

**Funktionelle Charakterisierung von humanen
CBL- und RRAS-Proteinvarianten für ein
besseres Verständnis der Pathophysiologie bei
RASopathien**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kristina Brand

aus Wiembeck in Lippe

Hamburg 2014

Datum der Disputation: 06.02.2015

1. Gutachterin: Prof. Dr. Kerstin Kutsche

2. Gutachter: PD Dr. Hartwig Lüthen

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis.....	VI
II	Abbildungsverzeichnis.....	IX
III	Tabellenverzeichnis.....	XI
1	Zusammenfassung	1
1.1	Summary	3
2	Einleitung	5
2.1	RASopathien, eine Gruppe von klinisch überlappenden Erkrankungen mit ähnlichen pathomechanistischen Ursachen.....	5
2.1.1	Noonan-Syndrom: Bekannte Gene und Pathomechanismen	5
2.2	Die Ubiquitin-E3-Ligase CBL	8
2.2.1	CBL reguliert das <i>trafficking</i> des EGF-Rezeptors	10
2.3	Die kleine GTPase RRAS	12
2.3.1	RRAS und die Integrinbiologie	14
3	Ziel der Arbeit und Arbeitshypothesen.....	17
4	Material und Methoden.....	19
4.1	Material	19
4.1.1	Bakterienstämme und Zelllinien	19
4.1.2	Zur Verfügung gestellte Plasmide	20
4.1.2.1	Konstrukte für die Expression in Eukaryoten.....	20
4.1.2.2	Vorliegende Konstrukte für die Expression in Bakterien.....	21
4.1.2.3	Ausgangsvektoren zur Herstellung neuer Konstrukte	21
4.1.3	Hergestellte Plasmide.....	21
4.1.3.1	Konstrukte für die eukaryotische Expression	21
4.1.3.2	Mittels Topoisomerase-Reaktion hergestellte Gateway TM - Eingangs-konstrukte.....	22

4.1.3.3 Mittels Gateway™-Technologie hergestellte Zielkonstrukte für die eukaryotische Expression	22
4.1.4 Oligonukleotide.....	23
4.1.4.1 Oligonukleotide für Klonierungen	23
4.1.4.2 Oligonukleotide für Sequenzierreaktionen.....	24
4.1.5 Antikörper	25
4.1.5.1 Primärantikörper.....	25
4.1.5.2 Sekundärantikörper.....	25
4.1.6 Chemikalien und Lösungsmittel.....	26
4.1.7 Kits, Enzyme, Nukleotide und Standards	27
4.1.8 Medien und Zusätze	28
4.1.8.1 Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten.....	28
4.1.8.2 Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten.....	29
4.1.9 Puffer und Lösungen	29
4.1.9.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	29
4.1.9.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten.....	31
4.1.9.3 Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten	33
4.1.10 Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien	34
4.2 Molekularbiologische Methoden	36
4.2.1 Anzucht von Bakterienkulturen	36
4.2.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> für die Transformation.....	36
4.2.3 Hitzeschock-Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen mit Plasmid- DNA.....	37
4.2.4 Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	37
4.2.5 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	38
4.2.6 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA mittels Nano-Drop	38
4.2.7 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA	38
4.2.8 Ligation von DNA.....	38
4.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und PCR-vermittelte Mutagenese.....	39
4.2.10 Agarose-Gelelektrophorese.....	41
4.2.11 Aufreinigung von PCR- und Restriktionsprodukten	41
4.2.12 DNA-Sequenzierung.....	42

4.2.13	Klonierung mittels TOPO [®] -Klonierungs-Technologie.....	42
4.2.14	Klonierung mittels GATEWAY [™] -Technologie	43
4.3	Zellbiologische Arbeitstechniken.....	43
4.3.1	Zellkultur.....	43
4.3.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen	43
4.3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	44
4.3.1.3	Passagieren von Zellen.....	45
4.3.2	Methoden zur Transfektion eukaryotischer Zellen	45
4.3.2.1	Transiente Transfektion mit Lipofectamin [™] 2000	45
4.3.2.2	Transiente Transfektion mit TurboFect [™]	46
4.3.2.3	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Flp-In [™] Systems	47
4.3.3	Immunfluoreszenzanalysen.....	48
4.4	Proteinbiochemische Methoden.....	49
4.4.1	Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen	49
4.4.2	GTPase- <i>Pull-Down</i> -Experimente	49
4.4.3	Koimmunpräzipitation	51
4.4.4	Biotinylierungsexperimente	54
4.4.4.1	Zelloberflächenbiotinylierung zu Detektion von Zellmembran- assoziiertem EGFR	55
4.4.4.2	Zelloberflächenbiotinylierung zur Quantifizierung der EGFR- Internalisierung.....	57
4.4.5	Quantifizierung der EGFR-Degradierung bei inhibierter Proteinbiosynthese	58
4.4.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	58
4.4.7	Comassie [®] -Färbung	60
4.4.8	Western-Blotting.....	60
4.4.9	Immunologische Detektion auf PVDF-Membran	61
5	Ergebnisse	62

