet. Als Antwort auf die laminare Überspülung der Zelle mit Agonist (100 nM U-46619, Dauer der Superfusion mit schwarzem Balken angezeigt) mittels druckluftgesteuertem Perfusionssystem kommt es zur Aktivierung von $G\alpha_{13}$, welches p115 (oder ein anderes RhoGEF) bindet. Dadurch kommen Donor-Fluorophor mTurq2 (blau) und Akzeptor-Fluorophor eYFP (gelb) in räumliche Nähe, was FRET ermöglicht. Dies spiegelt sich in der Abnahme der Fluoreszenz-Intensität des Donors und der Zunahme der Fluoreszenz-Intensität des Akzeptors bei Agonistapplikation wider. Deren gemessene Fluoreszenz-Intensität ist durch die Agonistapplikation somit gegenläufig. Die $\Delta F_{535}/F_{480}$-Ratio, welche durch das Dividieren dieser *Einzeltraces* (Fluoreszenz-Intensität des Akzeptor-Fluorophors durch die Fluoreszenz-Intensität des Donor-Fluorophors) erhalten wird, kann über den Zeitverlauf der Messung dargestellt werden (schwarzer *Trace*) und dient in dieser Arbeit als Darstellungsmethode der entsprechenden Interaktionen. Die Details dieser Messung sind in 5.5.4 und 5.5.5 beschrieben.|

Wie bereits beschrieben führt die Aktivierung der RH-RhoGEFs zu einer Rekrutierung an die Membran. Diese kann auch visualisiert werden und dient als weiterer Beweis für die Funktionalität des Assays (Abbildung 6.3). Die Applikation von Agonist führte zu einer Erhöhung von $(YFP)^2$/CFP an der Zellmembran, die somit eine höhere FRET-Intensität zeigt. Dies geschieht durch die Rekrutierung von YFP-p115 zur Zellmembran.

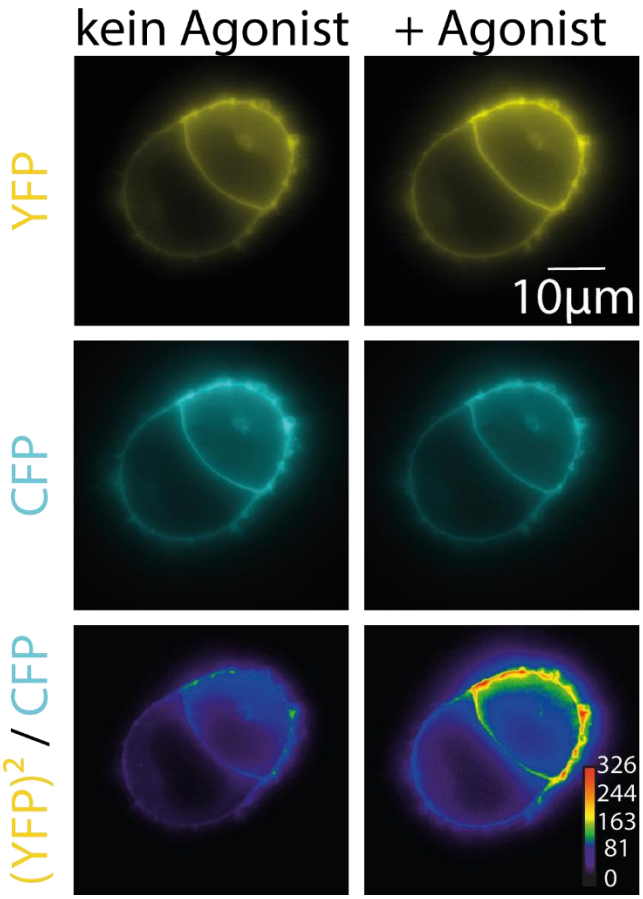

Abbildung 6.3 | FRET-Visualisierung zwischen $G\alpha_{13}$-mTurq2 (blau) und eYFP-p115 (gelb) in transfizierten HEK293T-Zellen. Die linke Seite zeigt das Epifluoreszenz-Bild einer Beispielzelle vor Agonistapplikation, die reichte Seite die gleiche Zelle nach Agonistapplikation von 100 nM U-46619. $(YFP)^2$/CFP zeigt die Veränderung der $\Delta F_{535}/F_{480}$-Ratio. Bilder aufgenommen von A. L. Krett.

Als weiterer Beweis, dass das erhaltene Signal eine spezifische Interaktion von $G\alpha_{13}$-Untereinheiten mit den RhoGEFs darstellt, wurde der Assay mit einem $G\alpha_i$ statt einem $G\alpha_{13}$ durchgeführt. Da aktives $G\alpha_i$ die RH-RhoGEFs nicht aktivieren kann und die beiden Proteine somit auch nicht in räumliche Nähe zueinander kommen, ist keine Energieübertrag zwischen den Fluorophoren möglich, was dazu führt, dass die $\Delta F_{535}/F_{480}$-Ratio bei Agonistapplikation unverändert bleibt. Dies konnte experimentell bestätigt werden (Abbildung 6.4).

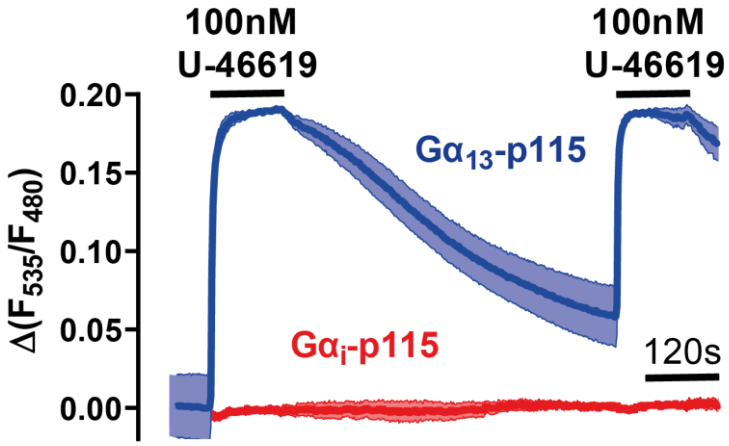

Abbildung 6.4 | Spezifische Interaktion zwischen $G\alpha_{13}$ und RhoGEFs; Gezeigt sind Mittelwert ± SEM der in Abbildung 6.2 beschriebene FRET-Messung von Einzelzellen der $G\alpha_{13}$-mTurq2/YFP-p115 Interaktion [blau, n = 8] und der $G\alpha_i$- mTurq2/YFP-p115 Interaktion [rot, n = 7].

Zur Auswertung der Interaktionskinetiken zwischen $G\alpha_{13}$ und den RH-RhoGEFs wurden die erhaltenen $\Delta F_{535}/F_{480}$-Ratios aus Einzelzellmessungen Basislinien-korrigiert (siehe 5.5.4) und normalisiert. Die erhaltenen *Traces* wurden übereinander gelegt, wobei in folgenden Graphen immer der Mittelwert ± SEM dargestellt sind. Um die resultierenden Interaktionskinetiken (Off-Kinetiken) quantitativ vergleichen zu können, wurde ein Zeitprotokoll verwendet, welches bereits in den Abbildungen 6.2 und 6.4 zu sehen ist. Nach einer Puffergabe von drei Minuten wurde zwei Mal für

jeweils 2 Minuten Agonist appliziert. Zwischen den beiden Agonistapplikationen befand sich eine Auswaschphase von 10 Minuten, in der die Zelle nur mit Pufferlösung angespült wurde. Durch dieses Zeitprotokoll war es möglich, die Zellen auf die *Peaks* der Agonistgaben zu korrigieren (die beide eine gleich große Antwort in der Zelle auslösen) und die Off-Kinetiken in der Auswaschphase zu vergleichen (siehe 5.5.4). Zur Quantifizierung wurde die AUC (*area under the curve*) verwendet. Die AUC wurde verwendet, da die Dissoziationskinetiken nicht einfach exponentiell waren, sondern teilweise einer biphasischen Kinetik zu folgen schienen. Somit stellte die AUC der Off-Kinetik ein geeignetes Mittel zu Quantifizierung der Dissoziationskinetik dar. Je höher der Wert dieser AUC war, desto langsamer war die Off-Kinetik und desto länger war die Interaktion zwischen den (mit den Fluorophoren) markierten Proteinen (Abbildung 6.5).

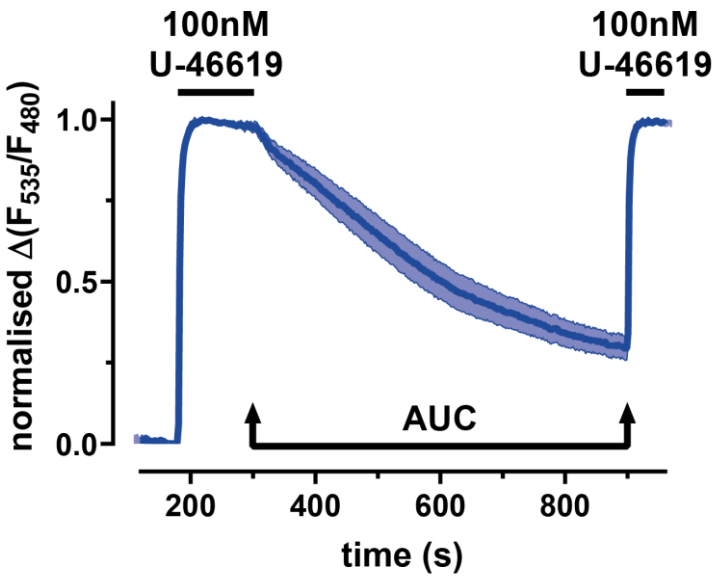

Abbildung 6.5 | Auswertung der Off-Kinetik Beispielhafte Darstellung der in Abbildung 6.2 beschriebenen Einzelzell-FRET-Messung der $G\alpha_{13}$-RhoGEF-Interaktion. Die Zelle wurde über die komplette Zeit der Messung mittels druckluftgesteuertem Perfusionssystem mit Pufferlösung (siehe Tabelle 4.11 – Puffer für FRET-Messungen) oder Agonistlösung (markierter Bereich) laminar umspült. Nach der Normalisierung (siehe 5.5.4) lässt sich die Dissoziationskinetik zwischen den beiden Agonistapplikationen über die *area under the curve* (AUC, markierter Bereich) quantifizieren. Diese wurde in weiterführenden Experimenten dieser Arbeit zum Vergleich der Kinetiken der $G\alpha_{13}$-RhoGEF Interaktionen verwendet.

6.1.2 $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Interaktionskinetiken

Als erstes Projekt sollte die Interaktion zwischen $G\alpha_{13}$ und den drei RH-RhoGEFs p115-RhoGEF, LARG und PDZ-RhoGEF untersucht werden. Dafür wurde der in 6.1.1 beschriebene Interaktionsassay verwendet und entsprechend ausgewertet.

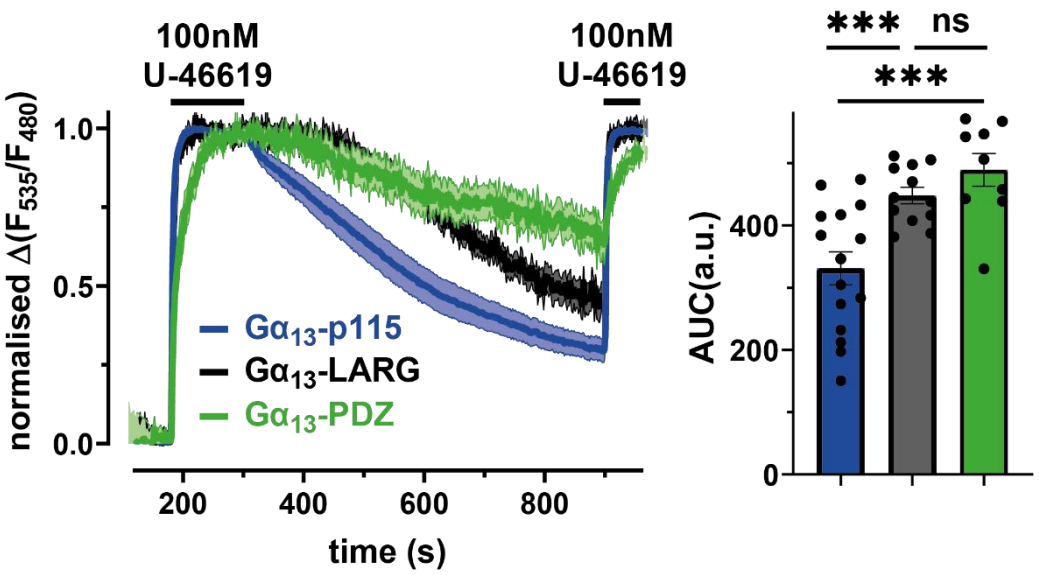

Abbildung 6.6 | $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Interaktionskinetiken Mittelwert ± SEM von Einzelzellmessungen des in Abbildung 6.2 und 6.5 beschriebenen FRET-Assays der $G\alpha_{13}$-p115 Interaktion [blau, n=15, AUC=331,1], der $G\alpha_{13}$-LARG Interaktion [schwarz, n=12, AUC=448,1] und der $G\alpha_{13}$-PDZ-RhoGEF Interaktion [grün, n=9, AUC=498,3]. Das Balkendiagramm auf der rechten Seite zeigt die Auswertung der in Abbildung 6.5 beschriebenen Quantifizierung der Dissoziationskinetik als AUC. [p115 (blau) vs. LARG (schwarz): ***P = 0,0008; p115 (blau) vs. PDZ-RhoGEF (grün): ***P = 0,0008; LARG (schwarz) vs. PDZ-RhoGEF (grün): ^{ns}P=0,3013; *Brown-Forsythe and Welch ANOVA test with Dunnett´s T3 multiple comparison test*].

Wie in Abbildung 6.6 zu sehen, hat die Interaktion zwischen $G\alpha_{13}$ und p115-RhoGEF eine signifikant kleinere AUC der Dissoziationskinetik als die Interaktion zwischen

$G\alpha_{13}$ und LARG und als die Interaktion zwischen $G\alpha_{13}$ und PDZ-RhoGEF. Eine kleinere AUC lässt sich übersetzen in eine schnellere Off-Kinetik in Abwesenheit von Agonist, was bedeutet, dass die Bindung zwischen $G\alpha_{13}$ und p115-RhoGEF signifikant kürzer ist als die Bindung von $G\alpha_{13}$ mit den anderen RH-RhoGEFs und der Bindungskomplex schneller zerfällt. Ein Grund hierfür könnte sein, dass $G\alpha_{13}$ in der Bindung mit p115-RhoGEF schneller deaktiviert wird als in der Bindung mit den anderen RH-RhoGEFs. Eine andere Möglichkeit ist, dass diese Interaktion noch durch andere Enzyme beeinflusst wird, welche die anderen Interaktionen nicht beeinflussen.

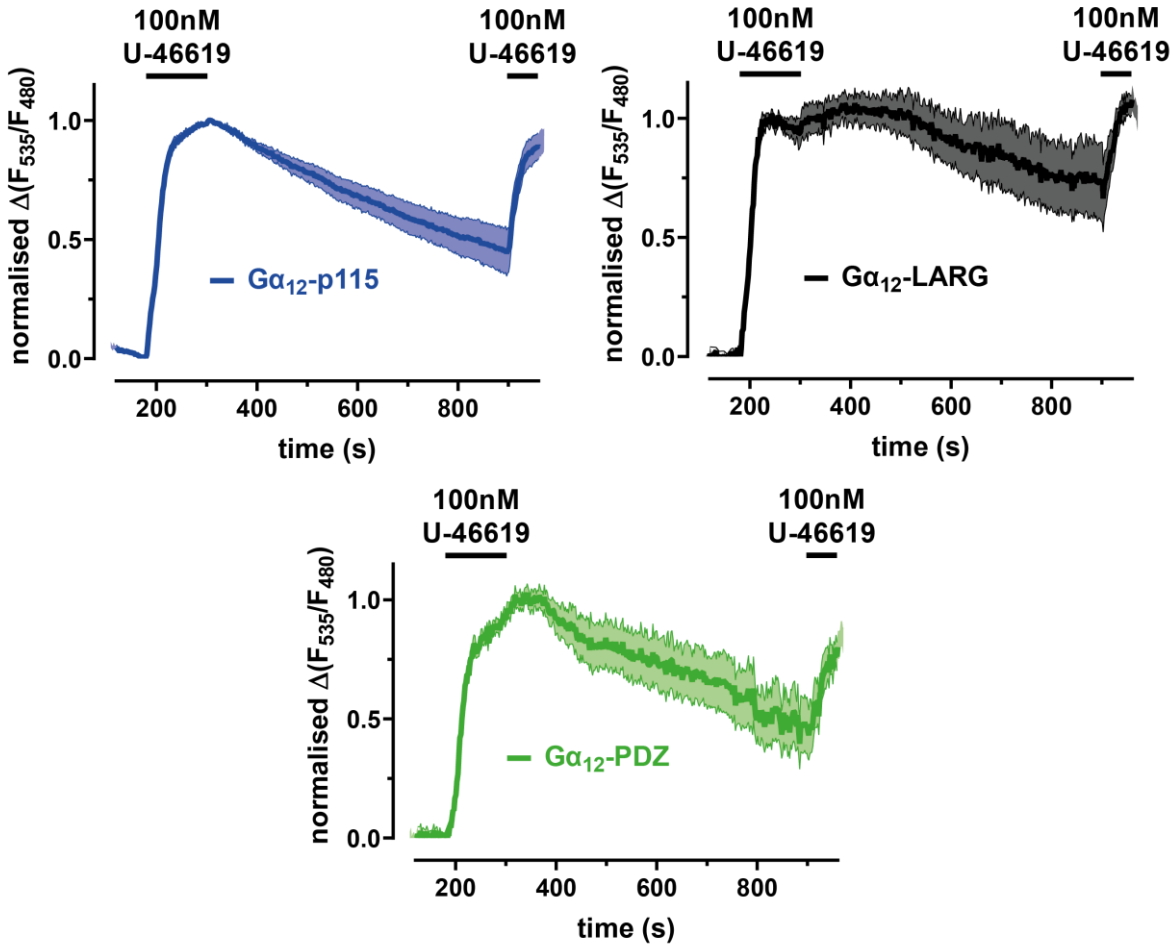

Abbildung 6.7 | $G\alpha_{12}$-RH-RhoGEF-Interaktion Mittelwert ± SEM von Einzelzellmessungen des in den Abbildungen 6.2 und 6.5 beschriebenen FRET-Assays der $G\alpha_{12}$-RH-RhoGEF-Interaktionen.|

Auch für $G\alpha_{12}$ konnte eine Interaktion mit allen drei RH-RhoGEFs in den auf FRET-Änderung basierenden Einzelzellmessungen gemessen werden. Auffällig gegenüber der Interaktion mit $G\alpha_{13}$ ist die langsame Komplexbildung (On-Kinetik).

6.1.3 $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Konzentration-Wirkungs-Kurven

Als nächstes sollte die Agonistsensitivität der $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Interaktionen untersucht werden. Dafür wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven der einzelnen Interaktionen erstellt. Dafür wurde die Antwort der Zellen auf Agonistgabe mit acht verschiedenen Konzentrationen gemessen (maximal sechs Konzentrationen pro Einzelzelle) und auf die Maximalantwort (bei 100 nM U-46619) normalisiert.

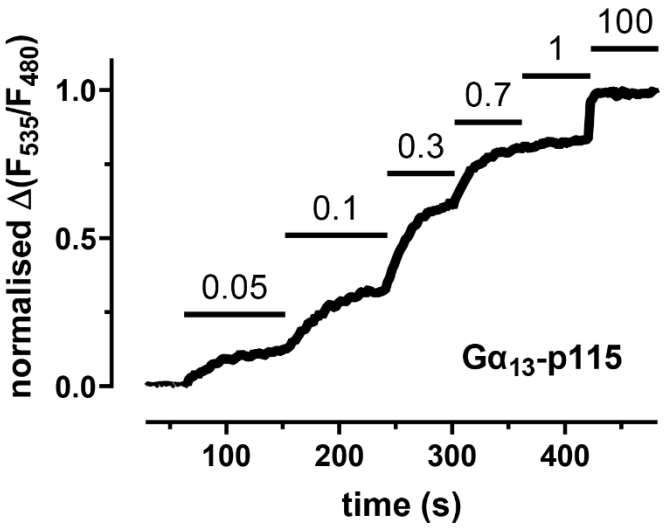

Abbildung 6.8 | Beispielmessung Konzentrations-Wirkungs-Kurve Beispielhafte Darstellung einer Einzelzell-FRET-Messung (siehe Abbildung 6.2), bei der die Zelle mit aufsteigenden Agonistkonzentrationen (0,05 nM bis 100 nM) mittels Perfusionssystem angespült wurde. Alle Messungen wurden auf 100 nM als Maximalkonzentration normalisiert.

Es wurde der Mittelwert der Antworten je Konzentration, relativ zur Maximalantwort der jeweiligen Zelle, gebildet. Die Kurve, die durch diese Datenpunkte gefittet wurde, ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der jeweiligen Interaktion.

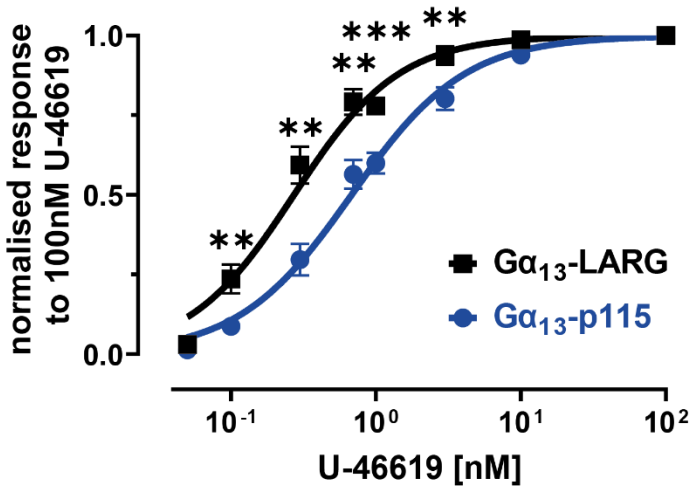

Abbildung 6.9 | Konzentrations-Wirkungs-Kurven $G\alpha_{13}$-p115/LARG Mittelwerte der nach Abbildung 6.8 gemessenen Zellen wurden zu Konzentrations-Wirkungs-Kurve gefittet: Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\alpha_{13}$-LARG-Interaktion [schwarz, EC_{50} = 0,27 nM] im Vergleich zur Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\alpha_{13}$-p115-Interaktion [blau, EC_{50} = 0,68 nM; jeweils 0,05 nM, 0,3 nM und 0,7 nM: n = 8; 3 nM und 10 nM: n = 10; 0,1 nM, 1 nM und 100 nM: n = 18]. Signifikante Unterschiede in der Agonistsensitivität wurden bei Konzentrationen von 0,1 nM bis 3 nM gefunden [*unpaired t-test with Welch´s correction*; 0,1 nM: **P = 0,0076; 0,3 nM: **P = 0,0016; 0,7 nM: **P = 0,0021; 1 nM: ***P = 0,0001; 3 nM: **P = 0,0089].

Beim Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven zeigt sich eine signifikante Linksverschiebung der $G\alpha_{13}$-LARG-Konzentrations-Wirkungs-Kurve gegenüber der $G\alpha_{13}$-p115-Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Das heißt, dass eine geringere Agonistkonzentration benötigt wird, um denselben Effekt zu erzielen (im Verhältnis zur Maximalantwort). Dies zeigt sich auch in den EC_{50}-Werten (die Konzentration, bei

der der halbmaximale Effekt erreicht wird), welcher mit 0,27 nM deutlich niedriger ist als der EC_{50}-Wert der $G\alpha_{13}$-p115-Interaktion von 0,68 nM.

Diese Ergebnisse, zusammen mit der Interaktionskinetik aus 6.1.2, suggerieren, dass die Interaktionszeit und die Agonistsensitivität wie folgt zusammenhängen: Je höher die Agonistsensitivität ist, desto langanhaltender ist die Interaktion in Abwesenheit von Agonist. Gegensätzlich zu dieser Hypothese zeigte sich bei Interaktion von $G\alpha_{13}$ und PDZ-RhoGEF keine Linksverschiebung im Vergleich zu p115 (Erklärungsansätze hierfür finden sich in 6.1.4). Des Weiteren ist die Kurve deutlich flacher, zeigt somit einen breiteren Konzentrationsbereich zwischen den Konzentrationen für einen minimalen und einen maximalen Effekt.

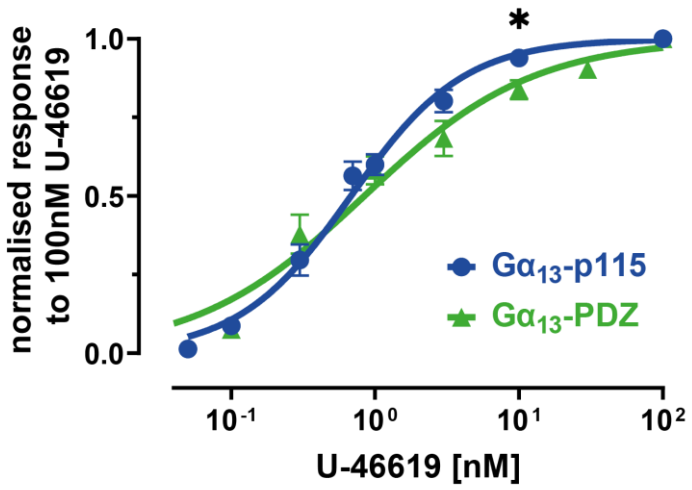

Abbildung 6.10 | Konzentrations-Wirkungs-Kurven $G\alpha_{13}$-p115/PDZ Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\alpha_{13}$-PDZ-RhoGEF-Interaktion [grün, n = 10 für alle Datenpunkte, EC_{50} 0,84 nM] mit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\alpha_{13}$-p115-RhoGEF-Interaktion [blau, Daten aus Abbildung 6.9] analog zu Abbildung 6.9. Der einzige signifikante Unterschied in der Agonistsensitivität findet sich bei 10 nM U-46619 [**P = 0,0087, *unpaired t-test*].

6.1.4 FRET zwischen PDZ-RhoGEF und $G\alpha_{13}$

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\alpha_{13}$-PDZ-RhoGEF-Interaktion zeigte im Vergleich zur Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\alpha_{13}$-p115-RhoGEF keine Linksverschiebung wie die Interaktion mit LARG es tat, obwohl PDZ-RhoGEF auch eine langsame Dissoziation von $G\alpha_{13}$ zeigte und ein Zusammenhang von Agonistsensitivität und Interaktionskinetik bei der $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Interaktion vorhanden sein sollte. Ein wichtiger Faktor in diesem Zusammenhang ist die deutlich langsamere On-Kinetik von $G\alpha_{13}$-PDZ im Vergleich zu den anderen RH-RhoGEFs, da die Agonistsensitivität vom Gleichgewicht der Komplexbildung (K_{on}) und der Komplexauflösung (K_{off}) abhängig ist.

