

## ZUSAMMENFASSUNG

Zellen enthalten ein komplexes System aus Filamenten, das Zytoskelett, welches eine Vielzahl von zellulären Prozessen reguliert. In Säugerzellen unterscheidet man drei Arten dieser Filamente: Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit Aktinfilamenten und Regulatorproteinen, welche hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert sind und die Morphologie der Zelle maßgeblich beeinflussen.

Zunächst wurde der Einfluss von niedermolekularen Wirkstoffen, welche aus Naturstoffen abgeleitet wurden, auf das dynamische Aktin-Netzwerk untersucht. Für einen dieser Wirkstoffe (LGM235) konnte selbst bei sehr geringen Konzentrationen (~85 pM) gezeigt werden, dass er einen Einfluss auf die Organisation von Aktin in Zellen hat. Aus dieser Substanz wurde ein fluoreszenzmarkiertes Analogon entwickelt, welches zellpermeabel und nicht-toxisch ist, um statische Aktinstrukturen in lebenden Zellen zu untersuchen.

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit eine Reihe von Biosensoren entwickelt, um die Aktivität von Signalmolekülen aus der Familie der Rho-GTPasen (Rac1, Cdc42 und RhoA) zu messen. Diese Signalmoleküle regulieren hauptsächlich das Aktin Zytoskelett. Aktivitätsmessungen mit diesen Biosensoren wurden mit Aktivitätsstörungen durch ein photoaktivierbares Rac1-Konstrukt kombiniert, um die gegenseitige Regulation der Proteine Rac1, Cdc42 und RhoA zu charakterisieren. Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass als Antwort auf eine akute Photoaktivierung von Rac1 die Aktivität von Rac1, Cdc42 und RhoA erhöht wurde. Es wurde jedoch eine unerwartete subzelluläre Lokalisation von photoaktivierbarem Rac1 beobachtet, welche die Messung der gegenseitigen Regulation der Rho GTPasen erschweren könnte. Daher wurde ebenfalls ein optimiertes photoaktivierbares Rac1-Konstrukt entwickelt, in welchem diese Mislokalisierung unterdrückt wurde.

Alternativ zur Photoaktivierung wurde eine neue, generelle Methode zur Kontrolle der Aktivität von Rho GTPasen basierend auf chemisch induzierter Dimerisierung (CID) entwickelt. Bei diesem Ansatz bindet ein niedermolekularer Wirkstoff („Dimerizer“) gleichzeitig zwei Proteindomänen und bildet so einen heterodimeren Proteinkomplex. Da keine der beiden Proteindomänen natürlicherweise in Säugerzellen vorkommt, handelt es sich hierbei um einen neuartigen, bioorthogonalen CID-Ansatz, der zur Kontrolle der Proteinfunktion genutzt werden kann. Die C-terminale Aminosäuresequenz von K-Ras wurde an eine dieser Domänen fusioniert, um eine Lokalisation an der Plasmamembran zu gewährleisten. Eine dauerhaft aktive Mutante von Rac1 wurde an die andere der beiden Domänen fusioniert. Zusätzlich wurde die Plasmamembran Lokalisationssequenz von Rac1 entfernt, sodass sich dieses Konstrukt im Zytoplasma befindet. Kurz nach Zugabe des Dimerizers auf Zellen, welche beide Fusionsproteine synthetisieren, konnte eine sehr schnelle Rekrutierung des Fusionsproteins mit der Rac1-Mutante zur Plasmamembran beobachtet werden. Diese Rekrutierung löste die Entstehung von Rac1-typischen Aktin-Fortsätzen an den Rändern der Zelle aus. Analoge Experimente mit dauerhaft aktiven Cdc42- und RhoA-Mutanten induzierten ebenfalls Änderungen im Aktin-Zytoskelett und der Zellmorphologie, welche charakteristisch für diese Signalproteine sind.

Die in dieser Arbeit entwickelten Werkzeuge können genutzt werden, um die Dynamik von Aktinstrukturen und deren Regulation durch Signalnetzwerke der Rho GTPasen zu untersuchen.