5.1 Untersuchungen zur Auswirkung von humanpathogenen Aminosäuresubstitutionen in CBL auf den zellulären Transport und die Ubiquitylierung des EGFR.....	62
5.1.1 Analyse der EGFR-Ubiquitylierung mittels Koimmunpräzipitation und Western-Blotting in COS7-Zellen nach Expression verschiedener CBL-Proteinvarianten	63
5.1.2 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener CBL-Proteinvarianten auf den EGFR-Abbau in COS7-Zellen.....	67
5.1.3 Bestimmung der Menge an Zellmembran-assoziiertem EGFR mittels Zelloberflächenbiotinylierung nach Expression verschiedener CBL-Proteinvarianten in COS7-Zellen.....	70
5.1.4 Untersuchung der EGFR-Internalisierung in Abhängigkeit von verschiedenen CBL-Proteinvarianten in COS7-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung.....	72
5.1.5 Einfluss der CBL-Aminosäuresubstitutionen auf die Rezeptor-vermittelte Internalisierung von fluoreszenz-markiertem epidermalem Wachstumsfaktor in COS7-Zellen	75
5.1.6 Analyse der Auswirkungen von verschiedenen CBL-Proteinvarianten auf die EGF-induzierte Aktivierung von ERK-Kinasen in COS7-Zellen	78
5.2 Analysen zur Funktion von RRAS bei der Regulation von Integrinen	81
5.2.1 Überprüfung einer möglichen Integrin-vermittelten Aktivierung von RRAS mittels GTPase-Pull-Down in stabil RRAS ^{WT} -exprimierenden CHO-Zellen	82
5.2.2 Suche nach RRAS-Bindepartnern.....	84
5.2.3 Untersuchungen zur Interaktion zwischen Talin1 und RRAS mittels Koimmunpräzipitation	87
5.2.4 Untersuchungen zur Interaktion zwischen RIAM und RRAS mittels Koimmunpräzipitation.....	90
5.2.5 Untersuchungen zur Rolle von RRAS bei der Aktivierung von RAP1 mittels GTPase-Pull-Down-Experimenten in COS7-Zellen.....	93
6 Diskussion.....	96

6.1	Aberrantes EGFR-<i>trafficking</i> – ein neuer Pathomechanismus für RASopathien	96
6.2	RRAS als Signalmodul für die Regulierung von Integrinen.....	102
7	Literaturverzeichnis.....	106
	Poster und Veröffentlichungen.....	118
	Danksagung.....	119
	Eidesstattliche Versicherung.....	120

I Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP-2	Adaptorprotein-2
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bidest.	bidestilliert
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CBL	<i>casitas b-lineage lymphoma</i>
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
CHO	Adhärente Fibroblasten aus dem Ovarium des Chinesischen Hamsters
cLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> ; Konfokales Laser-Scanning Mikroskop
cm	Centimeter
CME	<i>clathrin-mediated endocytosis</i>
COS7	Fibroblasten ähnliche Nierenzellen (afrikanische grüne Meerkatze)
COOH-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP, ddNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat, Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	<i>et altera</i> ; und andere
EZM	Extrazelluläre Matrix
F12	Zellkulturmedium
FA	fokale Adhäsionen
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FBS	Fötales Rinderserum
G	Guanin
GAP	<i>GTPase activating proteins</i> ; GTPase-aktivierendes Protein

GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i> ; Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GRB2	<i>growth factor receptor bound-2</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
GTPase	GDP/GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität
h	<i>hour</i> , Stunde
HA	Hämagglutinin des humanen Influenzavirus
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i> ; Hanks Salzlosung
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
Hyg	Hygromycin
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
i. d. R.	in der Regel
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
kg, g, mg, μ g, ng	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
Km	Kanamycin
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	<i>lysogeny broth</i>
M, mM	Molar, Millimolar
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>mitogen activated protein kinase (MAPK)/ERK kinase</i>
min	<i>minute</i> ; Minute
MLC	<i>myosin light chain</i>
nmol, pmol	Nanomol, Pikomol
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCE	<i>non-clathrin-mediated endocytosis</i>
NP-40	Nichtionisches Detergenz P40
NPFs	<i>nucleation promoting factors</i>
NH ₂ -Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OD	Optische Dichte
o. g.	oben genannte
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
P/S	Penicillin/Streptomycin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
Pi	Orthophosphat
PI3K	<i>phosphoinositide-3-kinase</i>
P-Loop	<i>phosphate-binding loop</i>
PM	Plasmamembran