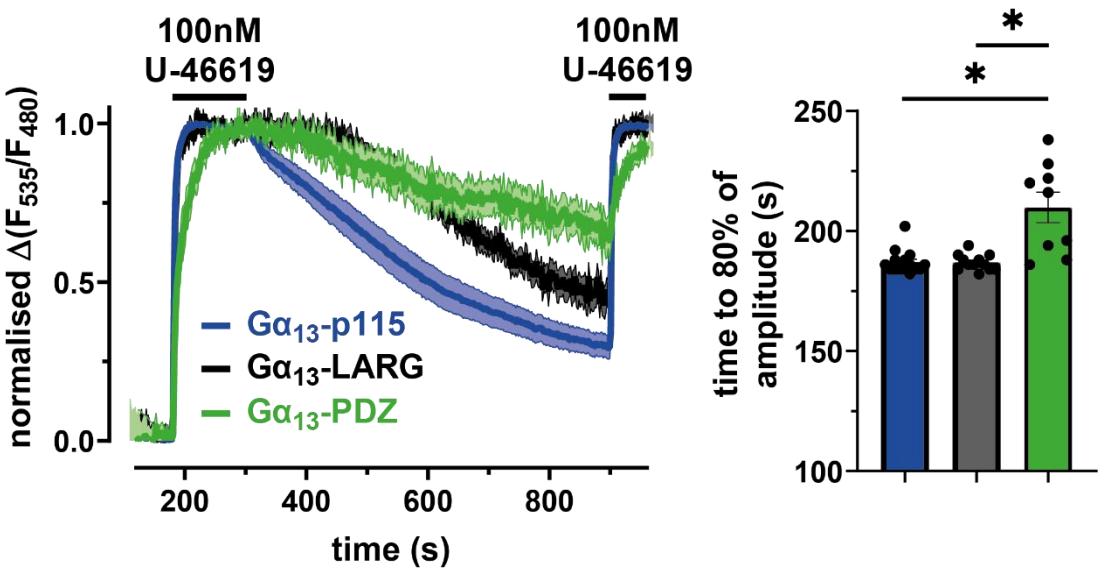

Abbildung 6.11 | Vergleich der On-Kinetik Vergleich der On-Kinetik von $G\alpha_{13}$ und PDZ [grün, 29,8 s; Daten aus Abbildung 6.6] mit $G\alpha_{13}$-p115 [blau, 6,9 s; *P=0,0121; Daten aus Abbildung 6.6] und $G\alpha_{13}$-LARG [schwarz, 6.9 s; *P=0,0119, *Brown-Forsythe and Welch ANOVA test with Dunnett´s T3 multiple comparison test*; Daten aus Abbildung 6.6]. Das Balkendiagramm zeigt, zu welchem Zeitpunkt der Messung im Durchschnitt 80 % der Maximalantwort erreicht wurden.

Eine mögliche Erklärung für die langsamere On-Kinetik ist, dass die Komplexformation zwischen $G\alpha_{13}$ und PDZ-RhoGEF langsamer ist als bei den anderen RH-RhoGEFs, was zu einer geringeren Agonistsensitivität im *steady-state* (Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Deaktivierung) führen würde.

Ein weiteres Problem mit der Messung der $G\alpha_{13}$-PDZ-RhoGEF-Interaktion sind die niedrigen Amplituden der FRET-Änderung, welche man bei der Messung erhält. Die Amplitude der $G\alpha_{13}$-PDZ-RhoGEF Interaktion war zehnmal kleiner als die der $G\alpha_{13}$-p115 Interaktion und 2,4-mal kleiner als die der $G\alpha_{13}$-LARG-Interaktion (Abbildung 6.12). Diese erschwerten ein genaues Auswerten der *Traces*. Das geringe Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*) erschwert dabei vor allem die Auswertung nicht-maximaler Signale, wie man sie beispielsweise bei Konzentrations-Wirkungs-Kurven misst, wodurch diese verfälscht werden können.

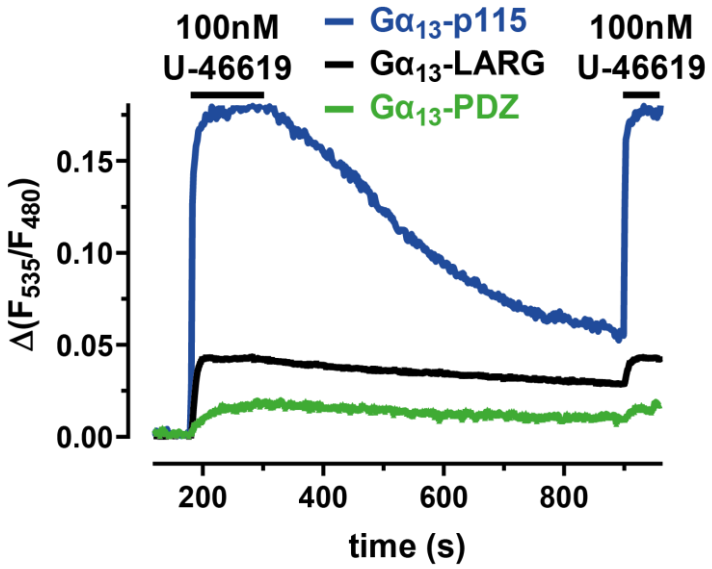

Abbildung 6.12 | Vergleich der Signalamplituden Repräsentative *Traces* der $G\alpha_{13}$-PDZ [grün, Amplitude: 0,018], der $G\alpha_{13}$-p115 [blau, Amplitude: 0,18] und der $G\alpha_{13}$-LARG [schwarz, Amplitude: 0,043] Interaktionen des in Abbildung 6.2 beschriebenen Assays.

Aufgrund der langsamen On-Kinetik und der relativ schweren Messbarkeit der $G\alpha_{13}$-PDZ-RhoGEF-Interaktion wurden in den folgenden Experimenten die Unterschiede in der Interaktionen von $G\alpha_{13}$ mit p115 und LARG in den Fokus genommen.

6.1.5 Trunkierte p115- und LARG-Konstrukte in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$

Um die strukturelle Ursache für die Unterschiede in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$ zu untersuchen, wurden trunkierte Konstrukte von p115 und LARG erstellt. Für die Erstellung dieser Konstrukte wurde das *Gibson Assembly* verwendet (siehe 5.3.3), wobei die Sequenz des trunkierten Konstruktes als Fragment ausgeschnitten und in einen leeren Vektor gesetzt wurde (Primersequenzen für Klonierungen befinden sich in 4.7).

Als Erstes wurden p115 und LARG jeweils am C-terminalen Ende gekürzt, um den Einfluss des C-Terminus auf die Interaktion mit $G\alpha_{13}$ zu untersuchen. Dabei wurde bei dem entstandenen p115-Konstrukt p115-R (enthält die **R**H-Domäne) nach Aminosäure 245 gekürzt und beim entstandenen LARG-Konstrukt LARG-PR (enthält die **P**DZ-Domäne und die **R**H-Domäne) nach Aminosäure 558 gekürzt. Beide Konstrukte zeigten keine signifikante Änderung in der Interaktionskinetik im Vergleich zu den fl-Konstrukten (*full length*= komplette Länge). Dies suggerierte, dass die C-Termini der RH-RhoGEFs für die Interaktion mit $G\alpha_{13}$ nicht von zentraler Bedeutung sind (Abbildung 6.13).

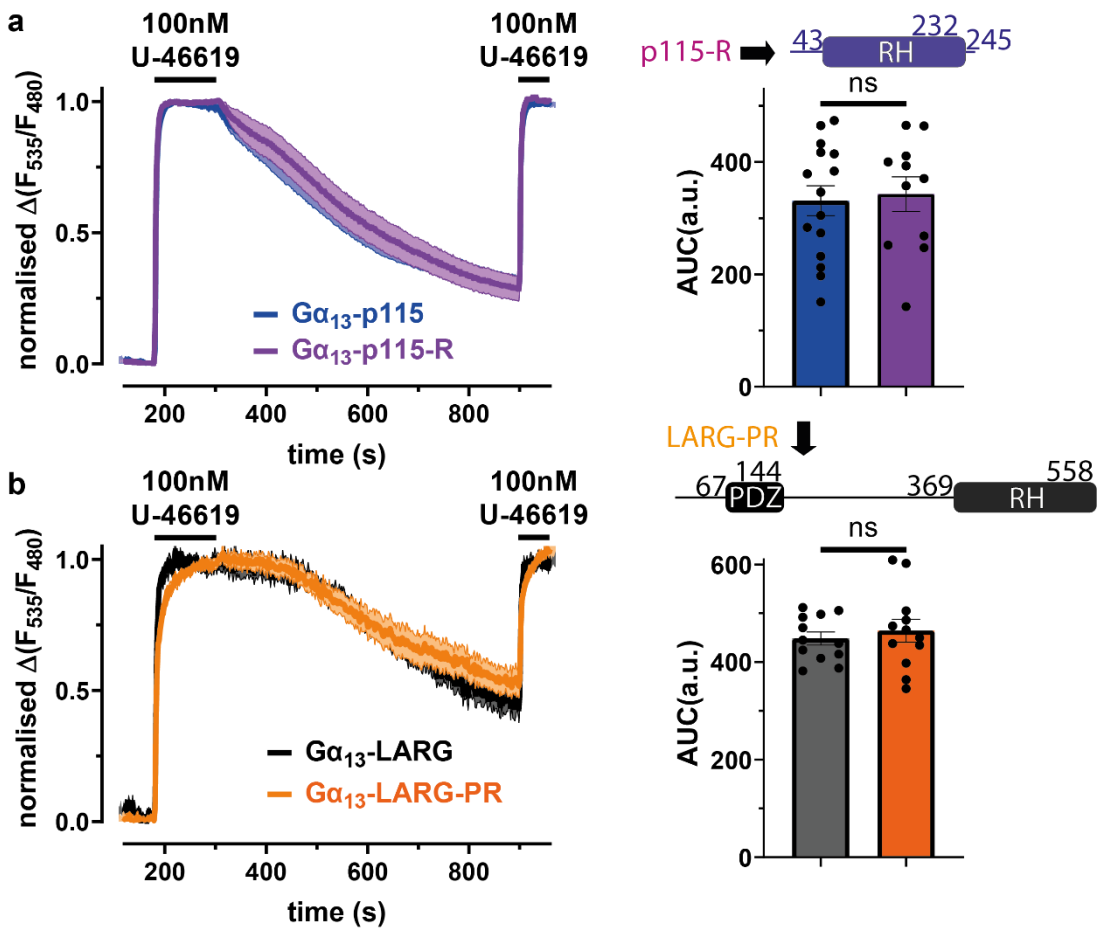

Abbildung 6.13 | C-terminal trunkierte RhoGEFs a) Mittelwert ± SEM von Einzelzellmessungen (siehe Abbildung 6.6) von p115 [blau, Daten aus Abbildung 6.6] und dem C-terminal trunkierten (Aminosäuren 246-912) Konstrukt p115-R [lila, n = 11, AUC = 342,9]. Das Balkendiagramm zeigt die in Abbildungen 6.5 und 6.6 beschriebene Quantifizierung der Dissoziationskinetik als AUC [*unpaired t-test*; ^{ns}P = 0,7734]. **b)** Mittelwert ± SEM von Einzelzellmessungen von LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6] und dem C-terminal trunkierten (Aminosäuren 559-1544) Konstrukt LARG-PR [orange, n=12, AUC=464,2]. Das Balkendiagramm zeigt die in Abbildungen 6.5 und 6.6 beschriebene Quantifizierung der Dissoziationskinetik als AUC [*unpaired t-test*; ^{ns}P = 0,5571].

Auch eine weitere Trunkierung des N-terminalen Teils von LARG um 300 Aminosäuren zu LARG-R (enthält die **R**H-Domäne; Aminosäuren 300-561) führte nicht zu einer signifikanten Veränderung der Bindungskinetik mit $G\alpha_{13}$ (Abbildung 6.14).

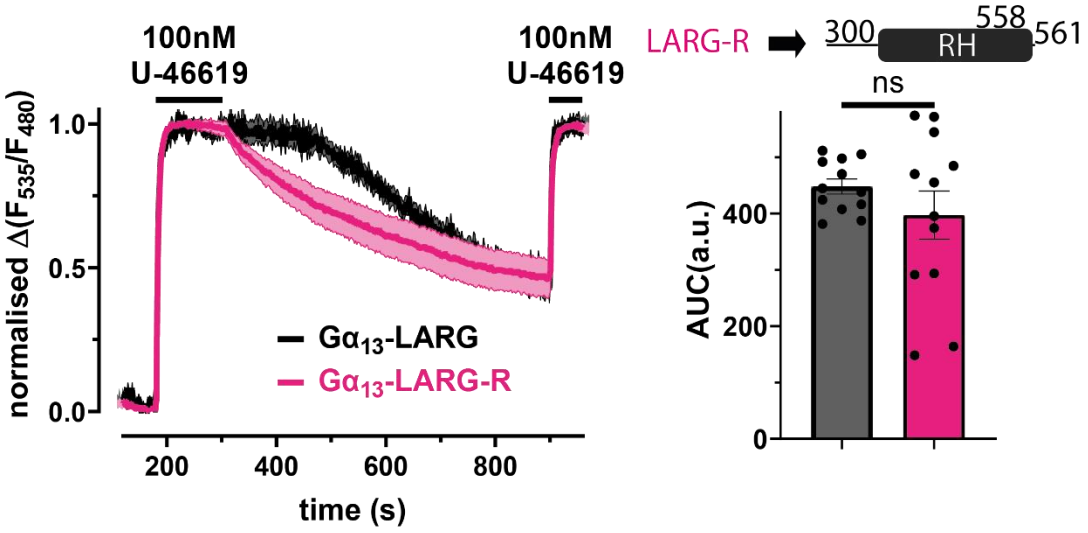

Abbildung 6.14 | N-terminal trunkierte RhoGEFs I Mittelwert ± SEM von Einzelzellmessungen von LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6] und dem zusätzlich N-terminal trunkierten (Aminosäuren 1-299) Konstrukt LARG-R [pink, n = 12, AUC = 397,3]. Das Balkendiagramm zeigt die in Abbildungen 6.5 und 6.6 beschriebene Quantifizierung der Dissoziationskinetik als AUC [*unpaired t-test with Welch´s correction*; ^{ns}P= 0,2749].

Der nächste Schritt war die weitere Kürzung des N-Terminus bei p115 zu p115-Rshort (Kurzversion von p115R; Aminosäuren 34-235) und bei LARG zu LARG-Rshort (Kurzversion von p115R; Aminosäuren 34-235).

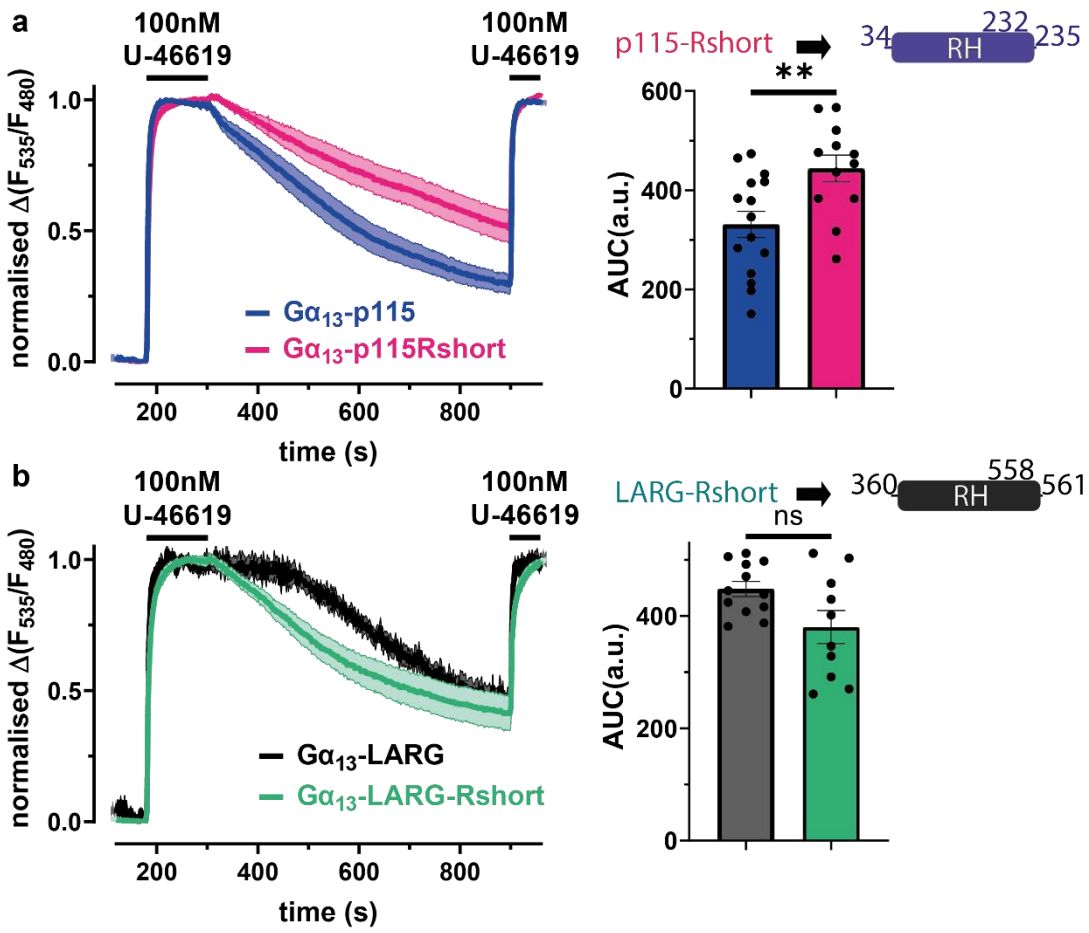

Abbildung 6.15 | N-terminal trunkierte RhoGEFs II a) Mittelwert ± SEM von Einzelzellmessungen (siehe Abbildung 6.6) von p115 [blau, Daten aus Abbildung 6.6] und dem zusätzlich N-terminal trunkierten (Aminosäuren 1-33) Konstrukt p115-Rshort [pink, n = 12, AUC = 443,9]. Das Balkendiagramm zeigt die in Abbildungen 6.5 und 6.6 beschriebene Quantifizierung der Dissoziationskinetik als AUC [*unpaired t-test*, **P = 0,0069]. **b)** Mittelwert ± SEM von Einzelzellmessungen von LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6] und dem zusätzlich N-terminal (Aminosäuren 1-359) trunkierten Konstrukt LARG-Rshort [türkis, n = 10, AUC = 397,3]. Das Balkendiagramm zeigt die in Abbildungen 6.5 und 6.6 beschriebene Quantifizierung der Dissoziationskinetik als AUC [*unpaired t-test with Welch´s correction*, ^{ns}P = 0,0578].

Obwohl eine Tendenz zu einer schnelleren Off-Kinetik durch die N-terminale Trunkierung zu erahnen ist, zeigte LARG-Rshort keine signifikante Änderung der Off-

Kinetik im Vergleich zu fl-LARG. Gegensätzlich dazu führte die N-terminale Trunkierung von p115 zu einer signifikanten Verlangsamung der Offkinetik und somit zu einer signifikant längeren Interaktion mit $G\alpha_{13}$ (p115-Rshort, Abbildung 6.15), welche an die $G\alpha_{13}$-LARG- und PDZ-Interaktionen erinnert.

Die Ergebnisse aus den Trunkierungsversuchen deuteten darauf hin, dass der N-Terminus von p115-RhoGEF einen essentiellen Part in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$ spielt und somit die strukturelle Ursache für den Unterschied darstellen könnte. Durch einfache Trunkierung war es nicht möglich, die Interaktionszeit zwischen $G\alpha_{13}$ und LARG zu verkürzen.

6.1.6 Dissoziationskinetik initialer RH-RhoGEF-Chimäre

Eine Chimäre ist ein Mischprotein aus zwei oder mehreren Proteinen. Für diese Arbeit wurden mehrere Chimären erstellt, um strukturelle Einflüsse auf die Interaktion mit $G\alpha_{13}$ genauer zu untersuchen. Für die Erstellung von Chimera1 wurden mittels *Gibson-Assembly* der N-terminale Teil und die RH-Domäne von p115-RhoGEF (Aminosäuren 1-232) als Fragment in fl-LARG gesetzt, welches den entsprechenden Teil in LARG ersetzt (Aminosäuren 1-558 wurden „entfernt“).

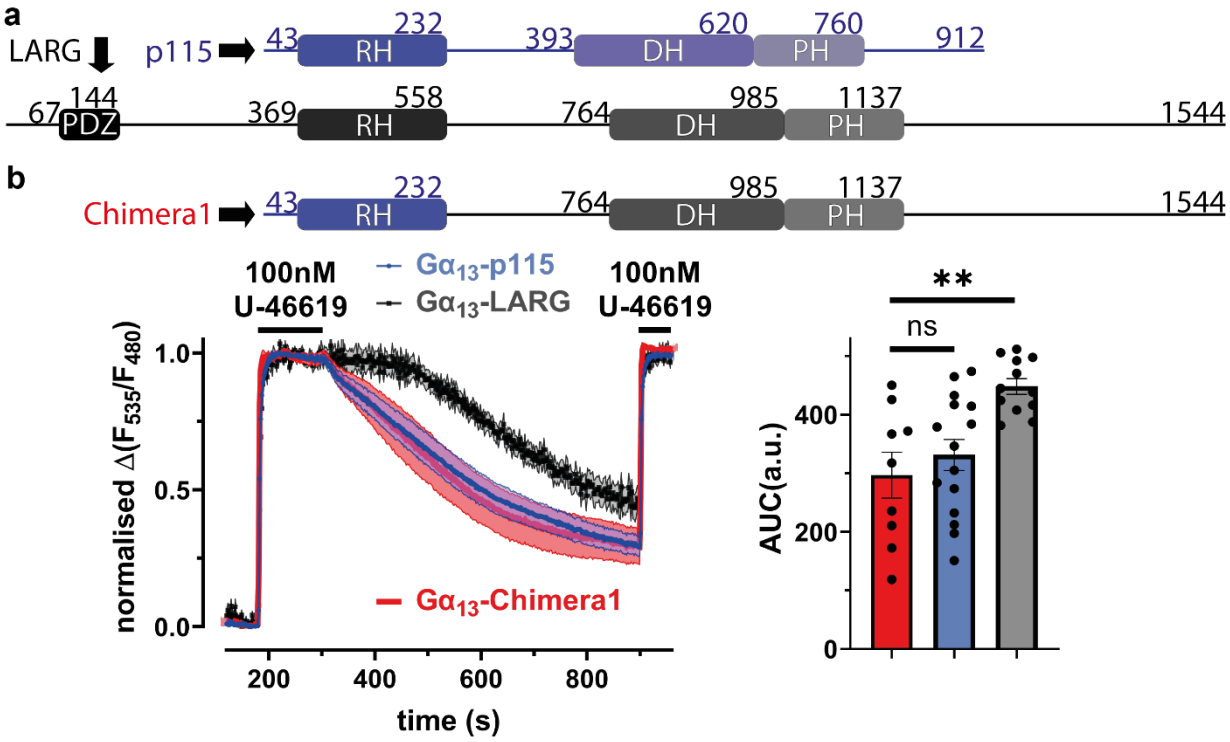

Abbildung 6.16 | $G\alpha_{13}$–Chimera1-Interaktion a) Die Strukturen von p115-RhoGEF und LARG zum Vergleich und als Referenz für Chimera1 **b)** Mittelwert ± SEM der agonistinduzierten Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit Chimera1 [rot, n = 9, AUC = 296,5] im Vergleich zur Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6; **P = 0.006] und p115 [blau, Daten aus Abbildung 6.6; *Brown-Forsythe and Welch ANOVA test with Dunnett´s T3 multiple comparison test*; ^{ns}P = 0,7017] des in Abbildung 6.6 beschriebenen Assays.

Wie in Abbildung 6.16 zu sehen ist, verhielt sich Chimera1 in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$ wie p115. Dabei zeigte sich zwischen den beiden AUCs und somit auch in der Interaktionslänge mit $G\alpha_{13}$ kein signifikanter Unterschied, wohingegen ein signifikanter Unterschied der AUC zur $G\alpha_{13}$-LARG-Interaktion zu beobachten war. Dies untermauerte die Hypothese, dass eine Struktur N-terminal der RH-Domäne für die unterschiedliche Interaktion von p115 zu $G\alpha_{13}$ verantwortlich ist. Der N-Terminus in Verbindung mit der RH-Domäne von p115 reichte für die schnelle Off-Kinetik (kleine AUC), wobei der C-Terminus von LARG anscheinend keinen Einfluss auf die Interaktion mit $G\alpha_{13}$ hatte.

6.1.7 Einfluss der RH-Domäne auf die Interaktion mit $G\alpha_{13}$

Wie groß der Einfluss der RH-Domäne, welche die Bindedomäne für $G\alpha_{12/13}$-Untereinheiten darstellt, ist, wurde auch mit Hilfe trunkierter Konstrukte und Chimären untersucht. Dafür wurde die Interaktion zwischen $G\alpha_{13}$ und den RH-Domänen von p115 (p115-RH-D, bestehend aus Aminosäuren 44-232) und LARG (LARG-RH-D, bestehend aus Aminosäuren 370-558) gemessen, bei welchen jeweils der komplette N- und C-terminale Teil trunkiert wurden.

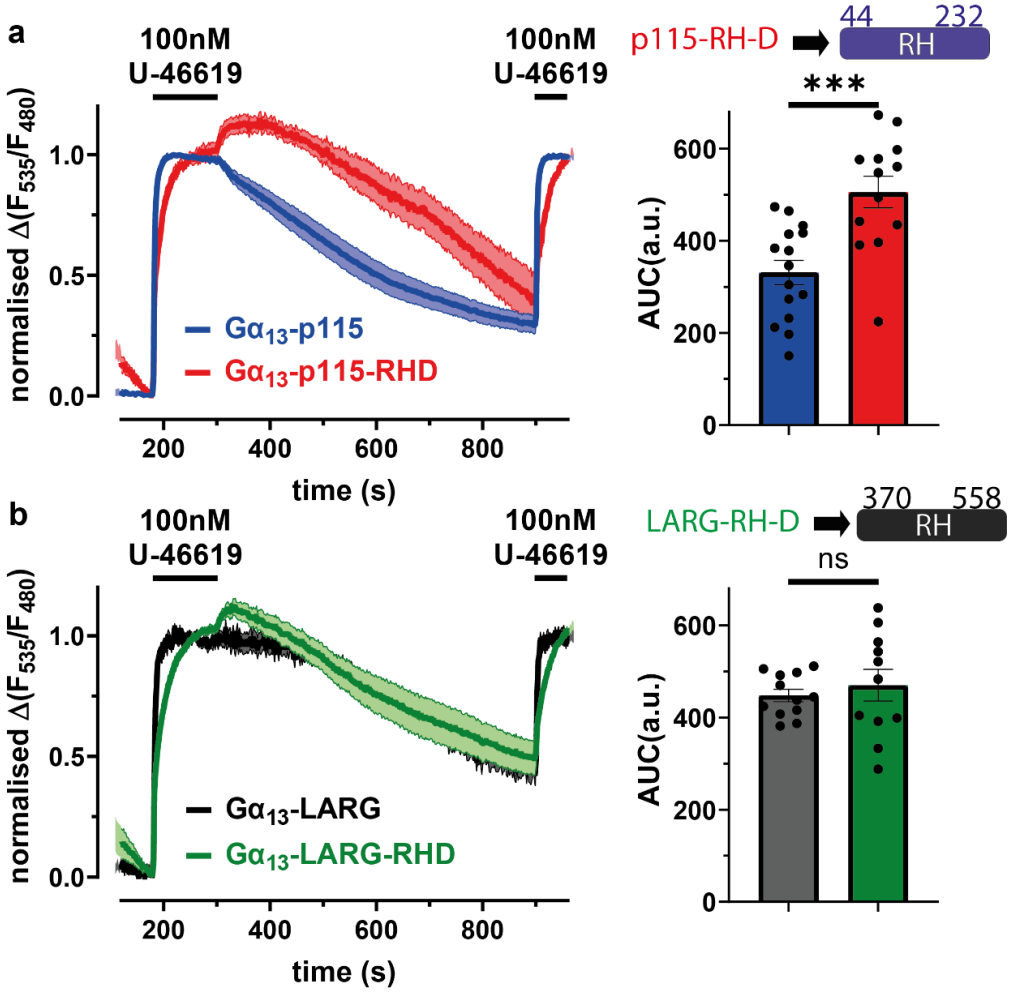

Abbildung 6.17 | Gα$_{13}$–RhoGEF RH-Domänen-Interaktion a) Mittelwert ± SEM der Interaktion von Gα$_{13}$ mit der RH-Domäne von p115 [rot, n = 13, AUC = 505,8] im Vergleich zu fl-p115 [blau, Daten aus Abbildung 6.6; *unpaired t-test*, ***P = 0,0004] in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen Assay. **b)** Mittelwert ± SEM der Interaktion von Gα$_{13}$ mit der RH-Domäne von LARG [grün, n = 11, AUC = 470,3] im Vergleich zu fl-LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6; *unpaired t-test with Welch´s correction*, ^{ns}P = 0,5586] in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen Assay.