RCSB	<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i>
PDB	<i>Protein Data Base</i>
ProR	<i>prolin rich</i>
PVDF	<i>Polyvinylidendifluorid</i>
RAF1	<i>rat fibrosarcoma kinase</i>
RAL-GDS	<i>RAL guanine nucleotide dissociation stimulator</i>
RAP1	<i>RAS-proximate-1 oder RAS-related protein 1</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RAS-GRF	<i>RAS-specific guanine nucleotide-releasing factor 2</i>
RBD	<i>RAS binding domain</i>
RHO	<i>RAS homology</i>
RIAM	<i>RAP1-interacting adapter molecule</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
s	<i>second; Sekunde</i>
SDS	<i>Sodium-Dodecylsulfate; Natrium-Dodecylsulfat</i>
SH3	<i>Src-homology 3</i>
SOC	<i>super optimal broth</i>
SOS1	<i>son of sevenless homolog1</i>
T	<i>Thymin</i>
Tab.	<i>Tabelle</i>
TB	<i>Terrific broth</i>
TBE	<i>tris-borate-EDTA</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	<i>tris buffered saline mit Tween</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin</i>
TKB	<i>tyrosin-kinase-binding</i>
U	<i>Unit</i>
u. a.	<i>unter anderem</i>
Ub	<i>Ubiquitin</i>
UBA	<i>ubiquitin-associated</i>
Upm	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
u. U.	<i>unter Umständen</i>
UV	<i>ultraviolett</i>
V	<i>Volt</i>
u. a.	<i>unter anderem</i>
ü. N.	<i>über Nacht</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wildtyp</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>

Bei einigen Begriffen, wie z.B. *downstream*, wurden die englischen Fachtermini verwendet, da auch in der deutschsprachigen Literatur eine Übersetzung unüblich ist.

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Kraniofaziale Auffälligkeiten von Patienten mit Noonan-Syndrom	6
Abb. 2.2:	Der RAS-MAPK-Signalweg (vereinfachte Darstellung)	8
Abb. 2.3:	Domänenstruktur von CBL	9
Abb. 2.4:	Ablauf der Ubiquitylierung	10
Abb. 2.5:	Der RRAS-GTPase Zyklus	12
Abb. 2.6:	Das RRAS-Protein	14
Abb. 2.7:	RAP1-vermittelte Integrin-Aktivierung	16
Abb. 5.1:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von CBL mit den in dieser Arbeit analysierten Aminosäuresubstitutionen	63
Abb. 5.2:	Untersuchung der Ubiquitylierung des EGFR nach ektoptischer Expression von verschiedenen CBL-Proteinvarianten in EGF-stimulierten und unstimulierten COS7-Zellen	66
Abb. 5.3:	Einfluss der ektoptischen Expression von CBL-Proteinvarianten auf die EGFR-Degradierung in EGF-stimulierten COS7-Zellen	69
Abb. 5.4:	Bestimmung des EGFR-Anteils an der Zelloberfläche nach ektoptischer Expression der CBL-Proteinvarianten in COS7-Zellen	71
Abb. 5.5:	Internalisierung des EGFR in COS7-Zellen nach Überexpression der verschiedenen CBL-Proteinvarianten	74