Während die Interaktion von Gα$_{13}$ mit der RH-Domäne von LARG keinen signifikanten Unterschied in der AUC der Off-Kinetik im Vergleich zu fl-LARG zeigte, verhielt sich die RH-Domäne von p115 wie LARG und PDZ-RhoGEF. Im Interaktionsassay zeigte die RH-Domäne von p115 eine signifikant höhere AUC und somit langsamere Off-Kinetik im Vergleich zu fl-p115. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus vorherigen

Experimenten, die einen entscheidenden Einfluss des N-terminalen Teils von p115 auf die Interaktion $G\alpha_{13}$ zeigten. Gleichzeitig zeigte sich wieder, dass weder der N-terminale noch der C-terminale Teil von LARG eine zentrale Rolle in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$ spielt. Wenn man die Interaktionen der RH-Domänen mit $G\alpha_{13}$ untereinander vergleicht (Abbildung 6.17 a und b), zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Interaktionskinetik (*unpaired t-test*, ^{ns}P= 0,4797). Somit verhalten sich beide RH-Domänen in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$ hinsichtlich der Off-Kinetik gleich.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die RH-Domäne in p115-RhoGEF für die kürzere Interaktion mit $G\alpha_{13}$ von Bedeutung ist. Dafür wurden zwei Chimären erstellt: fl-p115 mit der RH Domäne (Aminosäuren 370-558) von LARG (=Chimera2) und fl-LARG mit der RH-Domäne (Aminosäuren 44-232) von p115-RhoGEF (=Chimera3).

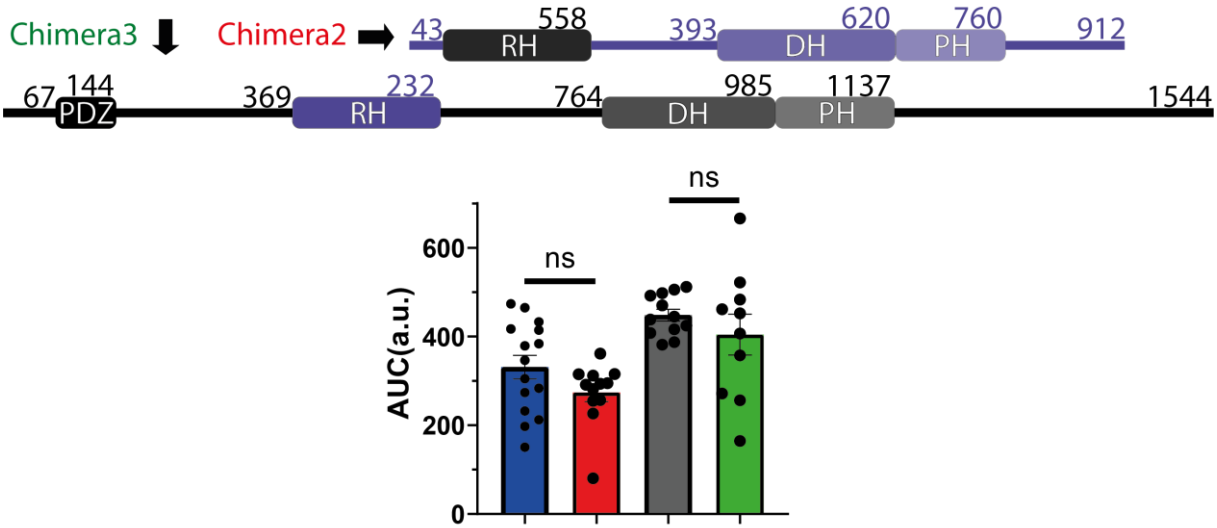

Abbildung 6.18 | Chimera2+3-Interaktionen Einzelzellmessungen des in Abbildung 6.6 beschrieben FRET-Assays (ohne *Traces*) der Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit Chimera2 [rot, n = 12, AUC = 273,5] im Vergleich zu wt-p115 [blau, Daten aus Abbildung 6.6; *unpaired t-test*, ^{ns}P = 0,1116] und der Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit Chimera3 [grün, n = 10, AUC = 404,2] im Vergleich zu wt-LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6; *unpaired t- test with Welch´s correction*, ^{ns}P = 0,3828].

Beide Chimären zeigten dabei keinen signifikanten Unterschied in der AUC der Off-Kinetik im Vergleich zu den entsprechenden wt-RhoGEFs. Daraus lässt sich schließen, dass die RH-Domänen keine ausschlaggebende Rolle in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$ haben, da sie untereinander austauschbar sind.

6.1.8 Strukturvergleich RH-RhoGEFs

Um die strukturelle Ursache für die schnellere Off-Kinetik und damit kürzere Interaktion von p115 mit $G\alpha_{13}$ im Vergleich zu den anderen RH-RhoGEFs zu ergründen, sollten strukturelle Elemente der RH-RhoGEFs verglichen werden. Der Komplex einer $G\alpha_{13/i}$-Chimäre mit p115-RhoGEF wurde bereits mit Hilfe von Röntgenkristallographie aufgelöst (Chen et al., 2005; Sehnal et al., 2021; PDB ID: 1SHZ). Zusätzlich wurde einige Jahre später auch der Komplex von nativem $G\alpha_{13}$ mit p115-RhoGEF aufgelöst (Hajicek et al., 2011). In diesen Komplexen zeigte sich, dass in einem Motiv aus 12 Aminosäuren, welches sich direkt N-terminal der RH-Domäne von p115 befindet, 8 Aminosäuren direkt mit der alpha-helikalen Domäne von $G\alpha_{13}$ interagieren.

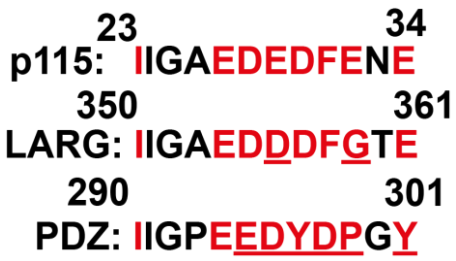

Abbildung 6.19 | Vergleich der N-terminalen Motive, welche sich N-terminal der RH-Domäne der RH-RhoGEFs befinden und mit diesen die rgRGS-Domäne bildet. Aminosäuren, welche direkt mit $G\alpha_{13}$ interagieren, sind rot markiert, Aminosäuren, die sich vom Motiv in p115-RhoGEF unterscheiden, sind unterstrichen.

Vergleicht man dieses Motiv in p115 mit der entsprechenden Stelle in LARG (Abbildung 6.19) zeigt sich, dass sich die Aminosäuresequenz im bindenden Teil (rot markiert) nur an zwei Stellen unterscheidet: die Glutaminsäure an Stelle 29 in p115 ist eine Asparaginsäure in LARG (D356) und die Glutaminsäure an Stelle 32 in p115 ist ein unpolares Glycin in LARG (G359). Um die funktionellen Unterschiede zwischen diesen beiden RH-RhoGEFs zu ermitteln, stellen diese beiden Aminosäuren somit geeignete Mutationsstellen dar. Besonders interessant ist hierbei die Mutation von E32, da sich bei LARG an dieser Stelle keine saure Aminosäure befindet.

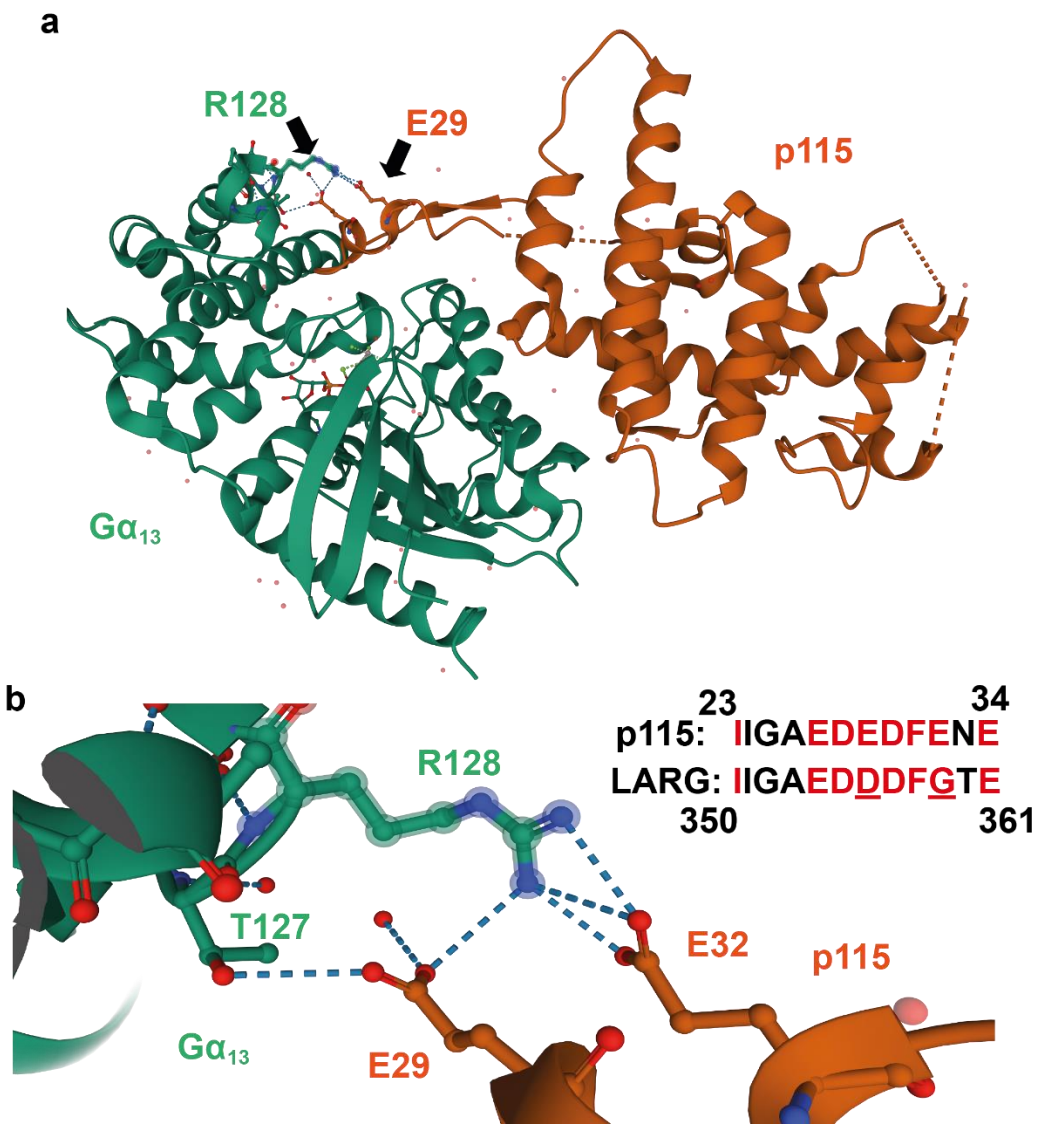

Abbildung 6.20 | Interaktion der $G\alpha_{13/i}$-Chimäre mit p115-RhoGEF a) Übersicht über die Interaktion der $G\alpha_{13/i}$-Chimäre mit p115-RhoGEF. **b)** Vergrößerte Aufnahme der Interaktionen von E29 und E32 von p115-RhoGEF mit T127 und R128 der $G\alpha_{13/i}$-Chimäre; (Chen et al., 2005; Sehnal et al., 2021; PDB ID: 1SHZ).

E29 und E32 aus p115 RhoGEF interagieren hierbei direkt mit Threonin 127 (T127) und Arginin 128 (R128) in $G\alpha_{13}$.

Auch PDZ-RhoGEF besitzt an der Stelle analog zu E32 von p115 keine saure Aminosäure sondern ein Prolin (P299). Der Rest des Bindungsmotives unterscheidet sich jedoch deutlich von p115 und LARG.

6.1.9 Einfluss der Fluorophorplatzierung in $G\alpha_{13}$

Durch die genauere Betrachtung der Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit den RH-RhoGEFs stellte sich heraus, dass T127 und R128 wichtige Interaktionsstellen für die Bindung der RH-RhoGEFs darstellen. Das $G\alpha_{13}$-Konstrukt, mit welchem bis zu diesem Zeitpunkt gearbeitet wurde, hatte jedoch genau zwischen diesen beiden Aminosäuren T127 und R128 das Fluorophor mTurq2 inseriert. Dadurch erschien eine potentielle Störung der Interaktion mit den RH-RhoGEFs möglich. Um dies zu untersuchen, wurde ein neues $G\alpha_{13}$-Konstukt erstellt, bei welchem sich das Fluorophor zwischen Aminosäuren 135 und 136 befand und mit dem ursprünglichen Konstrukt verglichen. Zum Klonieren von $G\alpha_{13}$(135) wurde wieder *Gibson Assembly* verwendet, um das Fluorophor aus $G\alpha_{13}$(127) als Fragment herauszuklonieren und an anderer Stelle entsprechend wieder einzusetzen.

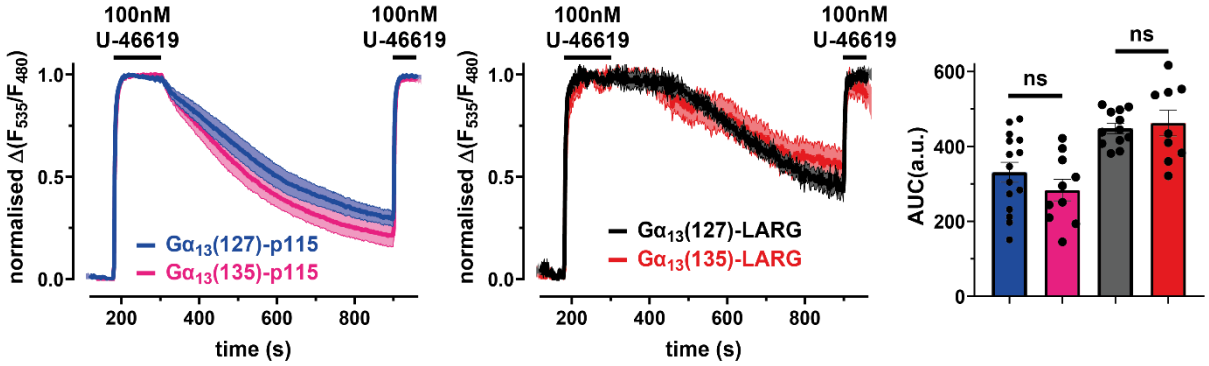

Abbildung 6.21 | $G\alpha_{13}$(127) vs. $G\alpha_{13}$(135) Mittelwert ± SEM der Interaktion von $G\alpha_{13}$(135) [pink, n = 10, AUC = 283,6] und $G\alpha_{13}$(127) [blau, Daten aus Abbildung 6.6; *unpaired t-test*, ^{ns}P=0,2505] mit p115 und der Interaktion von $G\alpha_{13}$(135) [rot, n = 9, AUC = 462,2] und $G\alpha_{13}$(127) [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6; *unpaired t-test with Welch´s correction*, ^{ns}P = 0,7092] mit LARG in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen Einzelzell-FRET-Assay.

Da sich im verwendeten Interaktionsassay kein Unterschied zwischen $G\alpha_{13}$(127) und $G\alpha_{13}$(135) in der Interaktion mit p115 und LARG zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass die Insertion an dieser Stelle die Interaktion mit den RH-RhoGEFs nicht gestört hat.

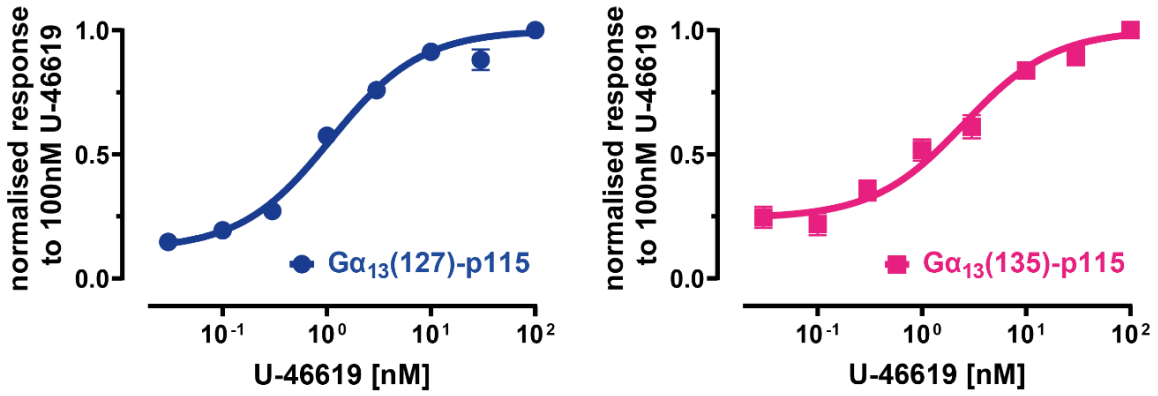

Abbildung 6.22 | BRET $G\alpha_{13}$(127) vs. $G\alpha_{13}$(135) Konzentrations-Wirkungs-Kurven, der $G\alpha_{13}$(127)-p115 Interaktion [blau, gemessen in drei Tripletts = neun *wells* pro Konzentration; EC_{50} = 1,09 nM] und der $G\alpha_{13}$(135)-p115 Interaktion [pink, drei Tripletts; EC_{50} = 2,52 nM], mit Hilfe von BRET im Plattenleser gemessen. Hierfür wurde mTurq2 in den Konstrukten $G\alpha_{13}$(127) und $G\alpha_{13}$(135) für Nanoluciferase (NLuc) ausgetauscht.

Die Messung voller Konzentrations-Wirkungs-Kurven der $G\alpha_{13}$(127)-p115-Interaktion und der $G\alpha_{13}$(135)-p115-Interaktion mit einer unabhängigen Methode (BRET) bewies zusätzlich die funktionelle Interaktion beider $G\alpha_{13}$-Varianten mit deren Effektoren. Trotzdem wurde für weitere Experimente $G\alpha_{13}$(135) verwendet, um eine Störung der Interaktion durch das Fluorophor auszuschließen.

6.1.10 Dissoziationskinetik der Mutante p115-E32G

Wie in 6.1.8 beschrieben stellten sowohl E29, als auch E32 von p115-RhoGEF valide Ziele für Mutationen dar, um den Einfluss des N-terminalen Bindungsmotivs zu untersuchen (Abbildung 6.19). Da die analoge Aminosäure in LARG, zur Glutaminsäure an Position 29 (E29) in p115-RhoGEF, die ebenfalls saure Aminosäure Asparaginsäure (D356) ist, erschien es sinnvoller, sich erst auf E32 von p115-RhoGEF zu konzentrieren. Die analoge Aminosäure zu p115-E32 in LARG ist die kleine, unpolare Aminosäure Glycin. Durch die stark unterschiedlichen Eigenschaften dieser Aminosäuren, entschieden wir uns dafür, die Glutaminsäure E32 in p115 zu Glycin zu mutieren und somit die Mutante p115-E32G zu erstellen.

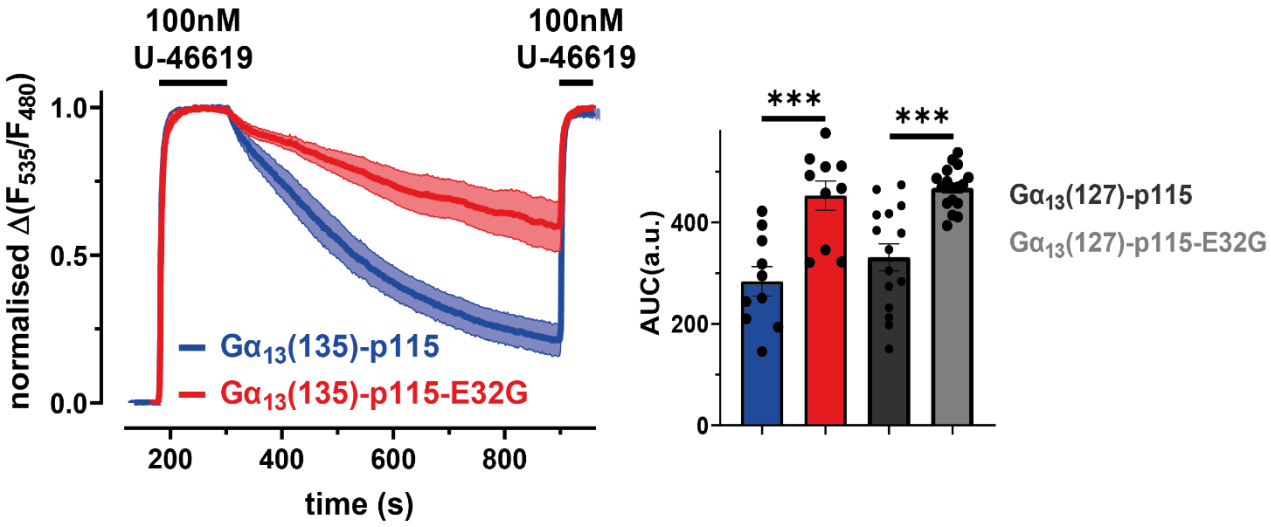

Abbildung 6.23 | p115-E32G Dargestellt sind Mittelwert ± SEM der Interaktion der Mutante p115-E32G [rot, n = 10, AUC = 452,6] mit $G\alpha_{13}$(135) im Vergleich zu wt-p115 [blau, n = 10, AUC = 283,6; *unpaired t-test*, ***P = 0,0006] in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$(135) in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen FRET-Assay. Das Balkendiagramm zeigt zusätzlich die $G\alpha_{13}$(127) Interaktion mit p115 [dunkles grau, Daten aus 6.6] und der Mutante p115-E32G [helles grau, n = 17, AUC = 467.6; *unpaired t-test with Welch´s correction*, ***P = 0,0001].

Die Mutante p115-E32G zeigte eine signifikant höhere AUC der Off-Kinetik, somit war die Interaktion mit $G\alpha_{13}$ deutlich länger als mit wt-p115. p115-E32G verhielt sich somit in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$ wie LARG und PDZ-RhoGEF und diese starke Beeinflussung der Interaktion entstand durch eine einzige Punktmutation. Die Aminosäure E32 ist somit der Schlüsselfaktor in der abweichenden Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit p115-RhoGEF im Vergleich zu den anderen RH-RhoGEFs.

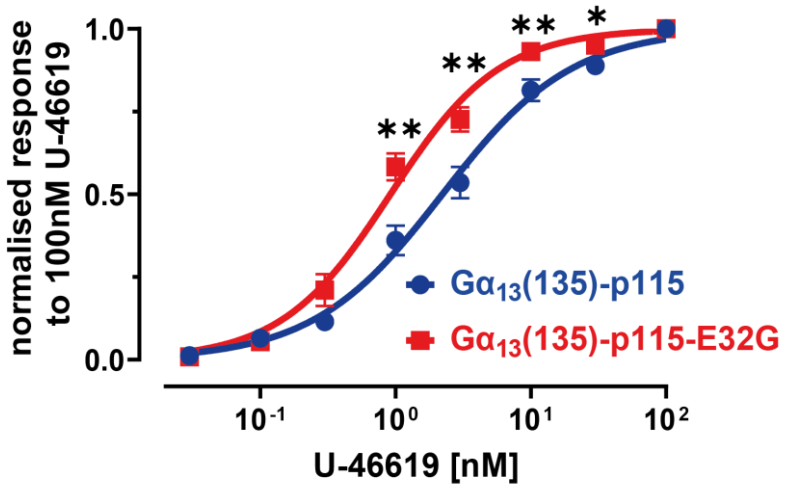

Abbildung 6.24 | Konzentrations-Wirkungs-Kurve p115-E32G Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\alpha_{13}$(135)-p115-E32G-Interaktion [rot, EC_{50} = 0,92 nM] mit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\alpha_{13}$(135)-p115 Interaktion [blau, EC_{50} = 2,22 nM; jeweils 0,03 nM, 0,3 nM und 3 nM, 30 nM: n = 9 und 0,1 nM, 1 nM und 10 nM: n = 10] mit Auswertung nach Abbildung 6.9. Signifikante Unterschiede in der Agonistsensitivität wurden bei Konzentrationen von 1 nM bis 30 nM gefunden [*unpaired t-test with or without Welch´s correction*, abhängig vom Ergebnis des F-test zum Vergleich der Varianzen; 1 nM: **P = 0,0019; 3 nM: **P = 0,0059; 10 nM: **P = 0,0057; 30 nM: *P = 0,0232].

Bei der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Interaktion mit $G\alpha_{13}$(135) zeigte p115-E32G eine Linksverschiebung im Vergleich zu wt-p115 und somit eine höhere

Agonistsensitivität, wie sie auch bei der Interaktion mit LARG zu sehen war. Dies deckt sich mit der Hypothese, dass die Agonistsensitivität der Interaktion mit der Interaktionskinetik in Verbindung steht.

6.1.11 Mutante $G\alpha_{13}$-R128A in der Interaktion mit RH-RhoGEFs

Die saure Aminosäure p115-E32 interagiert direkt über polare Wechselwirkungen mit dem basischen Arginin an Position 128 (R128) in $G\alpha_{13}$ (Abbildung 6.20 a+b). Da die Mutation zu p115-E32G genau die Interaktion zwischen diesen beiden Aminosäuren unterbindet, müsste die Mutation des Interaktionspartners von p115-E32 den gleichen Effekt auf die Interaktion haben. Aus diesem Grund wurde die Mutante $G\alpha_{13}$-R128A kloniert.

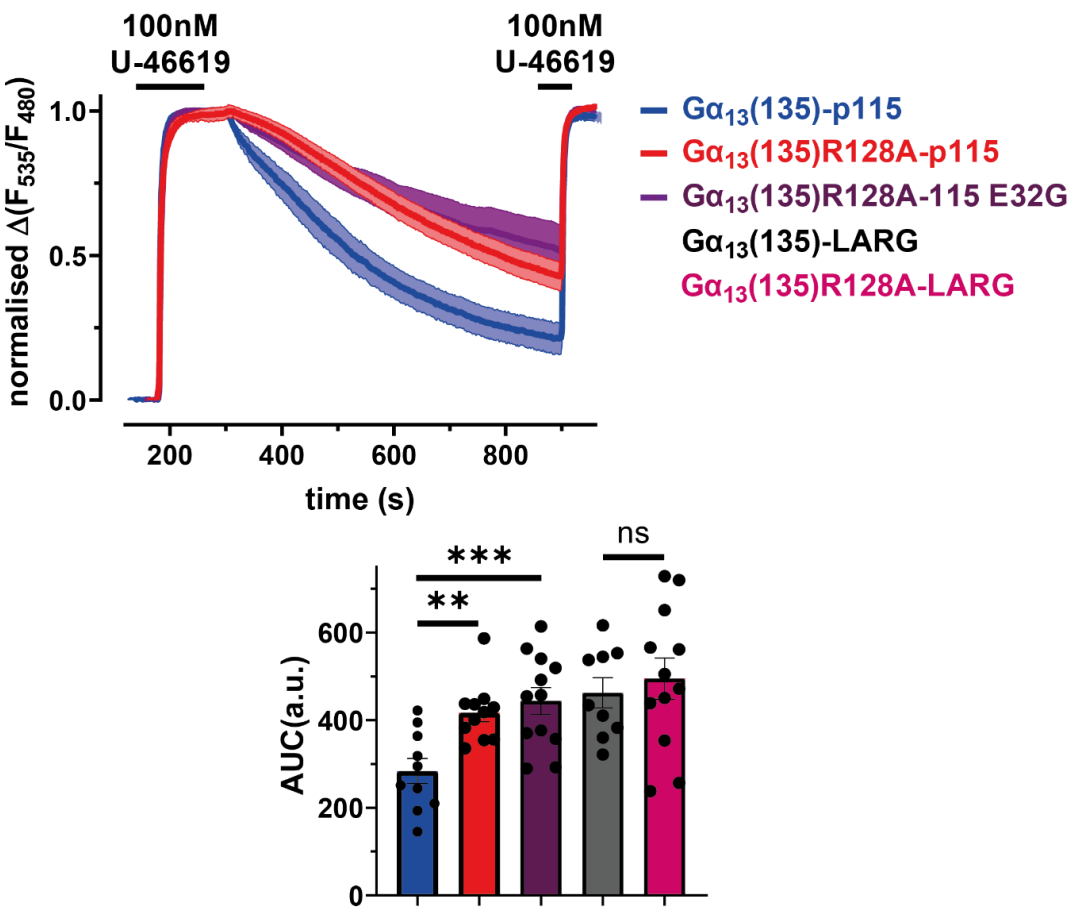

Abbildung 6.25 | Gα$_{13}$-R128A Die Abbildung zeigt Mittelwert ± SEM des in Abbildung 6.6 beschriebenen FRET-Interaktionsassays der Mutante Gα$_{13}$-R128A [rot, n = 11, AUC = 416,9] in der Interaktion mit p115 im Vergleich zu wt-Gα$_{13}$ [blau, Daten aus Abbildung 6.21; **P = 0,0058]. Zusätzlich dargestellt ist die Interaktion der Mutante Gα$_{13}$-R128A mit der Mutante p115-E32G [lila, n = 12, AUC = 443,8; *ordinary one-way ANOVA with Tukey´s multiple comparison test*, ***P = 0,0008]. Nur im Balkendiagramm findet sich die Interaktion der Mutante Gα$_{13}$-R128A in der Interaktion mit LARG [pink, n=12, AUC=495] im Vergleich zur Interaktion mit wt-LARG [grau, Daten aus Abbildung 6.21; *unpaired t-test*, ^{ns}P = 0,7578].