Abb. 5.6:	Internalisierung von fluoreszenz-markiertem EGF in COS7-Zellen nach Überexpression der verschiedenen CBL-Proteinvarianten	77
Abb. 5.7:	Bestimmung der ERK-Phosphorylierung nach Expression verschiedener CBL-Proteinvarianten in unstimulierten und EGF-stimulierten COS7-Zellen.	79
Abb. 5.8:	Schematische Darstellung des RRAS-Proteins mit den in dieser Arbeit analysierten Aminosäuresubstitutionen sowie den humanpathogenen Mutationen	82
Abb. 5.9:	Bestimmung der Menge an aktivem RRAS in RRAS ^{WT} -CHO-Zellen nach Stimulation mit Fibronectin	84
Abb. 5.10:	Stabile Expression von RRAS ^{WT} , RRAS ^{G38V} und RRAS ^{S43N} in CHO-Zellen und Anreicherung dieser RRAS-Proteinvarianten durch Koimmunpräzipitation	85
Abb. 5.11:	PAA-Gelelektrophorese und Coomassie®-Färbung von Rohlysaten und Präzipitaten nach stabiler bzw. transienter Expression von RRAS-Proteinvarianten in CHO-Zellen	86
Abb. 5.12:	Schematische Darstellung der Talin1-Domänenstruktur und der Expressionskonstrukte von Talin1- <i>full-length</i> , <i>-rod</i> und <i>-head</i>	87
Abb. 5.13:	Überprüfung einer möglichen Interaktion zwischen Talin1-Proteinvarianten und RRAS ^{WT} in COS7-Zellen mittels KoIP	88
Abb. 5.14:	Überprüfung einer Interaktion von Talin1-Proteinvarianten mit RRAS ^{G38V} in COS7-Zellen durch KoIP	90
Abb. 5.15:	RRAS als direkter Rekrutor von RIAM, einem Talin-Bindeprotein	91
Abb. 5.16:	Nachweis einer Interaktion zwischen RIAM und verschiedenen RRAS-Proteinvarianten mittels KoIP	92
Abb. 5.17:	RRAS als Aktivator von RAP1, einem <i>Signaling</i> -Protein <i>upstream</i> von Talin	93
Abb. 5.18:	Bestimmung der Menge an aktivem RAP1A und RAP1B nach ektopischer Expression von RRAS-Proteinvarianten in COS7-Zellen	94
Abb. 6.1:	Modell für die Auswirkungen der RASopathie-assoziierten CBL-Aminosäuresubstitutionen auf die EGFR-Ubiquitylierung, das EGFR- <i>trafficking</i> und die zelluläre Signalweiterleitung.	100

III Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1:	Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien	19
Tab. 4.2:	Vorliegende Konstrukte für die Expression in Eukaryoten	20
Tab. 4.3:	Vorliegende Konstrukte für die Expression in Bakterien	21
Tab. 4.4:	Übersicht über verwendete Vektoren zur Herstellung neuer Konstrukte	21
Tab. 4.5:	Hergestellte Konstrukte für die Expression in Eukaryoten	21
Tab. 4.6:	Mit Hilfe einer Topoisomerase-Reaktion hergestellte Eingangsvektoren für die Gateway TM -Technologie	22
Tab. 4.7:	Mit Hilfe der Gateway TM -Technologie hergestellte Konstrukte	22
Tab. 4.8:	Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen	23
Tab. 4.9:	Verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen	24
Tab. 4.10:	Übersicht über die verwendete Primärantikörper	25
Tab. 4.11:	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper	25
Tab. 4.12:	Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedien	44
Tab. 4.13:	Zusammensetzung verschiedener Trenn- und Sammelgele	59

1 Zusammenfassung

RASopathien umfassen eine Gruppe von klinisch überlappenden Erkrankungen, die durch Keimbahnmutationen in für Proteine des RAS-MAPK-Signalwegs kodierenden Genen verursacht werden. Das Noonan-Syndrom ist das am häufigsten vorkommende Syndrom unter den RASopathien und ist durch typische kraniofaziale Dysmorphien, Kleinwuchs und kongenitale Herzfehler gekennzeichnet. Ein Drittel der Betroffenen zeigt zudem Lernschwierigkeiten.

Vor wenigen Jahren wurde das Tumorsuppressorgen *CBL* als Krankheitsgen für einen mit dem Noonan-Syndrom ähnlichen Phänotyp identifiziert. *CBL* kodiert für ein multivalentes Adapterprotein mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, das über Ubiquitylierung eine Vesikel-basierte Internalisierung und Degradierung des epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) Rezeptors (EGFR) initiiert und so den zellulären EGFR-Transport (*trafficking*) reguliert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die funktionellen Auswirkungen der RASopathie-assoziierten *CBL*-Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q auf Liganden-induzierte/s EGFR-Ubiquitylierung und EGFR-*trafficking* untersucht. Mittels Koimmunpräzipitationen wurde gezeigt, dass eine Expression von *CBL*^{K382E}, *CBL*^{D390Y} und *CBL*^{R420Q} in EGF-stimulierten COS7-Zellen zu einer verminderten EGFR-Ubiquitylierung führt; darüber hinaus war die Degradierung des EGFR verzögert. Des Weiteren konnte mit Hilfe von Zelloberflächenbiotinylierungs-Experimenten in den *CBL*-Mutanten exprimierenden Zellen eine erhöhte Menge an EGFR an der Zelloberfläche und eine signifikante Reduktion der intrazellulären EGFR-Menge nachgewiesen werden. Beide Ergebnisse weisen auf eine ineffektive EGFR-Internalisierung hin. Damit übereinstimmend war in diesen Zellen auch die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von EGF vermindert, was immunzytochemisch mit fluoreszenz-markiertem EGF488 festgestellt wurde.