Wie zu erwarten, verhielt sich die Mutante Gα$_{13}$-R128A in der Interaktion mit wt-p115 wie die p115-E32G Mutante in der Interaktion mit wt-Gα$_{13}$, da bei beiden Mutanten die gleiche polare Interaktion gestört wird. Auch bei der gleichzeitigen Verwendung beider Mutanten zeigte die Interaktion eine langsame Off-Kinetik, somit eine lange

Interaktionszeit, welche an die Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit LARG und PDZ-RhoGEF erinnert und im Vergleich zu den Effekten der Einzelmutanten keine zusätzliche Verlangsamung aufwies. Gleichzeitig zeigte die Mutante $G\alpha_{13}$-R128A in der Interaktion mit LARG keinen Unterschied zur Interaktion mit wt-$G\alpha_{13}$, was den einzigartigen Charakter der $G\alpha_{13}$-p115-Interaktion mit der schnellen Off-Kinetik unterstreicht, welcher allein von der Interaktion zweier Aminosäuren abhängig ist.

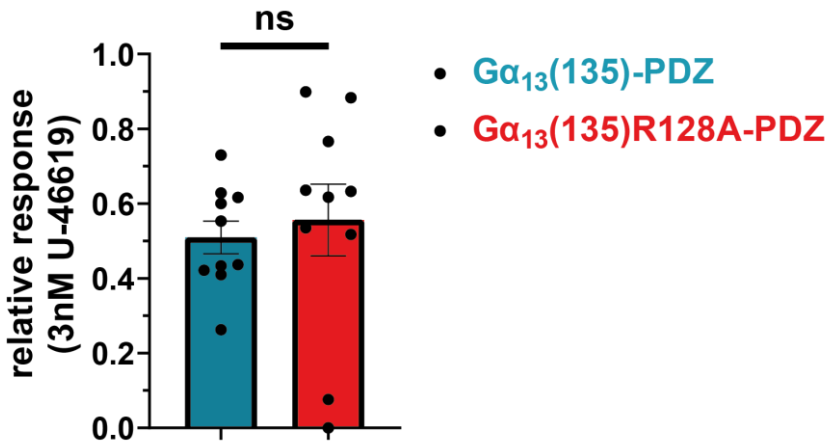

Abbildung 6.26 | $G\alpha_{13}$-R128A-PDZ Vergleich von Mittelwert ± SEM der $G\alpha_{13}$-PDZ-RhoGEF Interaktion [cyan, n = 10, relative Antwort = 0,51] mit der $G\alpha_{13}$-R128A-PDZ-RhoGEF Interaktion [rot, n = 10, relative Antwort = 0,56; *Welch´s t-test*, $^{ns}P = 0{,}6632$] in einem FRET-Assay, welcher wie in Abbildung 6.2 gemessen wurde, bei welchem jedoch die Antwort auf 0,3 nM U-46619 relativ zu 100 nM U-46619 verglichen wurde.

Auch in der Interaktion mit PDZ-RhoGEF zeigte die Mutante $G\alpha_{13}$-R128A keine signifikanten Unterschiede, was zu erwarten war, da, wie bei LARG, auch bei PDZ-RhoGEF die nötige polare Wechselwirkung nicht vorhanden ist.

6.1.12 $G\alpha_{13}$-LARG-Interaktion

Bis zu diesem Zeitpunkt konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen $G\alpha_{13}$ und p115 in dem Sinne einzigartig unter der RH-RhoGEFs ist, da sie als einzige eine schnelle Off-Kinetik zeigt und somit die Interaktionszeit deutlich kürzer ist. Als letzte Versuchsreihe in diesem Themenabschnitt wurde versucht, diese Eigenschaft von p115, die von einer einzigen sauren Aminosäure (E32) in dem N-terminalen Bindungsmotiv abhängt, auf LARG zu übertragen. Hierfür wurde eine Reihe von Mutanten und Chimären erzeugt, um die Interaktionseigenschaften mit $G\alpha_{13}$ zu verändern.

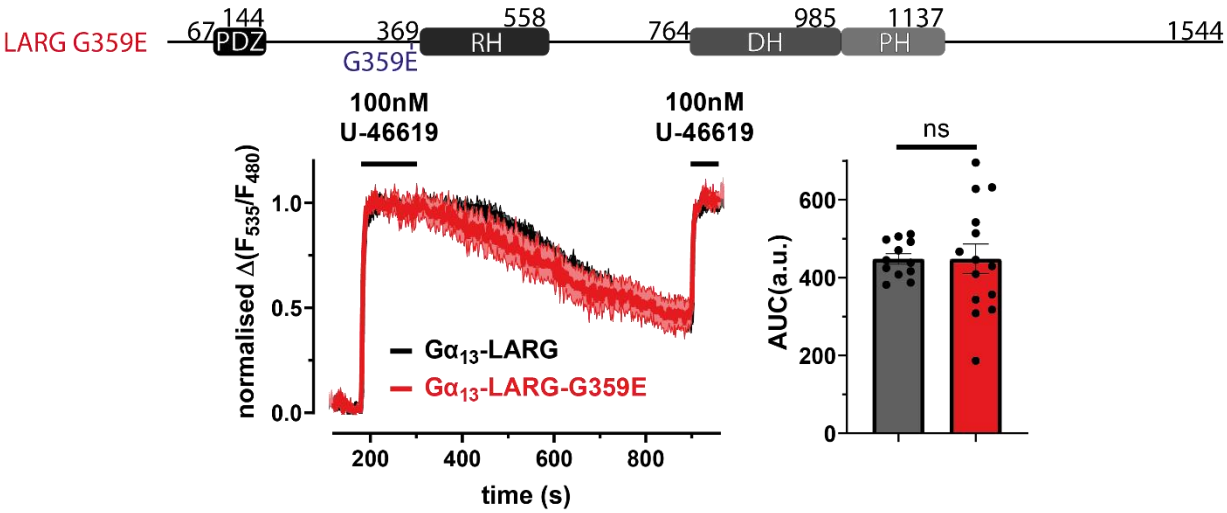

Abbildung 6.27 | LARG-G359E Die Interaktion der Mutante LARG-G359E [rot, n = 14, AUC = 448,2] mit $G\alpha_{13}$(127) im Vergleich zu wt-LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6; *Brown-Forsythe and Welch ANOVA test*; ^{ns}P = 0,9999] in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen FRET-Assay.

Die Aminosäure, welche sich bei LARG im N-terminalen Bindungsmotiv analog zu p115-E32 befindet, ist Glycin in Position 359 (G359, siehe Abbildung 6.19). Die Hoffnung war somit, durch die Mutation von G359 zu einer sauren Aminosäure (um die polare Wechselwirkung mit $G\alpha_{13}$ zu ermöglichen) die Funktionalität zu erzeugen,

welche bei der $G\alpha_{13}$-p115-Interaktion gegeben ist. Hierfür wurde die Mutante LARG-G359E kloniert. LARG-G359E zeigte jedoch keinen signifikanten Unterscheid in der Interaktion zu $G\alpha_{13}$ verglichen zu wt-LARG. Die Funktionalität war somit nicht durch die Mutation einer einzelnen Aminosäure zu erreichen.

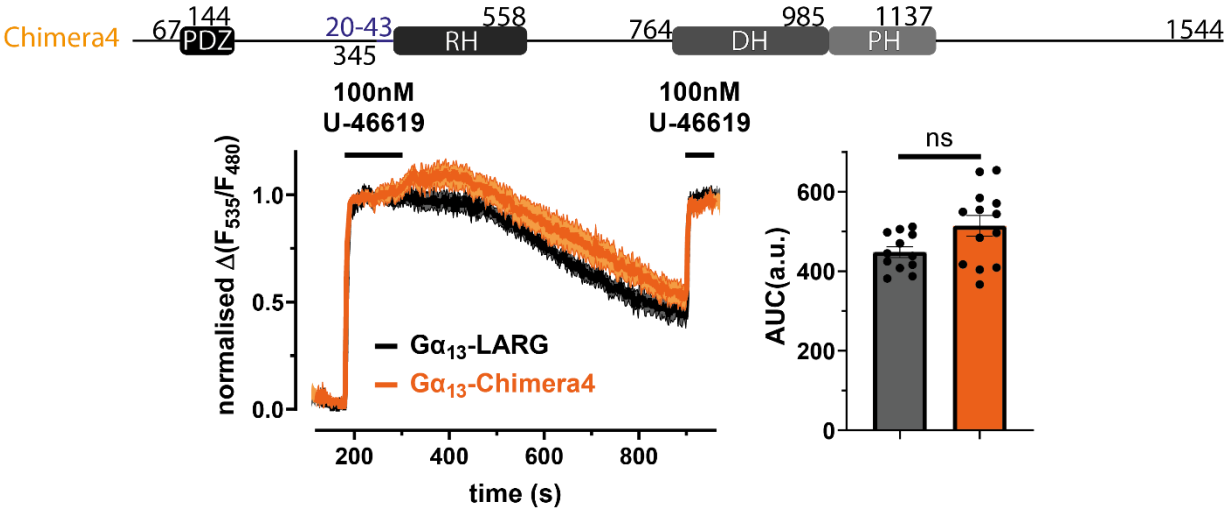

Abbildung 6.28 | Chimera4 Die Interaktion von Chimera4 [orange, n = 13, AUC = 514,1] mit $G\alpha_{13}$(127) im Vergleich zu wt-LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6; *Brown-Forsythe and Welch ANOVA test*; ^{ns}P = 0,1680] in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen FRET-Assay.

Der nächste Schritt war die Insertion des N-terminalen Bindungsmotives von p115 (Aminosäuren 20-43) in LARG. Diese sollte die strukturelle Voraussetzung für eine funktionelle Interaktion bezüglich der GAP-Aktivität stellen. Dafür wurde mittels Gibson-Assembly der entsprechende Teil aus p115 herauskloniert und in LARG inseriert, sodass dessen Aminosäuren 346-369 ersetzt wurden. Diese Chimera4 zeigte jedoch keine signifikante Änderung der AUC der Off-Kinetik im Vergleich zu wt-LARG. Somit reichte auch das komplette Bindungsmotiv nicht aus, um die entsprechende Funktionalität zu erzeugen.

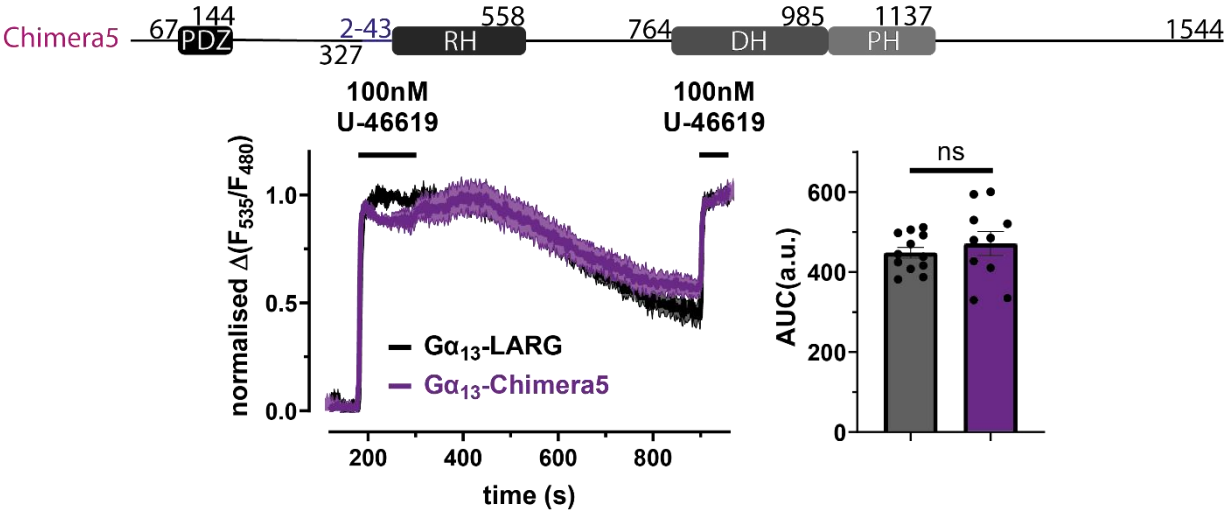

Abbildung 6.29 | Chimera5 Die Interaktion von Chimera5 [lila, n = 10, AUC = 471,2] mit $G\alpha_{13}$(127) im Vergleich zu wt-LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6; *Brown-Forsythe and Welch ANOVA test*; ^{ns}P = 0,9680] in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen FRET-Assay.

Bei Chimera5 wurde der gesamte N-Terminus von p115 (Aminosäuren 2-43) in LARG kloniert, wo entsprechend Aminosäuren 328-369 ersetzt wurden, jedoch der restliche N-Terminus von LARG erhalten bleib. Auch bei dieser Chimäre konnte kein Unterschied zu wt-LARG festgestellt werden, was erwartbar war, da der N-terminale Rest vor dem rgRGS-Motiv in vorherigen Experimenten für die GAP-Aktivität auch nicht von Bedeutung war.

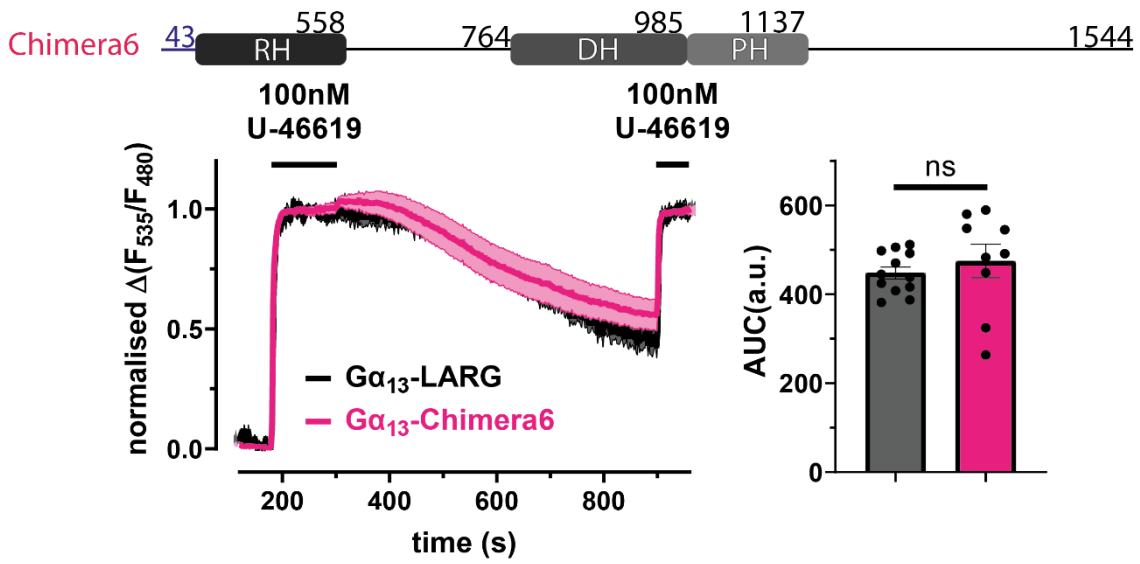

Abbildung 6.30 | Chimera6 Die Interaktion von Chimera6 [pink, n = 9, AUC = 474,9] mit $G\alpha_{13}$(127) im Vergleich zu wt-LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6; *Brown-Forsythe and Welch ANOVA test*; ^{ns}P = 0,9729] in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen FRET-Assay.

Da sowohl LARG-G359E, als auch Chimera4+5 keine beschleunigte Off-Kinetik zeigten, entstand die Hypothese, dass die Interaktion mit $G\alpha_{13}$ durch andere Strukturelemente in LARG behindert werden könnte. Aus diesem Grund wurde Chimera6 kloniert, welche wie Chimera5 den N-Terminus von p115 enthielt, dieser ersetzte aber in diesem Fall den kompletten N-Terminus von LARG (Aminosäuren 1-369). Jedoch zeigte auch diese Chimäre nicht den gewünschten Effekt, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die Interaktion mit $G\alpha_{13}$ nicht durch den N-Terminus von LARG behindert wird.

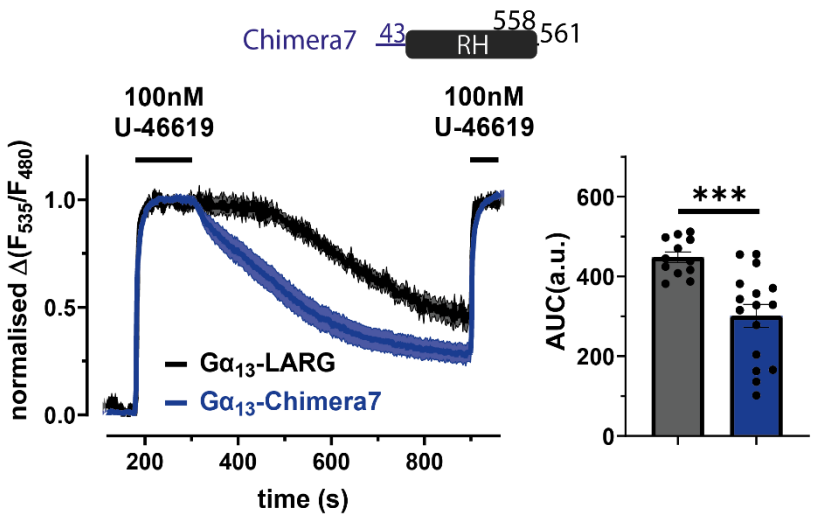

Abbildung 6.31 | Chimera7 Die Interaktion von Chimera7 [blau, n = 16, AUC = 301,1] mit $G\alpha_{13}$(127) im Vergleich zu wt-LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6; *Brown-Forsythe and Welch ANOVA test*; ***P = 0,0009] in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen FRET-Assay.

Durch die Trunkierung des C-Terminus in Chimera6 entstand Chimera7. Diese Chimäre war signifikant schneller in der Off-Kinetik im Vergleich zu wt-LARG, verhielt sich somit wie p115-RhoGEF. Dies war nicht sonderlich überraschend, da Chimera7 nur die RH-Domäne von LARG enthielt und bereits in vorherigen Experimenten (siehe 6.1.7) gezeigt wurde, dass die RH-Domänen sowohl von p115 als auch von LARG keinen signifikanten Einfluss auf die Interaktion mit $G\alpha_{13}$ zeigten. Somit entstand die Hypothese, dass der C-Terminus von LARG die Interaktion mit $G\alpha_{13}$ (eventuell sterisch) behindert.

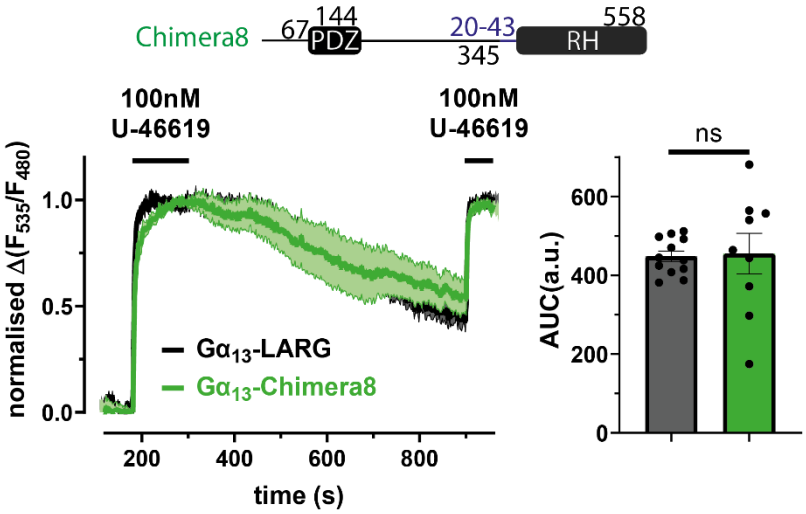

Abbildung 6.32 | Chimera8 Die Interaktion von Chimera8 [grün, n = 9, AUC = 454,9] mit $G\alpha_{13}$(127) im Vergleich zu wt-LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6; *Brown-Forsythe and Welch ANOVA test*; ^{ns}P = 0,9998] in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen FRET-Assay.

Um diese Hypothese zu testen, wurde Chimera8 kloniert. Diese enthielt wie Chimera4 das N-terminale Bindungsmotiv von p115, jedoch wurde der C-Terminus trunkiert. Da sich hier kein signifikanter Unterschied zu wt-LARG zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass nicht allein der C-Terminus, sondern auch der N-Terminus von LARG die Interaktion des Bindungsmotivs mit $G\alpha_{13}$ potentiell stört, wodurch sich die Frage ergibt, ob diese Funktionalität von p115 in LARG überhaupt erzeugt werden kann, ohne das Protein komplett zu verändern.

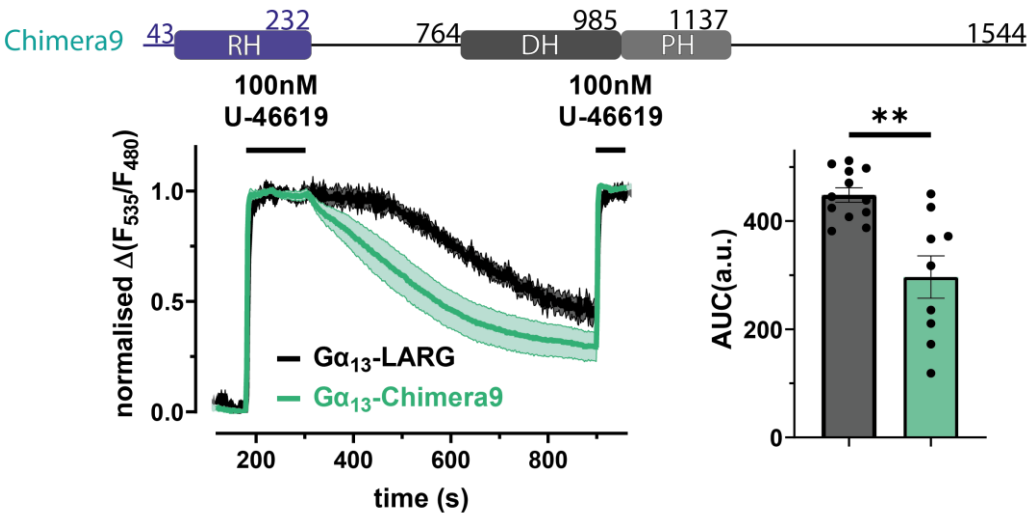

Abbildung 6.33 | Chimera9 Die Interaktion von Chimera9 [türkis, n = 9, AUC = 296,5] mit $G\alpha_{13}$(127) im Vergleich zu wt-LARG [schwarz, Daten aus Abbildung 6.6; *Brown-Forsythe and Welch ANOVA test*; **P = 0,006] in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen FRET-Assay.

Chimera9 ist wie Chimera6 aufgebaut, besitzt jedoch die RH-Domäne von p115-RhoGEF statt der RH-Domäne von LARG. Diese besaß eine signifikant schneller Off-Kinetik im Vergleich zu wt-LARG. Somit ist es plausibel, dass die RH-Domäne von p115 die Interaktion des N-terminalen Motivs mit $G\alpha_{13}$ begünstigt. Abschließend lässt sich sagen, dass die $G\alpha_{13}$-LARG Interaktion nicht auf ein einzelnes Strukturelement begrenzt werden konnte, jedoch einige Hinweise zu Einflüssen auf die Interaktionskinetik gefunden werden konnten. Die Einordung dieser verschiedenen Faktoren und deren Einfluss auf die Interaktionen wird entsprechend diskutiert (7.1).

6.1.13 Funktionalität der generierten Konstrukte

Um zu testen, ob die in dieser Arbeit generierten trunkierten RH-RhoGEFs und Chimären funktionell hinsichtlich ihrer GEF-Aktivität sind, wurde ein Dual-Luciferase-Assay-System verwendet (siehe 5.7). Dabei ist eine Luciferase immer aktiv (unabhängige Expression), die Expression und damit Aktivität einer zweiten

Luciferase ist jedoch von der Aktivierung der $G\alpha_{13}$-RhoGEF-RhoA-Signalkaskade abhängig. In unveröffentlichten Versuchen dieser Arbeitsgruppe wurde bereits beobachtet, dass die alleinige Transfektion eines RhoGEFs ohne Stimulation durch einen Agonist in HEK293T-Zellen bereits zu einer deutlichen Aktivierung des Signalweges führte. Aus diesem Grund wurden Zellen, welche mit p115-RhoGEF oder LARG transfiziert wurden, als Positivkontrolle verwendet. Zellen, welche mit einem leeren pcDNA3-Vektor transfiziert wurden, wurden als Negativkontrolle verwendet.

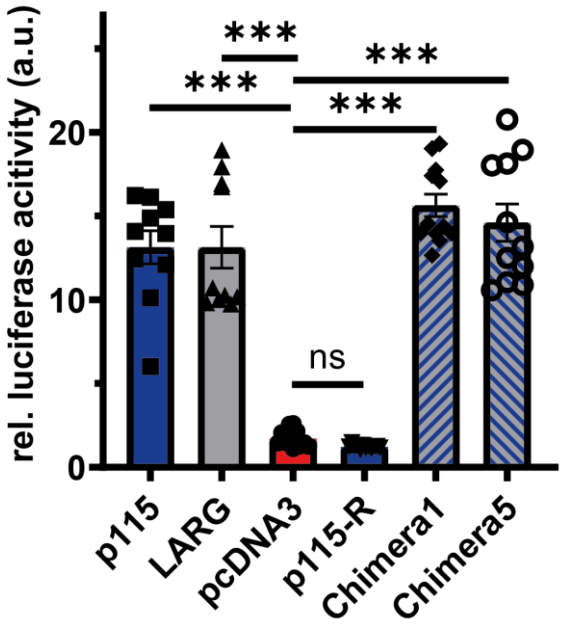

Abbildung 6.34 | Dual-Luciferase-Assay-System Zellen welche mit p115-RhoGEF [blau, n = 10, Mittelwert: 13,1; ***P = 0,0001], LARG [grau, n = 10, Mittelwert: 13,1; ***P = 0,0001], Chimera1 [blau-grau, n = 12, Mittelwert: 15,6; ***P = 0,0001], oder Chimera5 [grau-blau, n = 12, Mittelwert: 14,6; ***P = 0,0001] transfiziert wurden, zeigten im Dual-Luciferase-Assay-System eine signifikant höhere relative Luciferase-Aktivität als Zellen, welche mit einem leeren pcDNA3-Vektor transfiziert wurden [rot, n = 12, Mittelwert: 1,7], während Zellen, welche mit dem trunkierten p115-R [blau, n = 12, Mittelwert: 1,2; $^{ns}P = 0{,}9974$; *Ordinary one-way ANOVA with multiple comparisons*] transfiziert wurden, keinen signifikanten Unterschied zeigten.|

Zellen, welche mit dem leeren pcDNA3-Vektor transfiziert wurden, zeigten wie zu erwarten nur eine geringe relative Luciferase-Aktivität, da hier der $G\alpha_{13}$-RhoGEF-RhoA-Signalweg nicht aktiviert wurde. Mit p115-RhoGEF und LARG transfizierte Zellen hingegen zeigten als Positivkontrolle eine signifikant höhere relative Luciferase-Aktivität, was auf eine starke Aktivierung des Signalweges hindeutet. Bei der Transfektion der zwei Chimären Chimera1 und Chimera5, welche beispielhaft getestet wurden um die Funktionalität der in dieser Arbeit erstellten Chimären zu überprüfen, zeigte sich auch eine signifikant erhöhte relative Luciferase-Aktivität gegenüber pcDNA3, was beweist, dass die getesteten Chimären ihre GEF-Aktivität gegenüber RhoA behalten haben, somit weiterhin funktionell sind und den $G\alpha_{13}$-RhoGEF-RhoA Signalweg stark aktivieren. Zellen, welche mit p115-R transfiziert wurden zeigten keinen signifikanten Unterschied der relativen Luciferase-Aktivität gegenüber Zellen, die mit pcDNA3 transfiziert wurden. Da das trunkierte p115-R keine DH-Domäne (und PH-Domäne) mehr besitzt, welche zur Bindung von RhoA und deren Aktivierung notwendig ist, kann p115-R den $G\alpha_{13}$-RhoGEF-RhoA-Signalweg nicht aktivieren.

6.2 Gβγ-RH-RhoGEF-Interaktion

Ein weiteres (kleineres) Projekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Interaktion der Gβ/γ-Untereinheiten mit den RH-RhoGEFs durch Agonistapplikation. In Vorarbeiten der AG Bünemann hatte sich bereits gezeigt, dass in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen FRET-Assay auch bei der Transfektion von (mit Donor-Fluorophor markiertem) Gβγ statt markiertem $G\alpha_{13}$ eine Änderung der $\Delta F_{535}/F_{480}$-Ratio gemessen werden kann.

6.2.1 Interaktionsassay und Kinetik

Die Interaktion der Gβ/γ-Untereinheiten mit den RH-RhoGEFs wurde analog zu dem in 6.1.1 beschriebenen Assay gemessen. Statt der $G\alpha_{13}$-Untereinheit wurden entweder Gβ oder Gγ mit dem Donor-Fluorophor mTurq2 markiert. In Messungen, welche in frühen Phasen dieser Arbeit angefertigt wurden, zeigte sich folgendes:

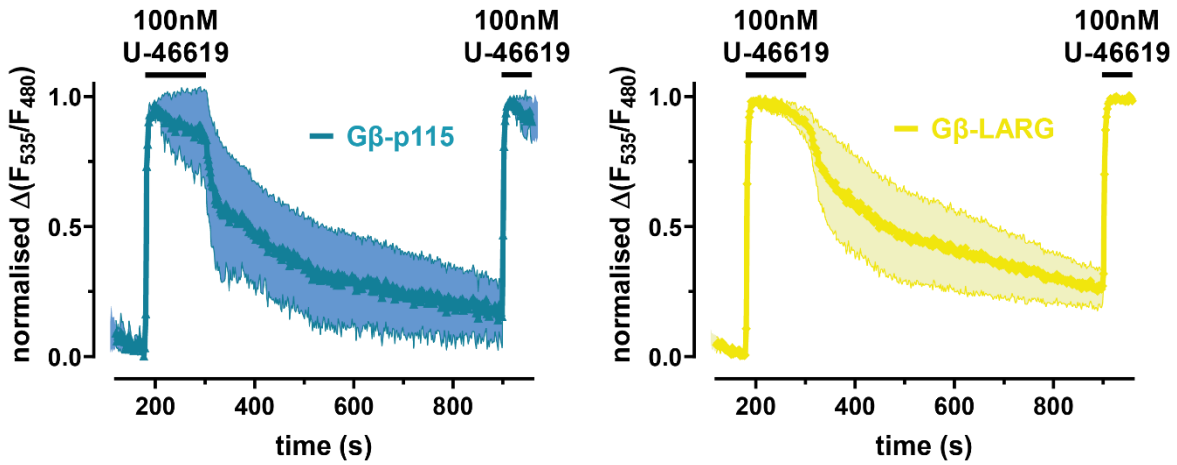

Abbildung 6.35 | Gβ-RhoGEF-Interaktion Mittelwert ± SEM des in Abbildung 6.6 beschriebene FRET-Interaktionsassay mit markiertem Gβ statt markiertem $G\alpha_{13}$ in der Interaktion mit p115 [blau, n = 4] und mit LARG [gelb, n = 5].

Sowohl mit p115, als auch mit LARG zeigte markiertes Gβ eine Änderung des FRET-Signals bei Agonistapplikation. Das bedeutet, dass Gβ und die RH-RhoGEFs durch die Aktivierung des Rezeptors in räumliche Nähe kommen.

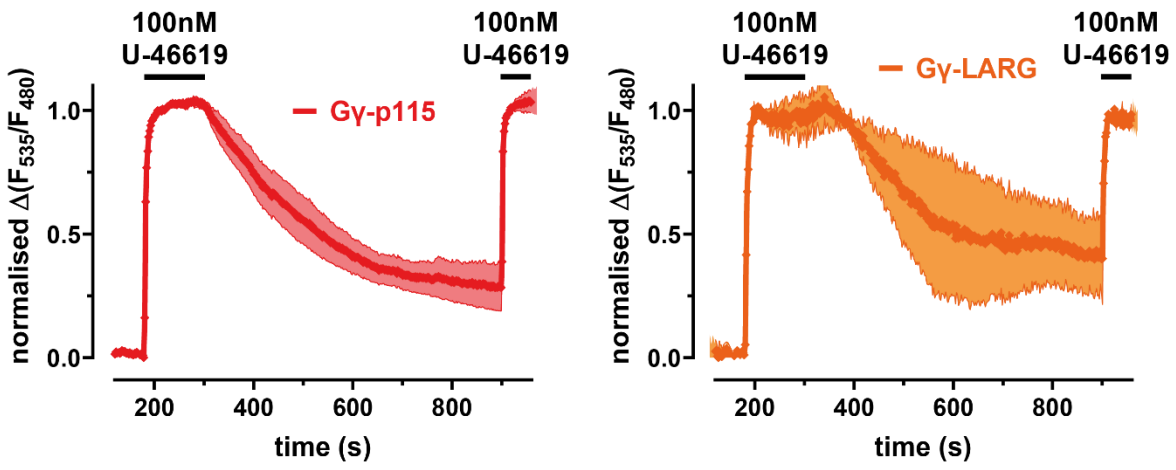

Abbildung 6.36 | Gγ-RhoGEF Interaktion Mittelwert ± SEM des in Abbildung 6.6 beschriebene FRET-Interaktionsassay mit markiertem Gγ statt markiertem $G\alpha_{13}$ in der Interaktion mit p115 [rot, n = 4] und mit LARG [orange, n = 3].

Auch mit Gγ zeigte sich bei der Agonistapplikation eine Änderung der $\Delta(F_{535}/F_{480})$-Ratio, sowohl mit p115 als auch LARG. Dies zeigt, dass auch Gγ durch die Aktivierung des Rezeptors in räumliche Nähe zu den RH-RhoGEFs kommt. Dies ist nicht verwunderlich, da die Untereinheiten Gβ und Gγ eine Einheit bilden. Zusätzlich erinnert die Off-Kinetik der Interaktion (vor allem von Gγ-RhoGEF) an die Interaktionskinetik von $G\alpha_{13}$ mit den entsprechenden RhoGEFs. Aus diesem Grund wurde die Interaktion erneut gemessen. Da Gγ höhere Amplituden in der Interaktion mit den RH-RhoGEFs zeigte, wurde jenes verwendet. Zur Expression der G-Proteine wurde hierbei ein Konstrukt, welches auf „IRES“ basiert, verwendet (siehe 4.6), welches alle drei G-Proteine enthält. Diese werden somit stöchiometrisch in gleichem Maß exprimiert.

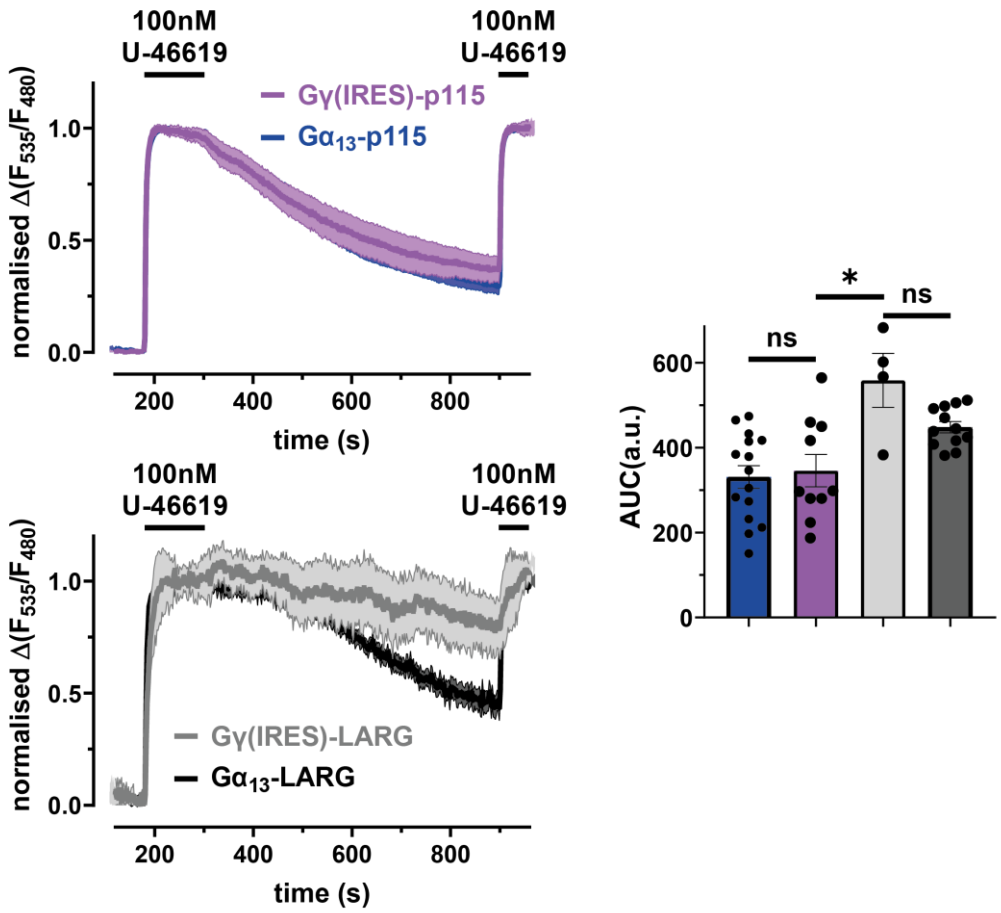

Abbildung 6.37 | Gγ(IRES)-RhoGEF-Kinetik orientiert sich an Gα$_{13}$-RhoGEF Kinetik Mittelwert ± SEM (FRET-Assay beschrieben in Abbildung 6.6) der Gγ(IRES)-p115-Interaktion [lila, n = 10, AUC = 345,6] im Vergleich zur Gα$_{13}$-p115 Interaktion [blau, Daten aus 6.6; *unpaired t-test*, ^{ns}P = 0,7492]. Der untere Teil der Abbildung zeigt denselben *Assay* in der Interaktion von Gγ(IRES) mit LARG [grau, n = 4, AUC = 558,3] im Vergleich zu Gα$_{13}$ mit LARG [schwarz, Daten aus 6.6; *unpaired t-test with Welch´s correction*, ^{ns}P = 0,1796]. Im Balkendiagramm ist zusätzlich die Gγ(IRES) Interaktion mit p115 und LARG verglichen [*unpaired t-test*, *P = 0,0121].

Wie in Abbildung 6.37 zu sehen ist, orientiert sich die Kinetik der Gγ(IRES)-RhoGEF-Interaktion stark an der Kinetik der Gα$_{13}$-RhoGEF-Interaktion. Sowohl p115 als auch LARG zeigen keinen signifikanten Unterschied in der AUC ihrer Interaktion mit jeweils Gα$_{13}$ oder Gγ(IRES). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass sich die Gβγ-

Untereinheit bei der Aktivierung von $G\alpha_{13}$ nicht von dieser trennt und das Heterotrimer zusammen an den entsprechenden Effektor bindet.

6.2.2 Einfluss von Gα auf FRET zwischen Gγ und den RH-RhoGEFs

Um zu testen, welchen Einfluss Gα auf die Interaktion von Gγ mit den RH-RhoGEF hat, wurde die Gγ-RhoGEF-Interaktion mit überexprimiertem $G\alpha_q$ statt überexprimiertem $G\alpha_{13}$ gemessen. Dafür wurde der α_{1B}-Rezeptor überexprimiert und mit Noradrenalin (NA) stimuliert.

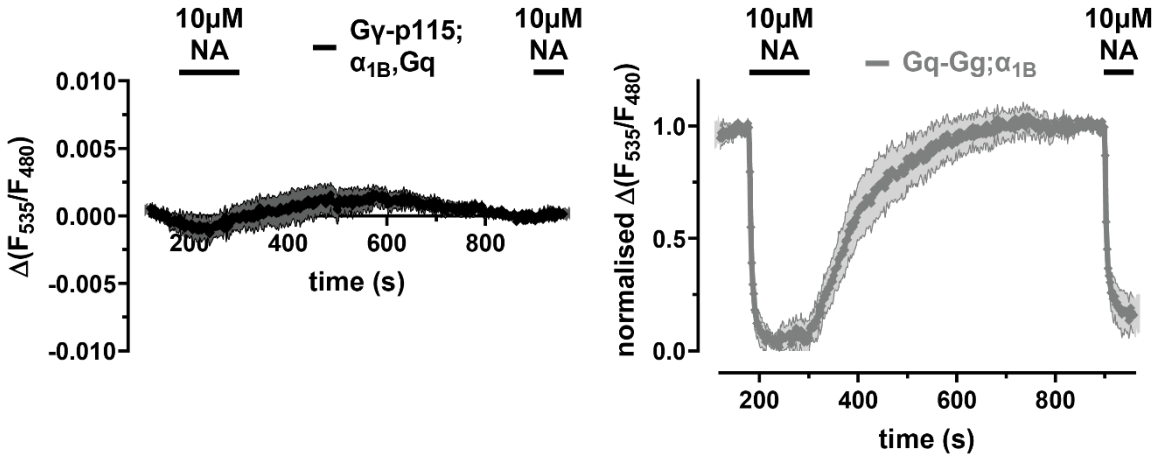

Abbildung 6.38 | Einfluss von Gα auf Gγ-RhoGEF Auf der linken Seite sind Mittelwert ± SEM der FRET-Interaktion (siehe Abbildung 6.6) von Gγ mit p115 in Anwesenheit von überexprimiertem $G\alpha_q$ dargestellt [schwarz, n = 8]. Als Positivkontrolle wurde die G-Protein-Aktivierung (FRET zwischen $G\alpha_q$ und Gγ; beschrieben in 5.5.8) gemessen [grau, n = 5].

Bei der Interaktion von Gγ mit p115 in Anwesenheit von überexprimiertem $G\alpha_q$ statt überexprimiertem $G\alpha_{13}$ zeigt sich keine FRET-Änderung. Um sicherzustellen, dass Gγ in diesem Assay auch wirklich in der aktiven Form vorliegt, wurde der G-Protein-Aktivierungsassay gemessen. Durch die Applikation des Agonisten (NA) in diesem

Assay kam es zu einer starken Änderung der $\Delta(F_{535}/F_{480})$-Ratio, was eine Aktivierung der Untereinheiten stark impliziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion von Gγ mit den RhoGEFs nur in Anwesenheit von $G\alpha_{13}$ stattfindet.

6.2.3 Interaktionskinetik orientiert sich an $G\alpha_{13}$-RhoGEF

Wie bereits in 6.2.1 und Abbildung 6.37 zu sehen war, orientierte sich die Interaktionskinetik der Gγ-RH-RhoGEF-Interaktion stark an der von $G\alpha_{13}$. Wie stark die Interaktion wirklich von $G\alpha_{13}$ abhängt, sollte mit der Mutante $G\alpha_{13}$-R128A (siehe 6.1.11) getestet werden. Diese beeinflusst die Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit p115, sodass diese signifikant langsamer wird. Wäre die Interaktion der Gβγ-Untereinheiten mit den RH-RhoGEFs unabhängig von $G\alpha_{13}$, dürfte die Interaktionskinetik nicht durch die $G\alpha_{13}$-R128A Mutante beeinflusst werden.

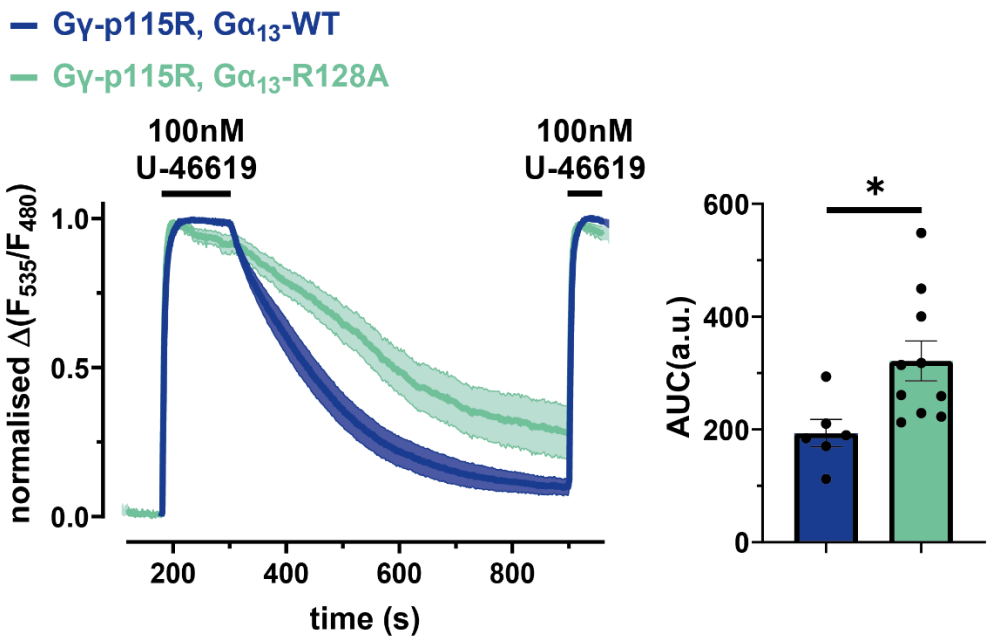

Abbildung 6.39 | Gγ-p115R, $G\alpha_{13}$-WT/$G\alpha_{13}$-R128A Mittelwert ± SEM der Interaktion von Gγ mit p115-R bei gleichzeitiger Überexpression von $G\alpha_{13}$-WT [blau, n = 6, AUC = 193,3] oder der Mutante $G\alpha_{13}$-R128A [türkis, n = 10, AUC = 321,4; *unpaired t-test*, *P = 0,0219] in dem in Abbildung 6.6 beschriebenen FRET-Assay.

Die Interaktion zwischen Gγ und p115R wurde signifikant durch die Mutante $G\alpha_{13}$-R128A verlängert. Dies beweist, dass die Interaktion von Gβγ-Untereinheiten und RH-RhoGEF abhängig von der $G\alpha_{13}$-Untereinheit ist und untermauert die Hypothese, dass sich die Untereinheiten bei der Aktivierung nicht trennen und zusammen an RH-RhoGEFs binden.

6.2.4 Ausschluss von agonistinduziertem bystander-FRET

Ein wichtiges Phänomen, welches als Begründung für die Änderung der $\Delta(F_{535}/F_{480})$-Ratio der Gγ-RH-RhoGEF-Interaktion ausgeschlossen werden muss, ist das bystander-FRET. Beim bystander-FRET kommt es dadurch, dass die Fluorophore zufällig in räumliche Nähe geraten, zu einer Energieübertragung zwischen diesen. Durch die Aktivierung des RhoGEF wird dieses zur Plasmamembran rekrutiert, an welcher sich auch die Gβγ-Untereinheiten befinden. Somit liegt der Verdacht nahe, dass durch die Rekrutierung zur Plasmamembran die RH-RhoGEFs zufällig in räumliche Nähe zu Gγ kommen und dadurch FRET ermöglicht wird. Um agonistinduziertes bystander-FRET auszuschließen, wurde p115-RhoGEF C-terminal mit einer sogenannten CAAX-Box versehen. CAAX steht dabei für die Aminosäure Cystein, gefolgt von zwei aliphatischen Aminosäuren und einer beliebigen Aminosäure (X). Dieses Motiv wird posttranslational prenyliert und fungiert somit als Membrananker (Gao et al., 2009).

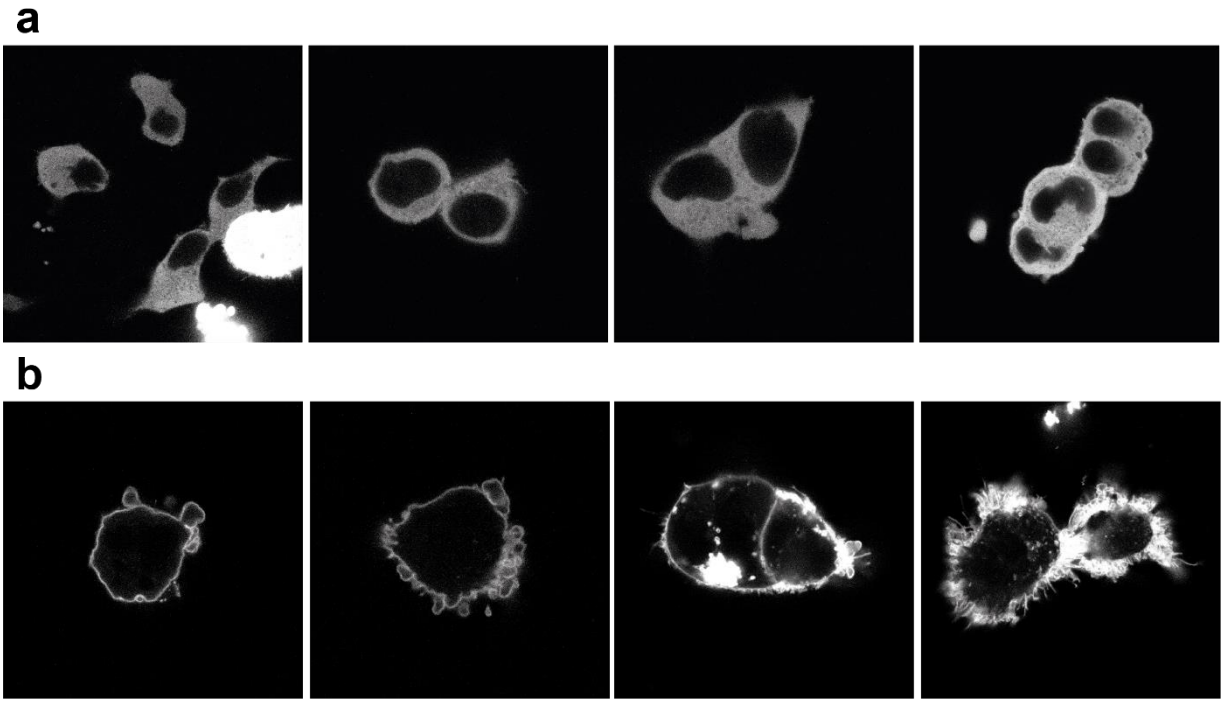

Abbildung 6.40 | YFP-p115-CAAX a) Konfokale Aufnahmen von HEK293T-Zellen, welche transient mit YFP-p115 transfiziert wurden zeigen bei einer Anregung bei 535 nm eine Lokalisation von YFP-p115 im Cytosol. **b)** YFP-p115-CAAX zeigt bei gleichen Bedingungen eine Lokalisation an der Plasmamembran.

Durch das Anbringen der CAAX-Box konnte die Lokalisation von p115-RhoGEF im inaktiven Zustand erfolgreich vom Cytosol zur Plasmamembran verschoben werden. Im Gγ-RH-RhoGEF-Interaktionsassay kommt es somit nicht mehr zur Translokation von p115-RhoGEF zur Plasmamembran, sodass ein agonistinduziertes bystander-FRET ausgeschlossen werden kann, sofern eine agonistinduzierte FRET-Änderung eintritt.

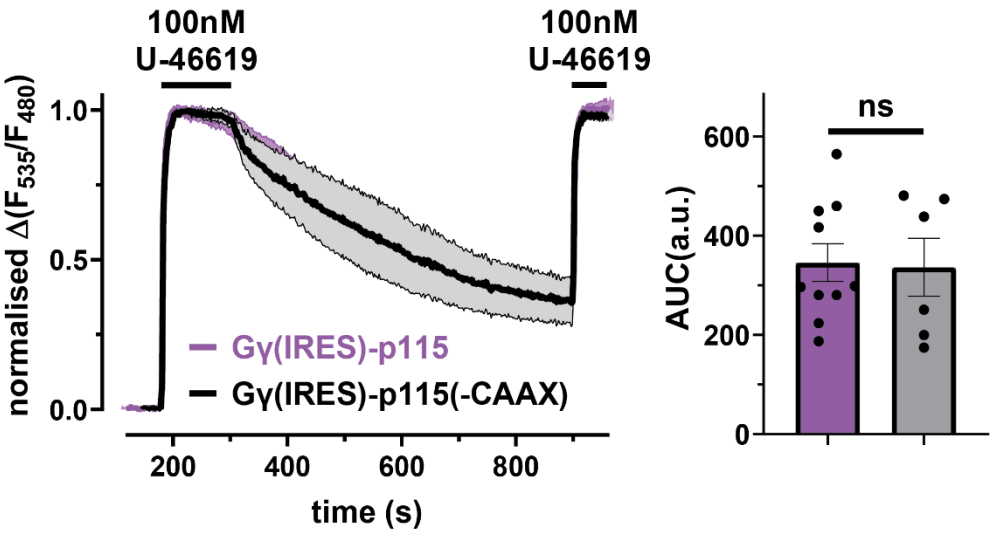

Abbildung 6.41 | Gγ-p115(-CAAX) Mittelwert ± SEM der FRET-Messungen (siehe Abbildung 6.6) der Interaktion von Gγ mit p115(-CAAX) [schwarz, n = 6, AUC = 336.1] im Vergleich zu wt-p115 [lila, Daten aus Abbildung 6.35; *unpaired t-test*; $^{ns}P = 0{,}8890$].

Gγ-p115(-CAAX) zeigte eine stabile FRET-Änderung bei Agonistgabe und eine mit wt-p115 vergleichbare Amplitude. Die Off-Kinetik deckte sich zudem mit wt-p115. Durch diese Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, dass die Änderung der $\Delta(F_{535}/F_{480})$-Ratio bei der Gγ-p115-Interaktion nur durch die Rekrutierung von p115 zur Plasmamembran entsteht. Somit kann ein agonistinduziertes bystander-FRET ausgeschlossen werden.