Diese Daten zeigen, dass die pathogenen *CBL*-Mutationen den Vesikel-basierten Transport vom EGFR stark verändern. Eine dem Noonan-Syndrom und anderen RASopathien gemeine pathophysiologische Auffälligkeit ist die Hyperstimulation der RAS-MAPK-Signalkaskade; dementsprechend konnte in *CBL*^{K382E}-, *CBL*^{D390Y}- oder *CBL*^{R420Q}-exprimierenden Zellen eine erhöhte Phosphorylierung der MAP-Kinase

ERK detektiert werden. Zusammengefasst kann das durch *CBL*-Mutationen veränderte *EGFR-trafficking* als Ursache für die Hyperstimulation der RAS-MAPK-Signalkaskade postuliert und somit erstmals ein verändertes *EGFR-trafficking* als zugrunde liegender Pathomechanismus für eine RASopathie beschrieben werden.

Kürzlich wurde berichtet, dass Mutationen im *RRAS*-Gen ebenfalls zu einem Noonan-Syndrom überlappenden Phänotyp führen. Das kleine GTP-bindende Protein *RRAS* übernimmt in der Zelle als molekularer Schalter eine zentrale Funktion bei der Signalweiterleitung, indem es zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand alterniert. *RRAS*-abhängige Signalwege aktivieren Integrine und regulieren die Komposition bzw. Dynamik von fokalen Adhäsionen, was einem klassischen *inside-out* Signalweg entspricht; *RRAS* seinerseits kann wiederum nach Integrin-Liganden Bindung im Sinne eines *outside-in* Signalwegs gesteuert werden. Allerdings sind die molekularen Mechanismen innerhalb beider Signalrichtungen noch völlig unklar. Aus diesem Grund wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die molekularen Zusammenhänge zwischen *RRAS* und den Integrinen untersucht. Zuerst wurde mittels *GTPase-Pull-Down* Experimente in stabil *RRAS*^{WT}-exprimierenden CHO-Zellen verifiziert, dass *RRAS* durch Stimulation der Integrine mit Liganden aktiviert wird, was auf eine Integrin-vermittelte *RRAS*-Aktivierung im Sinne eines *outside-in-signaling* schließen lässt. Mehrere Hinweise aus der Literatur ließen vermuten, dass Talin als Brückenprotein bei der *RRAS*-vermittelten Integrin-Aktivierung eine Rolle spielen könnte. Mittels Koimmunpräzipitationen in COS7-Zellen konnte tatsächlich eine schwache Interaktion zwischen aktivem, GTP-gebundenem *RRAS* und Talin festgestellt werden; ob diese Bindung direkt oder indirekt stattfindet ist noch nicht abschließend geklärt. Darüber hinaus wurde der GTPase-Effektor RIAM, der zudem ein bekannter Protein-Bindepartner von Talin ist, wiederum mittels Koimmunpräzipitationen als neuer Interaktionspartner von *RRAS* identifiziert; diese Interaktion stellte sich unabhängig vom *RRAS*-Aktivitätszustand dar. Zusammengenommen geben die hier erzielten Ergebnisse erste Hinweise auf die molekularen Mechanismen bei der Talin-vermittelten Aktivierung von Integrinen durch *RRAS* und können so zukünftig zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie bei RASopathien beitragen.

1.1 Summary

RASopathies encompass a group of genetic syndromes caused by mutations in genes coding for proteins which are involved in the RAS-MAPK signaling pathway. Noonan syndrome is the most common disorder among the RASopathies and is characterized by a typical face, short stature and various heart defects. One third of the patients have learning difficulties.

Recently, mutations in the *CBL* tumor suppressor gene have been reported in patients with a Noonan syndrome-like phenotype. *CBL* encodes a multivalent adaptor protein with ubiquitin ligase activity, which promotes vesicle-mediated internalization and degradation of the epidermal growth factor (EGF) receptor (EGFR) via ubiquitylation, thereby CBL is a major regulator of cellular EGFR trafficking.