6.2.5 Trennung der $G\alpha_{13}$/Gβγ -Untereinheiten

Als letzte Versuchsreihe dieses zweiten Projekts wurde die G-Protein Aktivierung in mit p115-RhoGEF überexprimierten Zellen in Anwesenheit und in Abwesenheit von GRK2 (G-Proteingekoppelter Rezeptor-Kinase) gemessen. Da die Hypothese darin besteht, dass sich $G\alpha_{13}$ und Gβγ–Untereinheiten bei der Aktivierung nicht trennen und zusammen an p115-RhoGEF binden, wurde versucht, durch die zusätzliche Überexpression der Gβγ-bindenden GRK2 die Gβγ-Untereinheit zu sequestrieren

(Jiang et al., 2010). Dies setzt voraus, dass die GRK2 durch die Bindung der Gβγ–Untereinheit in der Lage ist, diese von $G\alpha_{13}$ zu trennen. In einem solchen Fall würde man eine höhere Amplitude des FRET-Signals erwarten, da im Fall einer Trennung aller Untereinheiten die maximale Abnahme des FRET-Signals erreicht würde.

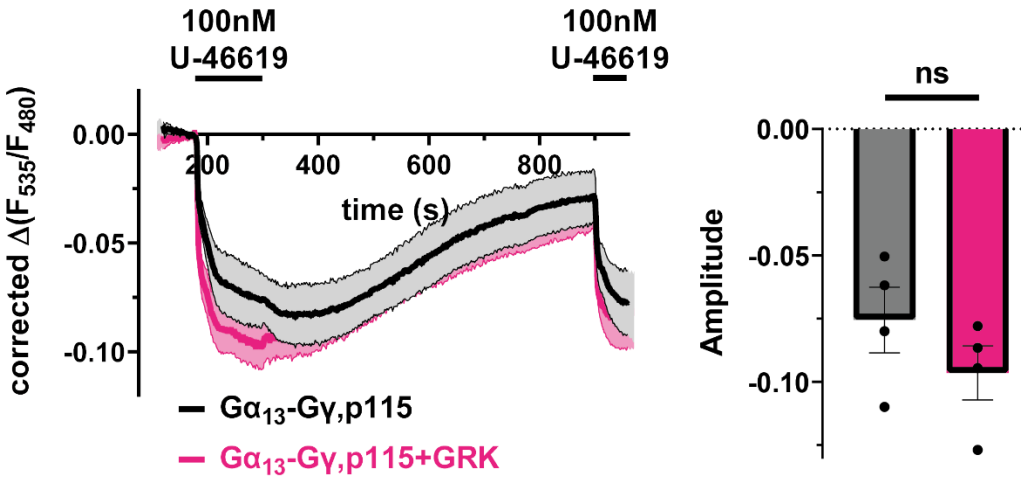

Abbildung 6.42 | $G\alpha_{13}$-Gγ, p115+-GRK Mittelwert ± SEM und Vergleich der Amplituden der G-Protein-Aktivierung ($G\alpha_{13}$-Gγ) in Anwesenheit von überexprimiertem p115, jedoch in Abwesenheit von überexprimierter GRK2 [schwarz, n = 5, Durchschnittsamplitude = -0,07552] und bei zusätzlicher GRK2 Überexpression [pink, n = 4, Durchschnittsamplitude = -0,09648; *unpaired t-test*, ^{ns}P = 0,259] des in 5.5.8 und Abbildung 6.2 beschriebenen FRET-*Assays* ohne Normalisierung.

Da durch die Überexpression der GRK2 keine signifikant höhere Amplitude zu sehen war, konnte man daraus schließen, dass die GRK2 nicht in der Lage ist die Untereinheiten zu trennen. Somit war dieser Assay nicht zur Untersuchung der Trennung der Untereinheiten bei der Aktivierung geeignet.

Zusammenfassend sprechen die Experimente dafür, dass sich $G\alpha_{13}$ und Gβγ bei der Aktivierung von $G\alpha_{13}$ nicht trennen und zusammen an die RH-RhoGEFs, den Effektoren von $G\alpha_{13}$, binden. Die funktionellen Konsequenzen sind jedoch unklar.

Kapitel 7: Diskussion

7.1 $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Interaktion

Um funktionelle Unterscheide in der Familie der RH-RhoGEFs zu untersuchen, wurde die Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit p115-RhoGEF, LARG und PDZ-RhoGEF gemessen, wobei eine spezifische Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit allen drei RH-RhoGEFs gezeigt werden konnte (Abbildung 6.6). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch $G\alpha_{12}$ mit allen drei RH-RhoGEFs im beschriebenen FRET-Assay interagiert (Abbildung 6.7). Es sollte jedoch beachtet werden, dass eine Bindung der RH-RhoGEFs durch $G\alpha_{12}$ (oder auch $G\alpha_{13}$) nicht mit der Aktivierung des entsprechenden RhoGEFs gleichzusetzen ist. Eine Stimulation der GEF-Aktivität durch $G\alpha_{12}$ wurde bisher nur für LARG nachgewiesen (Siehler, 2009). Des Weiteren konnte die Spezifität und Funktionalität (im Sinne einer funktionalen Interaktion) des verwendeten *Assays* bewiesen werden. Einerseits dadurch, dass eine Agonistapplikation zu einem erhöhten $(YFP)^2$/CFP-Signal an der Zellmembran führte und somit zu einer funktionellen Translokation von YFP-p115-RhoGEF zur Plasmamembran (Abbildung 6.3). Anderseits führte die Co-Expression von Gα-Untereinheiten, welche nicht zur $G\alpha_{12/13}$-Familie gehörten, zu keiner Veränderung der $\Delta(F_{535}/F_{480})$-Ratio bei Agonistapplikation (Abbildung 6.4). In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde bereits entdeckt, dass LARG eine ungewöhnlich lange Interaktionszeit mit $G\alpha_{13}$ besitzt, welche mit einer sehr hohen Agonistsensitivität einhergeht (Bodmann et al., 2017) und das, obwohl neben p115-RhoGEF auch für LARG eine *in vitro* GAP (GTPase-aktivierendes Protein)-Aktivität nachgewiesen wurde (Suzuki et al., 2009). Eine Aktivierung der intrinsischen GTPase-Funktion von $G\alpha_{13}$ würde jedoch durch eine schnellere Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP zu einer schnelleren Deaktivierung führen und somit zu einer verkürzten Interaktionszeit mit LARG, welche in den in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Versuchen nicht beobachtet werden konnte, wodurch eine

Diskrepanz zwischen *in vitro* und den neuen *in vivo* Daten entsteht. Dahingehend ist die GAP-Aktivität der RH-RhoGEFs der bestimmende Faktor hinsichtlich der Interaktionslänge zwischen den beiden Proteinen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der $G\alpha_{13}$-PDZ-RhoGEF-Komplex ähnliche *in vivo*-Dissoziationskinetiken aufweist wie der $G\alpha_{13}$-LARG-Komplex, die Interaktion zwischen $G\alpha_{13}$ und p115-RhoGEF jedoch deutlich kürzer war. Gleichzeitig zeigte die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\alpha_{13}$-LARG-Interaktion eine Linksverschiebung verglichen mit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\alpha_{13}$-p115-RhoGEF-Interaktion, was sich in eine höhere Agonistsensitivität übersetzen lässt (Abbildung 6.9). Konträr dazu zeigte die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\alpha_{13}$-PDZ-RhoGEF-Interaktion keine Linksverschiebung (Abbildung 6.10; Erklärungsansätze später in diesem Kapitel).

Durch das Klonieren mehrerer Chimären und trunkierter Konstrukte von p115-RhoGEF und LARG war es möglich, die strukturelle Ursache für diese schnellere Dissoziationskinetik von $G\alpha_{13}$-p115-RhoGEF auf ein Bindemotiv in p115 zu reduzieren. Dabei hatten sowohl die Trunkierung C-terminal der RH-Domäne von p115-RhoGEF (nach Aminosäure 245; p115-R) als auch von LARG (nach Aminosäure 558; LARG-PR; Abbildung 6.13) keinen Effekt auf die AUC der Off-Kinetik. Erst die N-terminale Trunkierung von p115-RhoGEF (Aminosäuren 1-33; p115-Rshort) führte zu einer signifikant langsameren Dissoziation von $G\alpha_{13}$, wobei die Kinetik an die der $G\alpha_{13}$-LARG- und $G\alpha_{13}$-PDZ-RhoGEF-Interaktionen erinnerte. Kürzungen N-terminal der RH-Domäne von LARG (LARG-R und LARG-Rshort) hatten jedoch keinen Effekt auf die Interaktionskinetik mit $G\alpha_{13}$, was bereits auf ein, in der Gruppe der RH-RhoGEFs, einzigartiges Strukturelement im N-terminalen Teil von p115-RhoGEF hinwies (Abbildungen 6.13-6.15). Chimera1, welche die RH-Domäne und den potentiell interaktionsbestimmenden N-terminalen Teil von p115-RhoGEF (Aminosäuren 1-232), sowie den C-Terminus von LARG enthielt (Aminosäuren 559-1544), zeigte ebenfalls eine schnelle Dissoziationskinetik von $G\alpha_{13}$ (Abbildung 6.16). Um, einen signifikanten Einfluss der RH-Domäne selbst an der Interaktion mit $G\alpha_{13}$ ausschießen zu können, wurde dessen Interaktion gemessen. Dabei zeigte die RH-Domäne von

p115-RhoGEF, welche das N-terminale Motiv von p115-RhoGEF somit nicht enthielt, eine deutlich signifikant erhöhte Interaktionszeit mit $G\alpha_{13}$ im Vergleich zu wt-p115-RhoGEF, während die Interaktion der RH-Domäne von LARG mit $G\alpha_{13}$ keinen signifikanten Unterschied zur Interaktion von wt-LARG aufwies (Abbildung 6.17). Dies untermauerte erneut die Wichtigkeit des N-terminalen Teils von p115-RhoGEF für die Interaktion mit $G\alpha_{13}$. Gleichzeitig konnte durch den Tausch der RH-Domänen in p115-RhoGEF und LARG (Chimera2: p115 mit inserierter RH-Domäne von LARG; Chimera3: LARG mit inserierter RH-Domäne von p115; Abbildung 6.18) bewiesen werden, dass diese keinen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion mit $G\alpha_{13}$ haben, da sich beide Chimären entsprechend ihrer wt-Proteine verhielten. In diesem N-terminalen Abschnitt von p115-RhoGEF befindet sich die rgRGS-Bindedomäne (rgRGS= RhoGEF-Fragment, welches sowohl das N-terminale GAP-Motiv als auch die RH-Domäne besitzt), welche bereits in einer entsprechenden Röntgen-Kristallstruktur mit einer Chimäre aus $G\alpha_{13}$ und $G\alpha_i$ (Chen et al., 2005) und nativem $G\alpha_{13}$ (Hajicek et al., 2011) aufgelöst wurde. In dieser ist eine wichtige Interaktion des rgRGS-Motivs mit der α-helikalen Domäne des G-Proteins zu beobachten.

Beim Vergleich des entsprechenden rgRGS-Bindemotives in p115-RhoGEF mit dem von LARG (Abbildung 6.19) wurden zwei Unterschiede in der Aminosäuresequenz klar. LARG besitzt die saure Aminosäure Asparaginsäure (D356) statt der sauren Aminosäure Glutaminsäure (p115 E29) und das unpolare Glycin (G359) statt der sauren Glutaminsäure (E32). Sowohl E29 als auch E32 in p115-RhoGEF bilden in der Kristallstruktur wichtige polare Interaktionen mit T127 und R128 in der α-helikalen Domäne von $G\alpha_{13}$ (Abbildung 6.20). Obwohl sich das Bindemotiv in PDZ-RhoGEF (Abbildung 6.19) deutlich von dem der anderen RH-RhoGEFs unterscheidet, findet man auch hier an entsprechender Stelle (P299) keine saure Aminosäure. Die polare Interaktion zwischen E29 und E32 aus p115-RhoGEF und T127 und R128 aus $G\alpha_{13}$ erwies sich jedoch als potentiell problematisch für den in dieser Arbeit gemessenen *Assay*, da das Fluorophor in $G\alpha_{13}$ genau zwischen den Aminosäuren 127 und 128 inseriert wurde ($G\alpha_{13}$(127)). Obwohl die von GFP abstammenden Fluorophore (somit

auch mTurq2) eine Schleife bilden und der N- und C-Terminus des Fluorophors somit nah aneinander liegen, wäre es potentiell möglich, dass die Interaktion mit den RH-RhoGEFs durch die Inserierung an dieser Stelle gestört werden könnte. Um dies auszuschließen, wurden zwei unabhängige Methoden verwendet, um $G\alpha_{13}$(127) mit einem neu klonierten $G\alpha_{13}$ zu vergleichen, in welchem das Fluorophor mTurq2 nach Aminosäure 135 inseriert wurde und somit davon ausgegangen werden kann, dass die polare Interaktion durch das Fluorophor nicht gestört wird. Einerseits wurde die etablierte FRET-Einzelzellmessung verwendet, um $G\alpha_{13}$(127) und $G\alpha_{13}$(135) in der Interaktion sowohl mit p115-RhoGEF als auch LARG zu vergleichen. Die Untersuchungen ergaben keine signifikanten Unterschiede für die Interaktion mit beiden RhoGEFs (Abbildung 6.21), was bewies, dass die Interaktion nicht durch die Inserierung des Fluorophors zwischen den Aminosäuren 127 und 128 gestört wurde. Als zweite Methode wurde ein BRET-*Assay* verwendet, bei welchem im 96-*well* Platten-Format im Plattenleser eine Verdünnungsreihe der Agonistkonzentration gegen eine Agonistkonzentration gemessen wurde, welche einen Maximaleffekt erwirkte. Dadurch konnten für beide $G\alpha_{13}$-Konstrukte Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit p115-RhoGEF ermittelt werden, welche ähnliche EC_{50}-Werte aufwiesen (Abbildung 6.22). Somit bestätigte auch dieser *Assay* die Funktionalität beider Konstrukte in ihrer Fähigkeit, RH-RhoGEFs zu binden.

Die Mutation der sauren Aminosäure E32 in p115-RhoGEF zur unpolaren Aminosäure Glycin führte zur wichtigsten Entdeckung dieser Arbeit. Die Interaktionszeit der p115-E32G Mutante mit $G\alpha_{13}$ erhöhte sich signifikant auf ein Niveau, welches zuvor für die Interaktionen von $G\alpha_{13}$-LARG und $G\alpha_{13}$-PDZ-RhoGEF beobachtet worden war (Abbildung 6.23). E32 in p115-RhoGEF bildet in der Röntgen-Kristallstruktur (Chen et al., 2005) eine polare Interaktion mit Arginin 128 (R128) in der α-helikalen Domäne von $G\alpha_{13}$ aus. Die bei p115-RhoGEF beobachtet GAP-Aktivität gegenüber $G\alpha_{13}$, welche bei den anderen Vertretern der RH-RhoGEFs *in vivo* nicht vorhanden zu sein scheint, hängt somit maßgeblich von einer einzigen polaren Interaktion ab, welche durch die Punktmutation in der Mutante p115-E32G unterbunden werden konnte. Passend dazu

zeigte p115-E32G ebenfalls eine höhere Agonistsensitivität gegenüber wt-p115-RhoGEF (Abbildung 6.24). Das Verhindern dieser polaren Interaktion auf der Seite von $G\alpha_{13}$ durch die Mutation von Arginin 128 zur unpolaren Aminosäure Alanin (Mutante $G\alpha_{13}$-R128A) führte ebenfalls zu einer signifikant langsameren Dissoziation von wt-p115. Wie zu erwarten zeigte die Mutante $G\alpha_{13}$-R128A aber keinen Unterschied in der Interaktion mit LARG im Vergleich zu wt-$G\alpha_{13}$ (Abbildung 6.25). Dies bestätigte erneut, dass die polare Interaktion, welche GAP-Aktivität ermöglicht, nur in p115-RhoGEF vorhanden ist und nicht in LARG. Die Mutante $G\alpha_{13}$-R128A, welche die polare Interaktion entsprechend unterbindet, hatte keinen Einfluss auf die Interaktion mit LARG. Kein zusätzlicher Effekt wurde bei der gleichzeitigen Verwendung beider Mutanten (p115-E32G und $G\alpha_{13}$-R128A) beobachtet (Abbildung 6.25).

Das Phänomen, dass eine zusätzliche Interaktion zwischen zwei Proteinen deren Dissoziation voneinander beschleunigt ist selten. Für die rgRGS-Domäne wurde bereits zuvor beschrieben, dass sie zur GAP-Aktivität der RH-RhoGEFs beiträgt (Chen et al., 2001, 2003, 2005). Für p115-RhoGEF und LARG wurde *in vitro* GAP-Aktivität nachgewiesen (Suzuki et al., 2009), jedoch nicht für PDZ-RhoGEF. Allerdings war es möglich eine weniger potente *in vitro* GAP-Aktivität auf PDZ-RhoGEF zu übertragen, indem das EDEDF-Motiv aus p115-RhoGEF (siehe Abbildung 6.19), welches sich eine Aminosäure neben E32 befindet, in PDZ-RhoGEF kloniert wurde (Chen et al., 2008). Da E32 aus p115 nicht in PDZ-RhoGEF inseriert wurde, die entsprechende Chimäre aber trotzdem GAP-Aktivität zeigte, scheint E32 nicht kritisch für die *in vitro* GAP-Aktivität der RH-RhoGEFs zu sein. Die Daten aus dieser Arbeit demonstrierten jedoch deutlich, dass E32 in p115 entscheidend für *in vivo* GAP-Aktivität ist. Das rgRGS-Bindemotiv wurde auch in LARG mit einer erhöhten *in vitro* GAP-Aktivität in Verbindung gebracht (Suzuki et al., 2009). Die Experimente dieser Arbeit stützen dieses Konzept *in vivo* nicht, da weder LARG, noch PDZ-RhoGEF die Deaktivierung von $G\alpha_{13}$ in intakten, lebenden Zellen beschleunigten. Die Dissoziation dieser beiden RH-RhoGEFs von $G\alpha_{13}$ nach dem Entzug von Agonist war langsam und keinesfalls schneller als die Entstehung der $G\alpha_{13}$-$G\beta\gamma$ Bindung in Abwesenheit von co-

exprimierten RH-RhoGEFs (Abbildung 6.6, Bodmann et al., 2017). Zusätzlich zeigten die RH-Domänen von p115-RhoGEF und LARG (ohne das entsprechende N-terminale Motiv, welches für die $G\alpha_{13}$ GAP-Aktivität unabdingbar ist) nach Agonistentzug in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$ Dissoziationskinetiken, welche mit denen von *full length* LARG und PDZ-RhoGEF vergleichbar sind, aber in jedem Fall signifikant langsamer als die Dissoziationskinetik von $G\alpha_{13}$-p115 (Abbildungen 6.17).

In der Interaktion der $G\alpha_{13}$-R128A-Mutante (welche wie bereits beschrieben die polare Interaktion von $G\alpha_{13}$ R128 mit p115 E32 unterbindet, die entscheidend für die GAP-Aktivität von p115-RhoGEF ist) mit LARG und PDZ-RhoGEF konnte kein Unterschied zur Interaktion mit wt-$G\alpha_{13}$ festgestellt werden (Abbildungen 6.25 und 6.26). Diese Ergebnisse suggerierten erneut, dass in intakten Zellen beide dieser RH-RhoGEFs zu keinem detektierbaren Grad an GAP-Aktivität gegenüber $G\alpha_{13}$ führten, obwohl *in vitro* GAP-Aktivität von LARG bereits beschrieben wurde (Suzuki et al., 2009). Bisher ist die Ursache für diesen Unterschied zwischen *in vitro* und *in vivo* Daten nicht bekannt. In dieser Arbeit ist es nicht gelungen, die genaue Ursache für die langsame *in vivo* Dissoziationskinetik der $G\alpha_{13}$-LARG-Interaktion zu finden. Des Weiteren war es nicht möglich, die funktionelle GAP-Aktivität von p115-RhoGEF zu übertragen, ohne große Teile des Proteins auszutauschen. Das Einführen einer Punktmutation der unpolaren Aminosäure Glycin (G359) im rgRGS-Bindemotiv von LARG zur sauren Aminosäure Glutaminsäure, welche die polare Wechselwirkung mit $G\alpha_{13}$ R128 und somit GAP-Aktivität ermöglichen sollte, führte zur Mutante LARG-G359E. Interessanterweise ergab sich durch die Mutation kein signifikanter Unterschied gegenüber wt-LARG in der $G\alpha_{13}$-Dissoziationskinetik (Abbildung 6.27). Die GAP-Aktivität konnte somit nicht durch das Austauschen einer einzelnen Aminosäure übertragen werden. Weder durch die Insertion des N-terminalen Bindemotives von p115 (Chimera4, Abbildung 6.28; Aminosäuren 20-43 von p115 statt LARG 346-369), der Insertion des kompletten N-Terminus von p115 mit anhängendem N-Terminus von LARG (Chimera5, Abbildung 6.29; Aminosäuren 2-43 von p115 statt LARG 328-369), noch die Insertion des kompletten N-Terminus von p115 ohne anhängendem N-Terminus von LARG

(Chimera6, Abbildung 6.30; Aminosäuren 1-43 von p115 statt LARG 1-369) konnte die Funktionalität erzeugen, welche für eine GAP-Aktivität gegenüber LARG von Nöten wäre. Ein Konstrukt, welches wie Chimera6 aufgebaut war, aber zusätzlich die RH-Domäne von p115-RhoGEF statt LARG enthält, zeigte jedoch eine schnelle Dissoziationskinetik von $G\alpha_{13}$ (Chimera1, Abbildung 6.16). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das komplette rgRGS-Motiv von p115 für die GAP-Aktivität benötigt wird (N-terminaler Teil und RH-Domäne). Auf der anderen Seite zeigte Chimera7 (Abbildung 6.31), welche wie Chimera6 aufgebaut ist, jedoch einen trunkierten C-Terminus besitzt (nach Aminosäure 561), eine schnelle Dissoziationskinetik und das, obwohl Chimera7 die RH-Domäne von LARG enthält. Zusätzlich zeigte Chimera9 (Abbildung 6.33), welche das komplette rgRGS-Motiv von p115-RhoGEF enthält (Aminosäuren 1-232) und zusätzlich den C-Terminus von LARG (Aminosäuren 559-1544), eine signifikant schnellere Dissoziationskinetik von $G\alpha_{13}$ gegenüber wt-LARG. Aus diesem Grund wurde spekuliert, dass der C-Terminus von LARG ein (sterisches) Hindernis darstellen könnte. Jedoch resultierten die Messungen von Chimera8 (Abbildung 6.32), eine Chimera4, bei der der C-Terminus trunkiert wurde (Aminosäuren 559-1544 von LARG wurden entfernt), in einer deutlich langsameren $G\alpha_{13}$-Dissoziationskinetik. Diese Ergebnisse suggerieren einerseits, dass der C-Terminus von LARG die Formation funktioneller GAP-Aktivität behindern kann andererseits scheint es für die GAP-Aktivität von Vorteil zu sein, wenn das komplette rgRGS-Motiv vorhanden ist. Jedoch ist dabei die GAP-Aktivität allein durch das Vorhandensein der RH-Domäne von LARG nicht auszuschließen. Wichtig zu erwähnen ist, dass die Interaktion der Mutante $G\alpha_{13}$-R128A mit allen drei RH-RhoGEFs die gleiche, langsame Dissoziationskinetik zeigte (Abbildungen 6.25 und 6.26), was bekräftigt, dass die polare Interaktion mit $G\alpha_{13}$ R128 entscheidend für die beobachteten Unterschiede der Interaktionskinetiken der RH-RhoGEFs ist. Ob und warum diese polare Interaktion mit den vielen Chimären, beziehungsweise der Punktmutante LARG-G359E, nicht ausgebildet werden konnte, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Obwohl die LARG-G359E Mutante und die Chimären aus LARG und p115-RhoGEF nicht dazu in der Lage waren GAP-Aktivität auf $G\alpha_{13}$ auszuüben, sind sie dennoch funktionell hinsichtlich ihrer GEF-Aktivität und somit hinsichtlich ihrer Fähigkeit RhoA und andere kleine GTPasen der Rho-Familie zu aktivieren. Um die Funktionalität verschiedener Konstrukte zu testen, wurde ein Assay verwendet, welcher die SRF Expression misst (*SRF Reporter Assay*). Bei diesem Dual-Luciferase Assay ist die Expression einer ersten Luciferase von der SRF-Expression abhängig und konnte durch die konstitutive Expression einer zweiten Luciferase normalisiert werden. Dabei zeigten Zellen, welche mit YFP-p115 oder mit YFP-LARG transfiziert wurden eine signifikante SRF-Expression, also eine Aktivierung des $G\alpha_{13}$-RhoGEF-RhoA Signalweges und somit eine Funktionalität ihrer GEF-Funktion gegenüber RhoA. Auch zwei beispielhaft ausgewählte Chimären aus p115-RhoGEF und LARG (Chimera1, Abbildung 6.16 und Chimera5, Abbildung 6.29) zeigten eine signifikant höhere relative Luciferase-Aktivität gegenüber der Negativkontrolle pcDNA3 und somit GEF-Aktivität gegenüber RhoA. Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass alle in dieser Arbeit generierten Chimären, welche einen intakten C-Terminus besitzen (inklusive DH- und PH-Domäne) funktionell hinsichtlich ihrer GEF-Aktivität gegenüber RhoA sind. Das Austauschen einzelner Aminosäuren oder Abschnitte innerhalb des N-terminalen Bereichs oder der RH-Domäne stört diese Funktionalität nicht, sodass auch eine Chimäre aus dem N-terminalen Teil inklusive der RH-Domäne von p115-RhoGEF und dem C-Terminus von LARG (Chimera1, Abbildung 6.16) signifikante GEF-Aktivität zeigte. Im Gegensatz dazu zeigte p115-R, eine trunkierte Variante von p115-RhoGEF (Abbildung 6.13), welche keine DH/PH-Domäne mehr besitzt, keine signifikante relative Luciferase-Aktivität, wodurch sich ergibt, dass für GEF-Aktivität gegenüber RhoA mindestens die DH/PH-Domänen vorhanden sein müssen. Dies ist nicht verwunderlich, da die DH-Domäne die Bindedomäne für Effektoren darstellt und die PH-Domäne oft für dessen Aktivierung benötigt wird (Abbildung 6.34).

Die Konsequenz einer funktionalen Interaktion der rgRGS-Domäne von p115 mit $G\alpha_{13}$ sind nicht nur schnellere Dissoziationskinetiken, sondern auch eine signifikant reduzierte Agonistsensitivität. Dies zeigte sich in einer Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-kurve der Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit der Mutante p115-E32G (Abbildung 6.24), welche diese funktionale Interaktion entsprechend verhinderte, im Vergleich zur Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit wt-p115. Nicht nur die Dissoziationskinetik in der Interaktion mit $G\alpha_{13}$ von p115-E32G war ähnlich zu der von LARG, sondern auch deren Agonistsensitivität, wodurch eine kausale Verbindung zwischen Interaktionskinetik und Agonistsensitivität entsteht. Verglichen mit LARG war die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von PDZ-RhoGEF mit $G\alpha_{13}$ rechtsverschoben, obwohl beide RH-RhoGEFs eine ähnliche Dissoziationskinetik zeigten (Abbildungen 6.9, 6.10 und 6.11). Die On-Kinetik (die Kinetik der Bildung des Protein-Komplexes) zwischen $G\alpha_{13}$ und PDZ-RhoGEF war jedoch signifikant langsamer als bei den anderen RH-RhoGEFs (Abbildung 6.11). Dies führte zur Hypothese, dass die Komplexformation zwischen $G\alpha_{13}$ und PDZ-RhoGEF entsprechend langsamer ist und somit eine geringere Agonistsensitivität im *steady state* im Vergleich zu LARG besteht. Die anscheinend geringere Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von $G\alpha_{13}$ und PDZ-RhoGEF (Abbildung 6.10) sollte nicht überinterpretiert werden, da die erhaltenen Amplituden der $G\alpha_{13}$-PDZ-RhoGEF Interaktion deutlich kleiner waren als bei den anderen RH-RhoGEFs (Abbildung 6.12). Das somit reduzierte Signal-Rausch-Verhältnis kann zu größeren potentiellen Fehler führen.

7.2 Gβγ-RH-RhoGEF-Interaktion

Ein weiteres Projekt war die Untersuchung der Gβγ-RH-RhoGEF-Interaktion. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass es RhoGEFs gibt, welche über Gβγ aktiviert werden können, auch wenn diese wenig untersucht sind (siehe 3.2.1). Beispiele hierfür ist die P-Rex-Unterfamilie, p114-RhoGEF, Clg und Tim/Arhgef (Aittaleb et al., 2010). Ob RH-RhoGEFs mit Gβγ-Untereinheiten interagieren, oder sogar von diesen aktiviert werden können, wurde bisher noch nicht untersucht und war somit ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl mit dem Donor-Fluorophor mTurq2 markierte Gβ- als auch Gγ-Untereinheiten eine Änderung des $\Delta(F_{535}/F_{480})$-Ratios in der Interaktion mit p115-RhoGEF und LARG aufweisen. Das Akzeptor-Fluorophor YFP war, wie bei den $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF Experimenten auch, N-terminal an das entsprechende RhoGEF angehängt. Durch diesen *Assay* konnte gezeigt werden, dass Gβ- und Gγ-Untereinheiten durch die Aktivierung des überexprimierten Thromboxan-Rezeptors (TPα) in räumliche Nähe zu p115-RhoGEF und LARG kamen (Abbildung 6.35 und 6.36). In anschließenden Experimenten galt es herauszufinden, wie diese Änderung der $\Delta(F_{535}/F_{480})$-Ratio zu Stande kommt. Folgende Fragen waren somit: Binden Gβγ–Untereinheiten bei deren Aktivierung an RH-RhoGEFs, oder sehen wir hier nur eine zufällige FRET-Änderung (bystander-FRET)? Ist diese Bindung abhängig von der Aktivierung von $G\alpha_{13}$, oder ist sie auch durch die Aktivierung anderer Gα–Untereinheiten möglich? Geschieht diese Bindung unabhängig von der Bindung von $G\alpha_{13}$ an die RH-RhoGEFs?

Einen ersten Hinweis auf die Beantwortung dieser Fragen fand sich durch den Vergleich der Off-Kinetiken. Beim Vergleich der AUC der Off-Kinetik (somit der Länge der Interaktion) von Gγ (exprimiert im IRES-Vektor, was vorteilhaft für die Stöchiometrie ist) mit p115-RhoGEF zeigte sich, dass diese nicht signifikant unterschiedlich zur Off-Kinetik der $G\alpha_{13}$-Interaktion mit p115 ist. Beide Interaktionen zeigten somit die gleiche Kinetik (Abbildung 6.37). Obwohl dieser Effekt bei der

Interaktion mit LARG weniger stark ausgeprägt war, konnte auch hier kein Unterschied zur Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit LARG ermittelt werden. Hinzu kommt, dass die Dissoziationskinetiken der Gγ-p115 und Gγ-LARG Interaktionen signifikant unterschiedlich sind, wie es auch bei $G\alpha_{13}$ der Fall ist (Abbildung 6.37). Die Ergebnisse dieses Assays untermauern die Annahme, dass die Interaktion von Gβγ mit den RH-RhoGEFs abhängig von $G\alpha_{13}$ ist. Am wahrscheinlichsten ist es hierbei, dass das gesamte Heterotrimer bei der Aktivierung zusammen an das RH-RhoGEF bindet und sich die Untereinheiten bei der Aktivierung nicht trennen, wie dies normalerweise bei der Aktivierung von G-Proteinen der Fall wäre. Jedoch wurde bereits gezeigt, dass sich $G\alpha_{13}$ und Gβγ nicht immer trennen (Bünemann et al., 2003; Bodmann et al., 2017).

Ob die Gγ-RH-RhoGEFs Interaktion wirklich abhängig von $G\alpha_{13}$ ist, wurde in einem weiteren Experiment ergründet. Bei diesem wurde wie im Standard-FRET-*Assay* Gγ-mTurq2 und YFP-p115 exprimiert, jedoch wurden der TPα-Rezeptor und $G\alpha_{13}$ ausgetauscht für den α_{1B}-Rezeptor und $G\alpha_q$. Die Aktivierung des α_{1B}-Rezeptors durch Noradrenalin führt zur Aktivierung von $G\alpha_q$ und somit auch zur Aktivierung der Gβγ-Untereinheiten. Dass dies wirklich der Fall ist, wurde mit einem G-Protein-Aktivierungsassay bestätigt (Abbildung 6.38, grau). Die Aktivierung von Gβγ-Untereinheiten über diesen Signalweg ($G\alpha_q$-Aktivierung) führte jedoch nicht zu einer Änderung der $\Delta(F_{535}/F_{480})$-Ratio (Abbildung 6.38 schwarz). Folglich kamen Gβγ-Untereinheiten nicht in räumliche Nähe mit RH-RhoGEFs, wodurch eine Gβγ-RH-RhoGEFs-Interaktion ausgeschlossen werden kann. Diese Resultate bestätigten die Hypothese, dass die Gβ/γ-RH-RhoGEFs-Interaktion von der Aktivierung von $G\alpha_{13}$-Untereinheiten abhängig ist.

In welchem Maße die AUC der Off-Kinetik der Gγ-RH-RhoGEFs-Interaktion von der $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEFs-Interaktion abhängig ist, sollte mit der Mutante $G\alpha_{13}$-R128A (siehe 6.1.11) getestet werden. Diese beeinflusst die Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit p115, sodass deren Off-Kinetik signifikant langsamer wird. Der Einsatz dieser Mutante führte auch im Gγ-p115R-*Assay* zu einer signifikanten Verlangsamung der Off-Kinetik und somit zu einer längeren Interaktionszeit (Abbildung 6.39). Dies beweist, dass die Kinetik der

Gβγ-Interaktion mit den RH-RhoGEFs vollständig von der $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Interaktion abhängig ist. Somit ist es mehr als plausibel, dass sich die Untereinheiten bei der Aktivierung von $G\alpha_{13}$ nicht trennen und zusammen an die RH-RhoGEFs binden.

Es konnte auch bewiesen werden, dass die FRET-Änderung von Gγ-p115 nicht dadurch entstanden ist, dass p115-RhoGEF zur Zellmembran rekrutiert wird und somit zufällig in räumliche Nähe von Gγ kommt (bystander-FRET). Durch das Versehen von p115-RhoGEF mit einer CAAX-Box konnte p115 auch im inaktiven Zustand an der Plasmamembran verankert werden (Abbildung 6.40), eine Relokation durch die Aktivierung wird somit verhindert. Trotzdem zeigte sich auch mit p115-CAAX in der Interaktion mit Gγ eine stabile Änderung des FRET-Signals, welches zusätzlich die gleiche Kinetik wie die Interaktion mit wt-p115 besaß (Abbildung 6.41). Dadurch ist ersichtlich, dass die beobachtete FRET-Änderung durch eine spezifische Annäherung der beiden Proteine zustande kommt, was die Hypothese, dass das Heterotrimer bei Aktivierung assoziiert an die RH-RhoGEFs bindet weiterhin festigt.

Durch die Überexpression von GRK2 war es nicht möglich, die Gβγ-Untereinheit von der $G\alpha_{13}$ zu trennen (Abbildung 6.42). Die GRK2 ist in der Lage, freie Gβγ-Untereinheiten zu sequestrieren (Jiang et al., 2010). Dass dies hier nicht möglich ist, weist wie die vorherigen Experimente darauf hin, dass das Heterotrimer bei der Aktivierung von $G\alpha_{13}$ zusammen an seine Effektoren bindet. Dafür spricht einerseits, dass sich sowohl mit Gβ, als auch mit Gγ Änderungen der $\Delta(F_{535}/F_{480})$-Ratio durch Rezeptoraktivierung im Interaktionsassay mit den RH-RhoGEFs zeigen. Andererseits entspricht die dabei entstehende Interaktionskinetik der der $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF Interaktion, was der stärkste Indikator dafür ist, dass sich die Untereinheiten bei der Aktivierung nicht trennen. Zusätzlich lässt sich ohne überexprimiertes $G\alpha_{13}$ keine Gγ-RH-RhoGEF-Interaktion messen. Alles in Allem suggerieren die Ergebnisse eine hohe Wahrscheinlichkeit für die gemeinsame Bindung der Untereinheiten an den Effektor. Dadurch scheint es sehr unwahrscheinlich, dass Gβγ-Untereinheiten auch ohne

überexprimiertes $G\alpha_{13}$ an RH-RhoGEFs binden würden, oder diese sogar aktivieren könnten.

7.3 Methoden

Die Methode, welche in dieser Arbeit hauptsächlich verwendet wurde um wissenschaftliche Fragen zu beantworten ist der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). FRET ist eine geeignete Methode, um die Interaktion zweier Proteine in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung zu betrachten. In dem in dieser Arbeit verwendeten Interaktionsassay wurde die $G\alpha_{13}$-Untereinheit mit CFP markiert, während die verschiedenen RH-RhoGEFs mit YFP markiert wurden. Bei Agonistapplikation kam es zu einer erhöhten $\Delta F_{535}/F_{480}$-Ratio. Die Zunahme der $\Delta F_{535}/F_{480}$-Ratios wird oft als Interaktion zwischen den beiden markierten Proteinen interpretiert, jedoch muss hier beachtet werden, dass nicht eine Interaktion an sich dargestellt wird, sondern ein Zusammenkommen (<10 nm) der Fluorophore. Das Erreichen einer räumlichen Nähe, welche FRET ermöglicht, ist zwar sehr wahrscheinlich das Resultat einer Interaktion der beiden markierten Proteine, das ist jedoch nicht von Natur aus gegeben. Ein zufälliges Zusammenkommen der Fluorophore, beispielsweise durch Relokation bestimmter Proteine in der Zelle durch Aktivierung, nennt sich bystander-FRET. Agonistinduziertes bystander-FRET wird im besten Fall ausgeschlossen, oder es werden andere Vergleichsmessungen durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die beobachtete FRET-Änderung wirklich der Interaktion der markierten Proteine entspricht. Dies geschah beim $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Interaktionsassays durch die Messung von $G\alpha_i$-RH-RhoGEF, welche keine Änderung der $\Delta F_{535}/F_{480}$-Ratio zeigte und somit die spezifische Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit den RH-RhoGEFs bekräftigte (Abbildung 6.4).

Bei der Messung der Gβγ-RH-RhoGEF-Interaktionen gestaltete sich die Interpretation der Signale als deutlich schwieriger. Zum einen musste hier ein agonistinduziertes bystander-FRET ausgeschlossen werden, da die RH-RhoGEFs durch Aktivierung aus

dem Cytosol zur Zellmembran rekrutiert werden, an welcher sich auch die markierten Gβγ-Untereinheiten befanden. Ein agonistinduziertes bystander-FRET durch die zufällige räumliche Nähe an der Zellmembran wäre somit theoretisch möglich gewesen, wurde aber experimentell ausgeschlossen (siehe 6.2.4). Zum anderen mussten die Messungen der G-Protein-Aktivierung ($G\alpha_{13}$- Gβγ) interpretiert werden (siehe 6.2.5 und 7.2). Im Fall des G-Protein-Aktivierungsassays ist das initiale $\Delta F_{535}/F_{480}$-Signal hoch, da sich die beiden Fluorophore bereits zu Beginn der Messung in räumlicher Nähe befinden. Durch Agonistapplikation wird der transfizierte Rezeptor aktiviert und somit auch das heterotrimere G-Protein, was in den meisten Fällen zur Trennung der Gα- von der Gβγ-Untereinheit führt. Erwartungsgemäß würde hier eine Abnahme des $\Delta F_{535}/F_{480}$-Signals beobachtet werden, da sich der Abstand zwischen den Untereinheiten erhöht und die FRET-Effizienz somit abnimmt. Diese ist jedoch wie in 5.5.1 beschrieben nicht nur vom Abstand der Fluorophore, sondern auch von dessen Orientierung zueinander abhängig. Das führt dazu, dass eine Agonistapplikation bei der Messung des G-Protein-Aktivierungsassays auch zu einer weiteren Erhöhung der $\Delta F_{535}/F_{480}$-Ratio führen kann, nämlich dann, wenn sich die Untereinheiten nicht trennen und die Reorientierung der Untereinheiten zueinander FRET begünstigt. Jedoch kann derselbe Grund zu einer entsprechenden Erniedrigung führen, nämlich indem die Reorientierung der Untereinheiten zueinander FRET behindert. Dies erschwert die Interpretation dieser Messungen stark, da von einer Abnahme des $\Delta F_{535}/F_{480}$-Signals nicht darauf geschlossen werden kann, ob sich die Untereinheiten bei der Aktivierung trennen. Aus diesem Grund sollten Interpretationen von Messungen der G-Protein-Aktivierung immer mit ergänzenden Messungen untermauert werden, wie es auch in dieser Arbeit der Fall war.

Auch bei FRET-Messungen muss darauf geachtet werden, dass erhaltene Messergebnisse nicht überinterpretiert werden. Trotzdem stellt FRET eine elegante Methode zur Beobachtung von Protein-Protein-Interaktionen und deren Kinetik in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung dar und war somit eine geeignete Methode zur Untersuchung des Sachverhalts dieser Arbeit.

7.4 Abschließende Worte

Im Angesicht der Vielfalt an Krankheiten, bei denen die $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-RhoA-Signalkaskade beteiligt ist, wäre es wichtig, die funktionelle Rolle der verschiedenen RH-RhoGEFs *in vivo* zu verstehen. Die Expressionslevel der einzelnen RH-RhoGEFs in verschiedenen Geweben unterscheiden sich zum Teil stark (Siehler, 2009), was die Identifikation von physiologischen oder pathophysiologischen Rollen in Korrelation zu funktionellen Unterschieden erschwert. Dahingehend bieten die Punktmutationen $G\alpha_{13}$-R128A und p115-E32G nützliche Werkzeuge, um die physiologischen Konsequenzen der unterschiedlichen G-Protein-Interaktionskinetiken mit den RH-RhoGEFs näher zu untersuchen. Durch die Identifikation der für die GAP-Aktivität gegenüber $G\alpha_{13}$ entscheidenden Interaktion sind die Grundlagen für weiterführende Arbeiten gesetzt. Auch die in dieser Arbeit entstandenen Chimären können als spannende Ansätze für *in vivo*-Untersuchungen dienen, da diese unterschiedliche Interaktionskinetiken mit $G\alpha_{13}$ zeigten und somit dessen funktionelle Rolle im Organismus weitere Einsichten bringen könnte, besonders auch deshalb, weil bei den generierten Chimären eine funktionelle GEF-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Ebenfalls bietet die Erkenntnis, dass sich die $G\alpha_{13}$- und $G\beta\gamma$-Untereinheiten während der Aktivierung sehr wahrscheinlich nicht trennen, spannende Ansatzpunkte, um funktionelle Konsequenzen zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

Aittaleb, M., Boguth, C.A., and Tesmer, J.J.G. (2010). Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. Mol. Pharmacol. *77*: 111–25.

Aittaleb, M., Gao, G., Evelyn, C.R., Neubig, R.R., and Tesmer, J.J.G. (2009). A conserved hydrophobic surface of the LARG pleckstrin homology domain is critical for RhoA activation in cells. Cell. Signal. *21*: 1569–1578.

Alexander, S.P.H., Christopoulos, A., Davenport, A.P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J.A., et al. (2019). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors. Br. J. Pharmacol. *176*: S21–S141.

Amin, E., Jaiswail, M., Derewenda, U., Reis, K., Nouri, K., Koessmeier, K.T., et al. (2016). Deciphering the Molecular and Functional Basis of RHOGAP Family Proteins. JBC *291*: 20353–20371.

Bhattacharya, M., Babwah, A. V, and Ferguson, S.S.G. (2004). Small GTP-binding protein-coupled receptors. BST *32*: 1040–1044.

Bodmann, E.L., Krett, A.L., and Bünemann, M. (2017). Potentiation of receptor responses induced by prolonged binding of Ga13and leukemia-associated RhoGEF. FASEB J. *31*: 3663–3676.

Brown, J.H., Re, D.P. Del, and Sussman, M.A. (2006). The Rac and Rho hall of fame: A decade of hypertrophic signaling hits. Circ. Res. *98*: 730–742.

Bundy, G.L., and Ch, Y. (1975). THE SYNTHESIS OF PROSTAGLANDIN ENDOPEROXIDE ANALOGS Tetrahedron Lett. 1957–1960.

Bünemann, M., Frank, M., and Lohse, M.J. (2003). Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*: 16077–16082.

Castillo-Kauil, A., García-Jiménez, I., Cervantes-Villagrana, R.D., Adame-García, S.R., Beltrán-Navarro, Y.M., Gutkind, J.S., et al. (2020). Gα s directly drives PDZ-RhoGEF signaling to Cdc42 . J. Biol. Chem. jbc.AC120.015204.

Chang, C.W., Cheng, N., Bai, Y., Skidgel, R.A., and Du, X. (2021). Gα 13 Mediates Transendothelial Migration of Neutrophils by Promoting Integrin-Dependent Motility without Affecting Directionality . J. Immunol. *207*: 3038–3049.

Chang, Y.J., Pownall, S., Jensen, T.E., Mouaaz, S., Foltz, W., Zhou, L., et al. (2015). The Rho-guanine nucleotide exchange factor PDZ-RhoGEF governs susceptibility to diet-induced obesity and type 2 diabetes. Elife *4*: 1–24.

Chen, Z., Singer, W.D., Danesh, S.M., Sternweis, P.C., and Sprang, S.R. (2008). Recognition of the Activated States of Gα13 by the rgRGS Domain of PDZRhoGEF. Structure *16*: 1532–1543.

Chen, Z., Singer, W.D., Sternweis, P.C., and Sprang, S.R. (2005). Structure of the p115RhoGEF rgRGS domain-Gα13/i1 chimera complex suggests convergent evolution of a GTPase activator. Nat. Struct. Mol. Biol. *12*: 191–197.

Chen, Z., Singer, W.D., Wells, C.D., Sprang, S.R., and Sternweis, P.C. (2003). Mapping the Gα13 binding interface of the rgRGS domain of p115RhoGEF. J. Biol. Chem. *278*: 9912–9919.

Chen, Z., Wells, C.D., Sternweis, P.C., and Sprang, S.R. (2001). Structure of the rgRGs domain of p115RhoGEF. Nat. Struct. Biol. *8*: 805–809.

Chennupati, R., Wirth, A., Favre, J., Li, R., Bonnavion, R., Jin, Y.J., et al. (2019). Myogenic vasoconstriction requires G12/G13 and LARG to maintain local and systemic vascular resistance. Elife *8*: 1–21.

Chikumi, H., Barac, A., Behbahani, B., Gao, Y., Teramoto, H., Zheng, Y., et al. (2004). Homo- and hetero-oligomerization of PDZ-RhoGEF, LARG and p115RhoGEF by their C-terminal region regulates their in vivo Rho GEF activity and transforming potential. Oncogene *23*: 233–240.

Chiu, W.C., Chiang, J.Y., Juang, J.M., Wu, C.K., Tsai, C.T., Tseng, Y.Z., et al. (2020). Reduction of blood pressure elevation by losartan in spontaneously hypertensive rats through suppression of LARG expression in vascular smooth muscle cells. J. Formos. Med. Assoc. *119*: 164–172.

Comer, S.P. (2022). Turning Platelets Off and On: Role of RhoGAPs and RhoGEFs in Platelet Activity. Front. Cardiovasc. Med. *8*: 1–9.

Congreve, M., Graaf, C. de, Swain, N.A., and Tate, C.G. (2020). Impact of GPCR Structures on Drug Discovery. Cell *181*: 81–91.

Deng, Z., Jia, Y., Liu, H., He, M., Yang, Y., Xiao, W., et al. (2019). RhoA/ROCK pathway: Implication in osteoarthritis and therapeutic targets. Am. J. Transl. Res. *11*: 5324–5331.

Devillier, P., and Bessard, G. (1997). Thromboxane A2 and related prostaglandins in airways. Fundam. Clin. Pharmacol. *11*: 2–18.

Ding, Z., Dhruv, H., Kwiatkowska-Piwowarczyk, A., Ruggieri, R., Kloss, J., Symons, M., et al. (2018). PDZ-RhoGEF Is a Signaling Effector for TROY-Induced Glioblastoma Cell Invasion and Survival. Neoplasia (United States) *20*: 1045–1058.

Ding, Z., Dong, Z., Yang, Y., Fortin Ensign, S.P., Sabit, H., Nakada, M., et al. (2020). Leukemia-Associated Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor and Ras Homolog Family Member C Play a Role in Glioblastoma Cell Invasion and Resistance. Am. J. Pathol. *190*: 2165–2176.

Diviani, D., Soderling, J., and Scott, J.D. (2001). AKAP-Lbc Anchors Protein Kinase A and Nucleates Gα 12-selective Rho-mediated Stress Fiber Formation. J. Biol. Chem. *276*: 44247–44257.

Dovas, A., and Couchman, J.R. (2005). RhoGDI : multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. Biochem. J. *9*: 1–9.

Downes, G.B., and Gautam, N. (1999). The G protein subunit gene families. Genomics *62*: 544–552.

Du, J., Zhu, Z., Xu, L., Chen, X., Li, X., Lan, T., et al. (2020). ARHGEF11 promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma through activation of β-catenin pathway. Aging (Albany. NY). *12*: 20235–20253.

Dutt, P., Nguyen, N., and Toksoz, D. (2004). Role of Lbc RhoGEF in Gα12/13-induced signals to Rho GTPase. Cell. Signal. *16*: 201–209.

Entienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cancer cell biology. Nature *420*: 629–635.

Feng, F., Han, H., Wu, S., and Wang, H. (2021). Crosstalk Between Abnormal TSHR Signaling Activation and PTEN/PI3K in the Dedifferentiation of Thyroid Cancer Cells. Front. Oncol. *11*: 1–13.

Flöser, A., Becker, K., Kostenis, E., König, G., Krasel, C., Kolb, P., et al. (2021). Disentangling bias between gq, grk2, and arrestin3 recruitment to the m3 muscarinic acetylcholine receptor. Elife *10*: 1–14.

Forster (1946). 166 FÖRSTER.- Energiewanderung und Fluoreszenz. Naturwissenschaften *33*: 166–175.

Fort, P., and Blangy, A. (2017). The evolutionary landscape of Dbl-like RhoGEF families: Adapting eukaryotic cells to environmental signals. Genome Biol. Evol. *9*: 1471–1486.

Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.G., and Schiöth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. Mol. Pharmacol. *63*: 1256–1272.

Fu, X., Koller, S., Abd Alla, J., and Quitterer, U. (2013). Inhibition of G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) triggers the growth-promoting mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. J. Biol. Chem. *288*: 7738–7755.

Fukuharaa, S., Chikumi, H., and Silvio Gutkind, J. (2001). RGS-containing RhoGEFs: The missing link between transforming G proteins and Rho? Oncogene *20*: 1661–1668.

Gao, J., Liao, J., and Yang, G.Y. (2009). CAAX-box protein, prenylation process and carcinogenesis. Am. J. Transl. Res. *1*: 312–325.

Ghanem, N.Z., Matter, M.L., and Ramos, J.W. (2021). Regulation of Leukaemia Associated Rho GEF (LARG/ARHGEF12). Small GTPases *00*: 1–9.

Glaaser, I.W., and Slesinger, P.A. (2015). Structural Insights into GIRK Channel Function. Int. Rev. Neurobiol. 123: 117-160

Gohla, A., Schultz, G., and Offermanns, S. (2000). Role for G12/G13 in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. Circ. Res. *87*: 221–227.

Goulmari, P., Knieling, H., Engel, U., and Grosse, R. (2008). LARG and mDia1 Link Gα12/13 to CELL Polarity and Microtubule Dynamics. Mol. Biol. Cell *19*: 30–40.

Guo, F. (2021). RhoA and Cdc42 in T cells: Are they targetable for T cell-mediated inflammatory diseases? Precis. Clin. Med. *4*: 56–61.

Guo, P., Tai, Y., Wang, M., Sun, H., Zhang, L., Wei, W., et al. (2022). Gα12 and Gα13: Versatility in Physiology and Pathology. Front. Cell Dev. Biol. *10*: 1–19.

Hajicek, N., Kukimoto-Niino, M., Mishima-Tsumagari, C., Chow, C.R., Shirouzu, M., Terada, T., et al. (2011). Identification of critical residues in Gα13 for stimulation of p115RhoGEF activity and the structure of the Gα 13-p115RhoGEF regulator of G protein signaling homology (RH) domain complex. J. Biol. Chem. *286*: 20625–20636.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science. *279*: 509–514.

Harvey, R.D., and Belevych, A.E. (2003). Muscarinic regulation of cardiac ion channels. Br. J. Pharmacol. *139*: 1074–1084.

Hashim, I.F., and Ahmad Mokhtar, A.M. (2021). Small Rho GTPases and their associated RhoGEFs mutations promote immunological defects in primary immunodeficiencies. Int. J. Biochem. Cell Biol. *137*: 106034.

Hausdorff, W.P., Lohse, M.J., Bouvier, M., Liggett, S.B., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1990). Two kinases mediate agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. Symp. Soc. Exp. Biol. *44*: 225—240.

Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: New insights into their functions from in vivo studies. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*: 690–701.

Hein, P., and Bünemann, M. (2009). Coupling mode of receptors and G proteins. Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. *379*: 435–443.

Hillenbrand, M., Schori, C., Schöppe, J., and Plückthun, A. (2015). Comprehensive analysis of heterotrimeric G-protein complex diversity and their interactions with GPCRs in solution. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*: E1181–E1190.

Holinstat, M., Mehta, D., Kozasa, T., Minshall, R.D., and Malik, A.B. (2003). Protein Kinase C ␣ -Induced p115RhoGEF Phosphorylation Signals Endothelial Cytoskeletal Rearrangement *. J. Biol. Chem. *278*: 28793–28798.

Huang, J.S., Ramamurthy, S.K., Lin, X., and Breton, G.C. Le (2004). Cell signalling through thromboxane A2 receptors. Cell. Signal. *16*: 521–533.

Hughes, T.E., Zhang, H., Logothetis, D.E., and Berlot, C.H. (2001). Visualization of a Functional Gαq-Green Fluorescent Protein Fusion in Living Cells. Association with the plasma membrane is disrupted by mutational activation and by elimination of palmitoylation sites, but not by activation mediated by receptors or AlF4-. J. Biol. Chem. *276*: 4227–4235.

Isberg, V., Mordalski, S., Munk, C., Rataj, K., Harpsøe, K., Hauser, A.S., et al. (2016). GPCRdb: An information system for G protein-coupled receptors. Nucleic Acids Res. *44*: D356–D364.

Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: Biochemistry and Biology. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21: 247–272.

Jelinek, V., Mösslein, N., and Bünemann, M. (2021). Structures in G proteins important for subtype selective receptor binding and subsequent activation. Commun. Biol. *4*: 1–11.

Jiang, Y., Wan, Y., and Huang, X. (1998). The G protein Ga12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain. letters to nature *395*: 808-813

Jiang, Y., Xie, X., Zhang, Y., Luo, X., Wang, X., Fan, F., et al. (2010). Regulation of G-Protein Signaling by RKTG via Sequestration of the Gβγ Subunit to the Golgi Apparatus. Mol. Cell. Biol. *30*: 78–90.

Johnson, A.C., Wu, W., Attipoe, E.M., Sasser, J.M., Taylor, E.B., Showmaker, K.C., et al. (2020). Loss of ARHGEF11 in the Dahl salt-sensitive rat protects against hypertension-induced renal injury. Hypertension 75: 1012–1024.

Johnston, C.A., and Siderovski, D.P. (2007). Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: Current structural insights. Mol. Pharmacol. *72*: 219–230.

Kelly, P., Moeller, B.J., Juneja, J., Booden, M.A., Der, C.J., Daaka, Y., et al. (2006). The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer invasion and metastasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*: 8173–8178.

Kim, K.M., Han, C.Y., Kim, J.Y., and Sam Seok Cho2, Yun Seok Kim1, Ja Hyun Koo1, Jung Min Lee1, Sung Chul Lim3, Keon Wook Kang1, Jae Sung Kim4, Se Jin Hwang5, Sung Hwan Ki2, and S.G.K. (2018). Gα12 overexpression induced by miR16 dysregulation contributes to liver fibrosis by promoting autophagy in hepatic stellate cells. J Hepatol. *176*: 139–148.