In the first part of this work, the functional consequences of RASopathy-associated CBL amino acid changes p.K382E, p.D390Y and p.R420Q on ligand-induced EGFR ubiquitylation and EGFR trafficking were investigated. Co-immunoprecipitations revealed that the expression of CBL^{K382E}, CBL^{D390Y} or CBL^{R420Q} in COS7-cells resulted in an impaired CBL-mediated EGFR ubiquitylation; consistently, the degradation of EGFR was delayed. Furthermore, by using biotinylation-assays increased levels of surface EGFR and reduced amounts of intracellular EGFR were observed in cells expressing CBL mutants. Both consequences indicate ineffective EGFR internalization. Accordingly, receptor-mediated uptake of EGF was decreased as it was shown by using microscopic analysis with fluorescently labeled EGF (EGF488).

These data indicate that pathogenic *CBL* mutations severely affect vesicle-based EGFR trafficking. The common trait of Noonan syndrome and other RASopathies is an enhanced signal flow through RAS-MAPK cascade; in line with this, enhanced ERK phosphorylation was detected in cells expressing CBL^{K382E}, CBL^{D390Y} or CBL^{R420Q}. In conclusion, RASopathy-associated *CBL* mutations cause aberrant EGFR trafficking, which finally results in hyperstimulation of RAS-MAPK pathway. Thus, these data suggest that EGFR trafficking is a novel disease-relevant regulatory level in the RASopathy network.

Recently it has been reported that mutations in the *RRAS* gene also cause a Noonan syndrome-like phenotype. The small GTP-binding protein RRAS functions as a molecular switch that controls intracellular signaling networks by alternating between an active, GTP-bound and an inactive, GDP-bound state. Within a classical inside-out-signaling pathway RRAS activates integrins and regulates the composition and dynamics of focal adhesions. On the other hand in the direction of an outside-in-signaling cascade RRAS is regulated upon binding of integrins and their respective ligands. Until today the molecular mechanisms within this bidirectional signal flow are poorly understood. Therefore, in the second part of this work the molecular relationships between RRAS and integrins were studied. First, GTPase-pull-down-assays and stably *RRAS*^{WT} expressing CHO-cells were used to verify that integrin stimulation by extracellular ligands results in RRAS activation; this underscores the presence of an outside-in-signaling pathway involving integrins and RRAS. The integrin binding protein Talin has been suggested to mediate RRAS-dependent integrin activation. Indeed, co-immunoprecipitation experiments in COS7 showed a weak interaction between active, GTP-bound RRAS and Talin; however, if this binding is direct or indirect remains to be determined. Most interestingly, another Talin binding protein, the GTPase effector RIAM, was identified as a new interaction partner of RRAS and notably, the RIAM::RRAS interaction was independent from RRAS activation state. Taken together, these data provide first clues on molecular mechanisms during Talin-mediated activation of integrins by RRAS and may contribute to a better understanding of the pathophysiology of RASopathies in the future.

2 Einleitung

2.1 RASopathien, eine Gruppe von klinisch überlappenden Erkrankungen mit ähnlichen pathomechanistischen Ursachen

In den letzten Jahren kristallisierte sich eine Gruppe von klinisch ähnlichen Erkrankungen heraus, die durch Keimbahnmutationen in für Proteine des RAS (*rat sarcoma*)-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalwegs kodierenden Genen verursacht werden (Zenker 2011). Zu den Erkrankungen gehören das Noonan-Syndrom, das kardio-fazio-kutane (*cardio-facio-cutaneous*, CFC) Syndrom und das Costello-Syndrom, die auch als neuro-kardio-fazio-kutane (*neuro-cardio-facio-cutaneous*, NCFC) Syndrome oder RASopathien zusammengefasst werden (Zenker 2009; Tartaglia et al. 2011; Zenker 2011; Tartaglia et al. 2011). Die große Mehrzahl der krankheits-assoziierten Mutationen führt zu einer gesteigerten Signaltransduktion innerhalb der RAS-MAPK-Kaskade; es wird also von einem Funktionsgewinn (*gain of function*) durch die Mutationen ausgegangen (Tartaglia et al. 2010; Tidyman und Rauen 2009). Auch wenn sich jedes einzelne der Syndrome durch eine Reihe charakteristischer klinischer Merkmale auszeichnet, gibt es große phänotypische Überlappungen wie kraniofaziale Dysmorphien, Kleinwuchs, kutane Veränderungen, kongenitale Herzfehler, Lernschwierigkeiten bzw. Intelligenzminderung und u. U. eine Prädisposition für Tumore (Zenker 2011).