Kobilka, B.K. (2012). Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. Trends Pharmacol Sci. *32*: 213–218.

Kourlas, P.J., Strout, M.P., Becknell, B., Veronese, M.L., Croce, C.M., Theil, K.S., et al. (2000). Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: Evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*: 2145–2150.

Krett, A.-L. (2015). Investigation of the dynamics of thromboxane receptor- Gα13 -effector interactions by means of FRET. Masterarbeit Universität Marburg

Kuen, D.S., Park, M., Ryu, H., Choi, G., Moon, Y.H., Kim, J.O., et al. (2021). Critical regulation of follicular helper T cell differentiation and function by Gα13 signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *118*: 1–10.

Kurz, M., Krett, A.L., and Bünemann, M. (2020). Voltage dependence of prostanoid receptors. Mol. Pharmacol. *97*: 267–277.

Lambert, T.J. (2019). FPbase : a community-editable fluorescent protein database 3Dscript : animating 3D / 4D microscopy data using a natural-language-based syntax. Nature Methods *16*: 3–4.

Lane, B.S., Heller, B., Hollenberg, M.D., and Wells, C.D. (2021). The RGS-RhoGEFs control the amplitude of YAP1 activation by serum. Sci. Rep. *11*: 1–13.

Latorraca, N.R., Venkatakrishnan, A.J., and Dror, R.O. (2017). GPCR Dynamics : Structures in Motion. Chem. Rev. 117: 139-155

Li, M., Jiao, Q., Xin, W., Niu, S., Liu, M., Song, Y., et al. (2022). The Emerging Role of Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors in Cardiovascular Disorders: Insights Into Atherosclerosis: A Mini Review. Front. Cardiovasc. Med. *8*: 1–10.

Lohse, M.J., Engelhardt, S., and Eschenhagen, T. (2003). What Is the Role of β-Adrenergic Signaling in Heart Failure? Circ. Res. *93*: 896–906.

Lutz S, Shankaranarayanan A, Coco C, Ridilla M, Nance MR, Vettel C, Baltus D, Evelyn CR, Neubig RR, Wieland T, T.J. (2007). Structure of Gαq-p63RhoGEF-RhoA Complex Reveals a Pathway for the Activation of RhoA by GPCRs. Science *318*: 1923–1928.

Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rümenapp, U., Jakobs, K.H., Schmidt, M., et al. (2005). The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. J. Biol. Chem. *280*: 11134–11139.

Marinissen, M.J., and Gutkind, J.S. (2005). Scaffold proteins dictate Rho GTPase-signaling specificity. TIBS *30*: 423-426

Maziarz, M., Federico, A., Zhao, J., Dujmusic, L., Zhao, Z., Monti, S., et al. (2020). Naturally occurring hotspot cancer mutations in Gα13 promote oncogenic signaling. J. Biol. Chem. *295*: 16897–16904.

McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P., and Willard, F.S. (2005). G-protein signaling: Back to the future. Cell. Mol. Life Sci. *62*: 551–577.

Meller, N., Merlot, S., and Guda, C. (2005). CZH proteins: A new family of Rho-GEFs. J. Cell Sci. *118*: 4937–4946.

Meyer, B.H., Freuler, F., Guerini, D., and Siehler, S. (2008). Reversible translocation of p115-RhoGEF by G12/13-coupled receptors. J. Cell. Biochem. *104*: 1660–1670.

Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., Eustachio, P.D., Rush, M., and Philips, M.R. (2001). Differential Localization of Rho GTPases in Live Cells : Regulation by Hypervariable Regions and RhoGDI Binding. JCB 152: 111-126.

Mikelis, C.M., Palmby, T.R., Simaan, M., Li, W., Szabo, R., Lyons, R., et al. (2013). PDZ-RhoGEF and LARG are essential for embryonic development and provide a link between thrombin and LPA receptors and Rho activation. J. Biol. Chem. *288*: 12232–12243.

Milligan, G., and Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: A short history. Br. J. Pharmacol. *147*: 46-55.

Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A., and Treisman, R. (2003). by Regulation of Its Coactivator MAL. Cell *113*: 329–342.

Mizuno, N., and Itoh, H. (2009). Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. NeuroSignals *17*: 42–54.

Moers, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Wettschureck, N., Grüner, S., Konrad, I., et al. (2003). G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. Nature medicine *9*: 1418–1422.

Moers, A., Nu, A., Goebbels, S., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2008). Ga12 / Ga13 Deficiency Causes Localized Overmigration of Neurons in the Developing Cerebral and Cerebellar Cortices. Mol. Cell. Biol. *28*: 1480–1488.

Mombaerts, P. (2004). Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. Nat. Rev. Neurosci. *5*: 263–278.

Mu, G., Ding, Q., Li, H., Zhang, L., Zhang, L., He, K., et al. (2018). Gastrin stimulates pancreatic cancer cell directional migration by activating the Gα12/13-RhoA-ROCK signaling pathway. Exp. Mol. Med. *50*: 1-14.

Müller, S.M., Galliardt, H., Schneider, J., George Barisas, B., and Seidel, T. (2013). Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells. Front. Plant Sci. *4*: 1–20.

Nakahata, N. (2008). Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. Pharmacol. Ther. *118*: 18–35.

Narumiya, S., Ishizaki, T., and Watanabe, N. (1997). Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. FEBS Lett. *410*: 68–72.

Niu, J., Profirovic, J., Pan, H., Vaiskunaite, R., and Voyno-Yasenetskaya, T. (2003). G Protein βγ Subunits Stimulate p114RhoGEF, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for RhoA and Rac1: Regulation of Cell Shape and Reactive Oxygen Species Production. Circ. Res. *93*: 848–856.

Nobles, M., Benians, A., and Tinker, A. (2005). Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*: 18706–18711.

O'Hayre, M., Inoue, A., Kufareva, I., Wang, Z., Mikelis, C.M., Drummond, R.A., et al. (2016). Inactivating mutations in GNA13 and RHOA in Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: a tumor suppressor function for the Gα13/RhoA axis in B cells. Oncogene *35*: 3771–3780.

Offermanns, S. (2006). Activation of Platelet Function Through G Protein – Coupled Receptors. Circ Res. 99: 1293-1304

Offermanns, S., Mancino, V., Revel, J., and Simon, M.I. (1997). Vascular System Defects and Impaired Cell Chemokinesis as a Result of Ga13 Deficiency. Science *275*: 533-536

Ohmori, T., Yatomi, Y., Osada, M., Kazama, F., Takafuta, T., Ikeda, H., et al. (2003). Sphingosine 1-phosphate induces contraction of coronary artery smooth muscle cells via S1P2. Cardiovasc. Res. *58*: 170–177.

Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*: 60–71.

Pelosse, M., Molecular, E., Grichine, A., and Berger, I. (2016). GENETICALLY ENCODED FLUORESCENT BIOSENSORS. EXS, volume 107: 491–523

Porchia, F., Papucci, M., Gargini, C., Asta, A., Marco, G. De, Agretti, P., et al. (2008). Endothelin-1 up-regulates p115RhoGEF in embryonic rat cardiomyocytes during the hypertrophic response. J. Recept. Signal Transduct. *28*: 265–283.

Posern, G., and Treisman, R. (2006). Actin ' together : serum response factor , its cofactors and the link to signal transduction. Trends Cell Biol. *16*: 588-596.

Reed, F., Larsuel, S.T., Mayday, M.Y., Scanlon, V., and Krause, D.S. (2021). REVIEWS MRTFA : A critical protein in normal and malignant hematopoiesis and beyond. J. Biol. Chem. *296*: 100543.

Ridley, A.J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. Curr. Opin. Cell Biol. *36*: 103–112.

Rieken, S., Sassmann, A., Herroeder, S., Wallenwein, B., Moers, A., Offermanns, S., et al. (2006). G12 /G13 Family G Proteins Regulate Marginal Zone B Cell Maturation, Migration, and Polarization. J Immunol 177: 2985-2993

Rojas, R.J., Yohe, M.E., Gershburg, S., Kawano, T., Kozasa, T., and Sondek, J. (2007). Gαq directly activates p63RhoGEF and trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. J. Biol. Chem. *282*: 29201–29210.

Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G.F., and Kobilka, B.K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. Nature *459*: 356–363.

Rossman, K.L., Der, C.J., Sondek, J., and Hill, C. (2005). GEF MEANS GO : TURNING ON RHO GTPases WITH GUANINE NUCLEOTIDE-EXCHANGE FACTORS. Mol. cell biol. *6*: 167-180.

Ruland, J.G., Kirchhofer, S.B., Klindert, S., Bailey, C.P., and Bünemann, M. (2020). Voltage modulates the effect of μ-receptor activation in a ligand-dependent manner. Br. J. Pharmacol. *177*: 3489–3504.

Sah, V.P., Seasholtz, T.M., Sagi, S.A., and Brown, J.H. (2000). THE ROLE OF RHO IN G-PROTEIN-COUPLED RECEPTOR SIGNAL TRANSDUCTION. Annu- Rev. Pharmacol. Toxicol. 40: 459-489

Saito, M., Tanaka, H., Sasaki, M., Kurose, H., and Nakahata, N. (2010). Involvement of aquaporin in thromboxane A2 receptor-mediated, G12/13/RhoA/NHE-sensitive cell swelling in 1321N1 human astrocytoma cells. Cell. Signal. *22*: 41–46.

Sánchez-Fernández, G., Cabezudo, S., García-Hoz, C., Benincá, C., Aragay, A.M., Mayor, F., et al. (2014). Gαq signalling: The new and the old. Cell. Signal. *26*: 833–848.

Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., et al. (2016). A comprehensive map of molecular drug targets. Nat. Rev. Drug Discov. *16*: 19–34.

Schafernak, K.T., Williams, J.A., Clyde, B.I., Marcus, C., Decker, B., and Toydemir, R.M. (2021). Identification of KMT2A-ARHGEF12 fusion in a child with a high-grade B-cell lymphoma. Cancer Genet. *258–259*: 23–26.

Sehnal, D., Bittrich, S., Deshpande, M., Svobodová, R., Berka, K., Bazgier, V., et al. (2021). Mol∗Viewer: Modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. Nucleic Acids Res. *49*: W431–W437.

Sente, A., Peer, R., Srivastava, A., Baidya, M., Lesk, A.M., Balaji, S., et al. (2018). Molecular mechanism of modulating arrestin conformation by GPCR phosphorylation. Nat. Struct. Mol. Biol. *25*: 538–545.

Shan, D., Chen, L., Wang, D., Tan, Y., Gu, J.L., and Huang, X. (2006). The G Protein G a 13 Is Required for Growth Factor-Induced Cell Migration. Developmental Cell 10: 707–718.

Shimomura, O., Johnson F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent. J. Cell. Comp. Physiol. *59*: 223–239.

Siehler, S. (2009). Regulation of RhoGEF proteins by G 12/13-coupled receptors. Br. J. Pharmacol. *158*: 41–49.

Simon, M.I., Strathmann, M.P., and Gautam, N. (1991). Diversity of g proteins. Science *252*: 802–808.

Somlyo, A.P., and Somlyo, A. V (2003). Ca2+ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II : Modulated by G Proteins , Kinases , and Myosin Phosphatase. Physiol. Rev. 83: 1325–1358.

Stauch, B., and Cherezov, V. (2018). Serial Femtosecond Crystallography of G Protein-Coupled Receptors. Annu. Rev. Biophys. *47*: 377–397.

Stryer, L. (1978). Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. Annu. Rev. Biochem. *47*: 819–846.

Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H., and Kozasa, T. (2003). Gα12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*: 733–738.

Suzuki, N., Tsumoto, K., Hajicek, N., Daigo, K., Tokita, R., Minami, S., et al. (2009). Activation of leukemia-associated RhoGEF by Gα13 with significant conformational rearrangements in the interface. J. Biol. Chem. *284*: 5000–5009.

Taya, S., Inagaki, N., Sengiku, H., Makino, H., Iwamatsu, A., Urakawa, I., et al. (2001). Direct interaction of insulin-like growth factor-1 receptor with leukemia-associated RhoGEF. J. Cell Biol. *155*: 809–819.

Toksoz, D., and Williams, D.A. (1994). Novel human oncogene lbc detected by transfection with distinct homology regions to signal transduction products. Oncogene *9*: 621–628.

Ueda, H., Nagae, R., Kozawa, M., Morishita, R., Kimura, S., Nagase, T., et al. (2008). Heterotrimeric G protein βγ subunits stimulate FLJ00018, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. J. Biol. Chem. *283*: 1946–1953.

Unen, J. van, Stumpf, A.D., Schmid, B., Reinhard, N.R., Hordijk, P.L., Hoffmann, C., et al. (2016). A New Generation of FRET Sensors for Robust Measurement of Gαi1, Gαi2 and Gαi3 Activation Kinetics in Single Cells. PLoS One *11*: e0146789.

Vilardaga, J.P., Bünemann, M., Feinstein, T.N., Lambert, N., Nikolaev, V.O., Engelhardt, S., et al. (2009). Minireview: GPCR and G proteins: Drug efficacy and activation in live cells. Mol. Endocrinol. *23*: 590–599.

Vogt, S., Grosse, R., Schultz, G., and Offermanns, S. (2003). Receptor-dependent RhoA activation in G12/G13-deficient cells. Genetic evidence for an involvement of Gq/G11. J. Biol. Chem. *278*: 28743–28749.

Wang, Z., Kumamoto, Y., Wang, P., Gan, X., Lehmann, D., Smrcka, A. V., et al. (2009). Regulation of immature dendritic cell migration by RHoA guanine nucleotide exchange factor Arhgef5. J. Biol. Chem. *284*: 28599–28606.

Welch, H.C.E., Coadwell, W.J., Ellson, C.D., Ferguson, G.J., Andrews, S.R., Erdjument-Bromage, H., et al. (2002). P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and gβγ-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. Cell *108*: 809–821.

Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. Physiol. Rev. *85*: 1159–1204.

Wheeler, A.P., and Ridley, A.J. (2004). Why three Rho proteins ? RhoA , RhoB , RhoC , and cell motility. Exp. Cell Res. *301*: 43–49.

Williams, C.M., Harper, M.T., Goggs, R., Walsh, T.G., Offermanns, S., and Poole, A.W. (2015). Leukemia-associated Rho guanine-nucleotide exchange factor is not critical for RhoA regulation, yet is important for platelet activation and thrombosis in mice. J. Thromb. Haemost. *13*: 2102–2107.

Williams, S.L., Lutz, S., Charlie, N.K., Vettel, C., Ailion, M., Coco, C., et al. (2007). Trio's Rho-specific GEF domain is the missing Gαq effector in C. elegans. Genes Dev. *21*: 2731–2746.

Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E., and Lohse, M.J. (1996). Protein kinase cross-talk: Membrane targeting of the β-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*: 2105–2109.

Wirth, A., Benyó, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., et al. (2008). G12-G13–LARG–mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. Nat. Med. *14*: 64–68.

Wolters, V., Krasel, C., Brockmann, J., and Bünemann, M. (2015). Influence of Gαqon the dynamics of M3-acetylcholine receptor-G-protein-coupled receptor kinase 2 interaction. Mol. Pharmacol. *87*: 9–17.

Woodward, D.F., Jones, R.L., and Narumiya, S. (2011). International union of basic and clinical pharmacology. LXXXIII: Classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. Pharmacol. Rev. *63*: 471–538.

Worzfeld, T., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2008). G12/G13-mediated signalling in mammalian physiology and disease. Trends Pharmacol. Sci. *29*: 582–589.

Xie, Y., Gao, L., Xu, C., Chu, L., Gao, L., Wu, R., et al. (2019). ARHGEF12 regulates erythropoiesis and is involved in erythroid regeneration after chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia patients. Heamatol. 105: 925-936

Xu, J., Wang, F., Keymeulen, A. Van, Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., et al. (2003). Divergent Signals and Cytoskeletal Assemblies Regulate Self-Organizing Polarity in Neutrophils. Cell *114*: 201–214.

Xu, Y., Zhang, Y., Yang, Y., Liu, Y., Tian, Q., Liu, P., et al. (2021). Tyrosine phosphatase Shp2 regulates p115RhoGEF/Rho-dependent dendritic cell migration. Cell. Mol. Immunol. *18*: 755–757.

Yamada, T., Ohoka, Y., Kogo, M., and Inagaki, S. (2005). Physical and functional interactions of the lysophosphatidic acid receptors with PDZ domain-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs). J. Biol. Chem. *280*: 19358–19363.

Yang, Y.M., Kuen, D.S., Chung, Y., Kurose, H., and Kim, S.G. (2020). Gα12/13 signaling in metabolic diseases. Exp. Mol. Med. *52*: 896–910.

Yang, Z., Yang, F., Zhang, D., Liu, Z., Lin, A., Liu, C., et al. (2017). Phosphorylation of g protein-coupled receptors: From the barcode hypothesis to the flute model. Mol. Pharmacol. *92*: 201–210.

Yu, O.M., and Brown, J.H. (2015). G Protein-Coupled Receptor and RhoA-Stimulated Transcriptional Responses: Links to Inflammation, Differentiation, and Cell Proliferation. Mol. Pharmacol. *88*: 171–180.

Zahra, F.T., Sajib, S., Ichiyama, Y., Akwii, R.G., Tullar, P.E., Cobos, C., et al. (2019). Endothelial RhoA GTPase is essential for in vitro endothelial functions but dispensable for physiological in vivo angiogenesis. Scientific reports 9:11666 1–15.

Zeng, R.J., Xie, W.J., Zheng, C.W., Chen, W.X., Wang, S.M., Li, Z., et al. (2021). Role of Rho guanine nucleotide exchange factors in non-small cell lung cancer. Bioengineered *12*: 11169–11187.

Zhang, J.X., Yun, M., Xu, Y., Chen, J.W., Weng, H.W., Zheng, Z.S., et al. (2016). GNA13 as a prognostic factor and mediator of gastric cancer progression. Oncotarget *7*: 4414–4427.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 | Zellmembran....6
Abbildung 3.2 | Arzneimittelzulassungen nach Zielstruktur....7
Abbildung 3.3 | GPCR snake-plot....9
Abbildung 3.4 | Dreidimensionaler Aufbau GPCR....9
Abbildung 3.5 | Ligandeneffekte....10
Abbildung 3.6 | Konformationsänderung....11
Abbildung 3.7 | Signalwege von G-Proteinen....14
Abbildung 3.8 | Kreislauf der G-Protein-Aktivierung....15
Abbildung 3.9 | Phylogenetisches Kladogramm der Rho-GEFs im Menschen....18
Abbildung 3.10 | Durch G-Proteine regulierte RhoGEFs....20
Abbildung 3.11 | Aufbau der RH-RhoGEFs....22
Abbildung 3.12 | Der RhoGEF-Signalweg....23
Abbildung 5.1 | Gelelektrophorese....62
Abbildung 5.2 | Messung der DNA-Konzentration....68
Abbildung 5.3 | Beispiel Mutageneseprimer....69
Abbildung 5.4 | Gibson Assembly Primerdesign I....72
Abbildung 5.5 | Gibson Assembly Primerdesign II....72
Abbildung 5.6 | Schema Fluoreszenz....76
Abbildung 5.7 | Spektrenüberlappung....78
Abbildung 5.8 | FRET-Effizienz....79
Abbildung 5.9 | Orientierung der Fluorophore....80
Abbildung 5.10 | Anregungs- und Emissionsfilter....82
Abbildung 5.11 | Schematischer Aufbau des Mikroskops für FRET-Messungen....83
Abbildung 5.12 | Durchbluten....84
Abbildung 5.13 | Falschanregung....85
Abbildung 5.14 | Zeitprotokoll von FRET-Messungen....87

Abbildung 5.15 | Baselinekorrektur....89
Abbildung 5.16 | $G\alpha_{13}$-RhoGEF-Interaktionsassay....90
Abbildung 5.17 | Gβγ-RhoGEF-Interaktionsassay....90
Abbildung 5.18 | G-Protein-Aktivierungsassay....92
Abbildung 6.1 | $G\alpha_{13}$-RhoGEF-Interaktionsassay....97
Abbildung 6.2 | Gegenläufige Fluoreszenz-Intensität und $\Delta F_{535}/F_{480}$-Ratio....99
Abbildung 6.3 | FRET-Visualisierung....100
Abbildung 6.4 | Spezifische Interaktion....101
Abbildung 6.5 | Auswertung der Off-Kinetik....103
Abbildung 6.6 | $G\alpha_{13}$-RH-RhoGEF-Interaktionskinetiken....104
Abbildung 6.7 | $G\alpha_{12}$-RH-RhoGEF-Interaktion....105
Abbildung 6.8 | Beispielmessung Konzentrations-Wirkungs-Kurve....106
Abbildung 6.9 | Konzentrations-Wirkungs-Kurven $G\alpha_{13}$-p115/LARG....107
Abbildung 6.10 | Konzentrations-Wirkungs-Kurven $G\alpha_{13}$-p115/PDZ....108
Abbildung 6.11 | Vergleich der On-Kinetik....109
Abbildung 6.12 | Vergleich der Signalamplituden....110
Abbildung 6.13 | C-terminal trunkierte RhoGEFs....112
Abbildung 6.14 | N-terminal trunkierte RhoGEFs I....113
Abbildung 6.15 | N-terminal trunkierte RhoGEFs II....114
Abbildung 6.16 | $G\alpha_{13}$–Chimera1-Interaktion....116
Abbildung 6.17 | $G\alpha_{13}$–RhoGEF RH-Domänen-Interaktion....118
Abbildung 6.18 | Chimera2+3-Interaktionen....119
Abbildung 6.19 | Vergleich der N-terminalen Motive....120
Abbildung 6.20 | Interaktion der $G\alpha_{13/i}$-Chimäre mit p115-RhoGEF....122
Abbildung 6.21 | $G\alpha_{13}$(127) vs. $G\alpha_{13}$(135)....123
Abbildung 6.22 | BRET $G\alpha_{13}$(127) vs. $G\alpha_{13}$(135)....124
Abbildung 6.23 | p115-E32G....125
Abbildung 6.24 | Konzentrations-Wirkungs-Kurve p115-E32G....126
Abbildung 6.25 | $G\alpha_{13}$-R128A....128
Abbildung 6.26 | $G\alpha_{13}$-R128A-PDZ....129

Abbildung 6.27 | LARG-G359E.....130
Abbildung 6.28 | Chimera4.....131
Abbildung 6.29 | Chimera5.....132
Abbildung 6.30 | Chimera6.....133
Abbildung 6.31 | Chimera7.....134
Abbildung 6.32 | Chimera8.....135
Abbildung 6.33 | Chimera9.....136
Abbildung 6.34 | Dual-Luciferase Assay-System.....137
Abbildung 6.35 | Gβ-RhoGEF-Interaktion.....139
Abbildung 6.36 | Gγ-RhoGEF-Interaktion.....140
Abbildung 6.37 | Gγ(IRES)-RhoGEF-Kinetik orientiert sich an $G\alpha_{13}$-RhoGEF Kinetik141
Abbildung 6.38 | Einfluss von Gα auf Gγ-RhoGEF.....142
Abbildung 6.39 | Gγ-p115R, $G\alpha_{13}$-WT/$G\alpha_{13}$-R128A.....143
Abbildung 6.40 | YFP-p115-CAAX.....145
Abbildung 6.41 | Gγ-p115(-CAAX).....146
Abbildung 6.42 | $G\alpha_{13}$-Gγ, p115+-GRK.....147

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1 | Verbrauchsmaterial....34
Tabelle 4.2 | Reagenzien....34
Tabelle 4.3 | Reagenzien für die Zellkultur....35
Tabelle 4.4 | Geräte....36
Tabelle 4.5 | Geräte Mikroskop Nikon-Setup....37
Tabelle 4.6 | Software und Datenbanken....37
Tabelle 4.7 | Kits....38
Tabelle 4.8 | Plasmide....39
Tabelle 4.9 | Oligonukleotide....42
Tabelle 4.10 | DMEM-Medium....50
Tabelle 4.11 | Puffer für FRET-Messungen....51
Tabelle 4.12 | Ampicillin-Stammlösung....52
Tabelle 4.13 | Kanamycin-Stammlösung....52
Tabelle 4.14 | KCM-Puffer....53
Tabelle 4.15 | LB-Medium....53
Tabelle 4.16 | LB-Agar....54
Tabelle 4.17 | TAE-Puffer....54
Tabelle 5.1 | Transfektionsprotokoll $G\alpha_{13}$-RhoGEF-Interaktion....58
Tabelle 5.2 | Transfektionsprotokoll Gγ-RhoGEF-Interaktion....58
Tabelle 5.3 | Transfektionsprotokoll G-Protein-Aktivierungsassay....58
Tabelle 5.4 | Ablauf einer PCR....60
Tabelle 5.5 | Ansatz Mutagenese-PCR....70
Tabelle 5.6 | Ansatz PCR Site-Directed Mutagenesis-Kit....70
Tabelle 5.7 | Ansatz PCR Gibson-Assembly....73

Publikationen und Konferenzbeiträge

Veröffentlichte Manuskripte

Redlin, F., Krett, A., Bünemann, M.

"Interaction kinetics between p115-RhoGEF and $G\alpha_{13}$ are determined by unique molecular interactions affecting agonist sensitivity"

Communications Biology, 2022 (accepted)

Vorträge

5th German Pharm-Tox Summit, 86. Jahrestagung der DGPT, 03/2020 (Leipzig)

"Differential interaction of LARG and P115-RhoGEF with G_{13} subunits."

Posterpräsentation

DPhG Annual Meeting 2022, 09/2022 (Marburg)

Redlin, F., Bünemann, M.

"Faster G protein interaction kinetics associated with lower agonist sensitivity of p115-RhoGEF compared to other RH-RhoGEFs can be attributed to enhance GAP activity in intact cells"

7th German Pharm-Tox Summit, 88. Jahrestagung der DGPT, 03/2022 (Bonn)

(online aufgrund der COVID-19-Pandemie)

Redlin, F., Bünemann, M.

"Faster G protein interaction kinetics associated with lower agonist sensitivity of p115-RhoGEF compared to other RH-Rho-GEFs can be attributed to enhanced GAP activity in intact cells"

8th Focused Meeting on Cell Signalling, 04/2020 (Leicester)

(abgesagt aufgrund der COVID-19-Pandemie)

Redlin, F., Krett, A., Bünemann, M.

"Differential interaction of LARG and P115-RhoGEF with G_{13} subunits."

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Determinierung funktioneller Unterschiede der Interaktion von G-Proteinen mit den Mitgliedern der RH-RhoGEF-Familie“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 07.10.2022

.....

(Fabian Redlin)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Promotionszeit, im Labor, oder bei der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben.

Dabei gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Moritz Bünemann. Einerseits für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe spannende Projekte und Methoden kennenzulernen, andererseits für die ausgezeichnete Betreuung, die genug Platz für das eigenständige Arbeiten ließ, gleichzeitig aber immer neue Anreize oder Hilfestellungen bot.

Ich möchte mich bei Dr. Olga Ilyaskina für die Einarbeitung ins Labor bedanken. Weiterhin für fachliche Unterstützung jeglicher Art möchte ich mich bei Dr. Michael Kurz, Dr. Sina Kirchhofer, Dr. Volker Jelinek, Prof. Dr. Cornelius Krasel, Anna-Lena Krett und Sandra Engel bedanken.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich bei Lukas, Michael und Dewi bedanken. Für die angenehme Arbeitsatmosphäre, auch bei Tagungen und Betriebsausflügen möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Institutes bedanken: Michael, Sina, Volker, Nadja, Katha, Uri, Clara, Lukas, Susanne, Stefan, Melli, Madeline, Julia, Victoria, Hauke und Emma.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei Freunden und Familie bedanken, die mich während der Promotionszeit unterstützt haben, hier besonders Dewi die mir in stressigen Phasen den Rücken freigehalten hat. Grüße gehen raus an die Skatgruppe.

Lebenslauf

Zum Schutz personenbezogener Daten steht der Lebenslauf in der Online-Version nicht zur Verfügung.