2.1.1 Noonan-Syndrom: Bekannte Gene und Pathomechanismen

Das Noonan-Syndrom ist das am häufigsten vorkommende Syndrom unter den RASopathien (Binder 2009). Zu den phänotypischen Merkmalen gehören, wie auch bei anderen RASopathien, kongenitale Herzfehler, Kleinwuchs und typische kraniofaziale Dysmorphien. Ein Drittel der Patienten zeigt außerdem Lernschwierigkeiten. Typische Herzfehler sind hypertrophe Kardiomyopathien (*hypertrophic cardiomyopathy*, HCM) und Pulmonalstenose (Tartaglia et al. 2010). Zu

den typischen kraniofazialen Dysmorphien gehören unter anderem Hypertelorismus, Ptosis, Epikanthus und tief ansetzende, nach hinten rotierte Ohren (Abb. 2.1).

Keimbahnmutationen werden in absteigender Häufigkeit in einem der Gene *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *RIT1*, *KRAS* oder *NRAS* gefunden (Aoki et al. 2013; Roberts et al. 2013; Zenker 2011). Dabei handelt es sich um Gene, die für Proteine innerhalb des RAS-MAPK-Signalwegs kodieren. Des Weiteren konnten kürzlich in den beiden Genen *SHOC2* und *CBL* Mutationen identifiziert werden, die zu einem Noonan-Syndrom ähnlichen Phänotyp führen (Cordeddu et al. 2009; Martinelli et al. 2010; Niemeyer et al. 2010). Die Proteine CBL und SHOC2 spielen ebenfalls eine essentielle Rolle bei der RAS-MAPK-Signalweiterleitung (Rodriguez-Viciano et al. 2006; Swaminathan und Tsygankov 2006).



Abb. 2.1: Kraniofaziale Auffälligkeiten von Patienten mit Noonan-Syndrom. Die Diagnose der gezeigten Patienten ist Noonan-Syndrom, aufgrund einer Mutation in (A) *PTPN11*, (B) *SOS1* und (C) *SHOC2*. Zu den typischen fazialen Dysmorphien gehören Hypertelorismus mit nach lateral außen abfallenden Lidachsen, Ptosis, prominenter Stirn, tief ansetzenden, nach hinten rotierten Ohren und kurzer Hals (Zenker 2011).

Das mit *CBL* (*c*asitas *b*-lineage *l*ymphoma)-Mutationen assoziierte klinische Bild ist sehr variabel und geht mit vermindertem postnatalem Wachstum, Entwicklungsverzögerung, Kryptorchismus bei männlichen Patienten und einer Prädisposition für juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) einher (Martinelli et al. 2010; Niemeyer et al. 2010; Pérez et al. 2010). Außerdem konnten somatische *CBL*-Mutationen bei verschiedenen myeloproliferativen Erkrankungen gefunden werden (Caligiuri et al. 2007; Sargin et al. 2007; Loh et al. 2009; Makishima et al. 2009; Muramatsu et al. 2010). Mutationen in den o. g. Genen sind die Ursache für

das Noonan-Syndrom bei ca. 70-80% der klinisch diagnostizierten Patienten (Zenker 2011).

Kürzlich wurde berichtet, dass Mutationen in *RRAS* zu einem mit dem Noonan-Syndrom überlappenden Phänotyp führen. Neben einigen typischen Merkmalen für RASopathien, wie tief ansetzende Ohren, nach lateral außen abfallenden Lidachsen und das Vorhandensein von Malignomen, weisen die zwei Patienten mit *RRAS*-assoziierten Keimbahnmutationen zusätzlich einige untypische Merkmale auf. Funktionelle Analysen zeigten, dass die identifizierten Keimbahnmutationen zu einer gesteigerten Signaltransduktion innerhalb des RAS-MAPK-Signalwegs führen. Damit gilt *RRAS* als neues Krankheitsgen für RASopathien (Flex et al. 2014).

Die Mehrzahl der krankheitsursächlichen Sequenzvarianten für das Noonan-Syndrom sind *gain-of-function*-Mutationen in Genen, die für Komponenten des RAS-MAPK-Signalwegs kodieren; es wird also eine Hyperstimulation der RAS-abhängigen Signalwege angenommen (Schubert 2007; Tidyman und Rauen 2009). Bei diesen Signaltransduktionswegen handelt es sich um komplexe Kaskaden, die durch die Bindung von extrazellulären Liganden an Transmembran-Rezeptoren aktiviert werden, wie z.B. von EGF (*epidermal growth factor*) an den EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Abb. 2.2). Nach Liganden-induzierter Dimerisierung und Tyrosinphosphorylierung des EGFR, wird die RAS-MAPK-Kaskade durch Rekrutierung von spezifischen Adapterproteinen wie GRB2 (*growth factor-bound protein 2*) initiiert. Anschließend bindet SOS1 (*son of sevenless homolog 1*), ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF), der den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert und damit die RAS-GTPasen aktiviert (siehe auch Abb. 2.5 und Kapitel 2.3) (Margarit et al. 2003). Eine Inaktivierung der RAS-GTPasen wird über die Hydrolyse von GTP zu GDP erreicht. Die RAS-GTPasen dienen somit als molekulare Schalter, die im inaktiven Zustand (GDP-gebunden) keine Signale weiterleiten und im aktiven Zustand (GTP-gebunden) Effektorproteine, wie z. B. RAF-Kinasen (*rat fibrosarcoma kinases*), aktivieren (Donovan et al. 2002; Tidyman und Rauen 2009). Die Aktivierung der RAF-Kinasen führt zu einer Phosphorylierung und damit zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen MEK1/2 [*mitogen activated protein kinase (MAPK)/ERK kinase 1/2*] und ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) (Tartaglia et al. 2010).

Phosphoryliertes ERK1/2 wird in den Zellkern transloziert, wo die Kinasen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren. So werden über den RAS-MAPK-Signalweg wichtige basale Zellfunktionen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod gesteuert (Yoon und Seger 2006). Das CBL-Protein reguliert als Ubiquitin-Ligase über die Ubiquitylierung des EGFR eine Rezeptor-vermittelte RAS-MAPK-Signaltransduktion (siehe auch Kapitel 2.2.1).

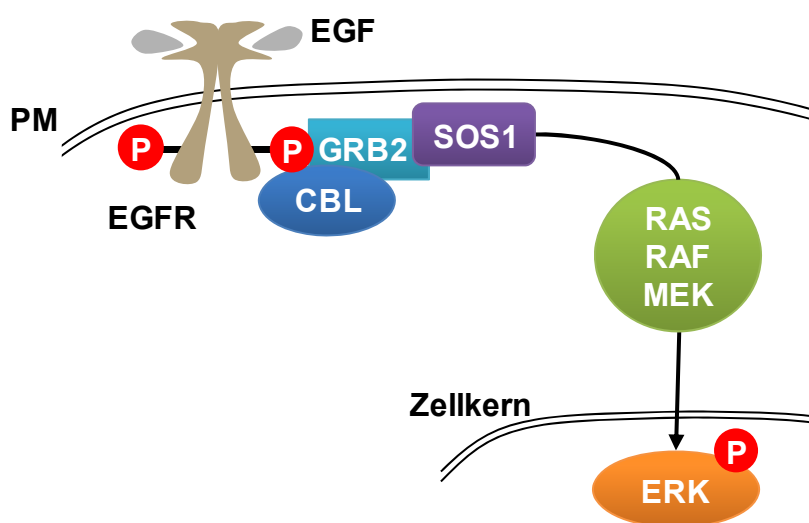


Abb. 2.2: Der RAS-MAPK-Signalweg (vereinfachte Darstellung). Die Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) an den EGF-Rezeptor (EGFR) führt zu dessen Dimerisierung und Phosphorylierung. Adapterproteine wie GRB2 und die Ubiquitin-Ligase CBL werden an den aktiven EGFR rekrutiert. SOS1 bindet dann an GRB2 und aktiviert die RAS-GTPasen, welche im aktiven Zustand an die RAF-Kinasen binden und diese ebenfalls aktivieren. Nach Phosphorylierung von MEK1/2, wird ERK1/2 phosphoryliert und in den Zellkern transloziert, wo die Kinasen Transkriptionsfaktoren regulieren. CBL reguliert durch EGFR-Ubiquitylierung den Signalweg. PM, Plasmamembran; P, Phosphat.

2.2 Die Ubiquitin-E3-Ligase CBL

Das Tumorsuppressorgen *CBL* kodiert für das multivalente Adapterprotein CBL mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität (Schmidt und Dikic 2005). Bisher sind drei Unterfamilien der E3-Ligasen bekannt: Enzyme mit HECT-, mit RING- oder mit U-Box-Domäne (Fang und Weissman 2004). Dabei repräsentieren die Enzyme mit RING-Domäne die größte Gruppe, zu der auch das CBL-Protein gehört. Die Familie der CBL-Proteine besteht aus den drei Säugetierhomologen c-CBL, CBL-b und CBL-c, die sich in der Länge ihres COOH-Terminus und somit in der Funktion als Adapterprotein

unterscheiden. In dieser Arbeit steht die bereits gut untersuchte Isoform c-CBL im Mittelpunkt, die ubiquitär exprimiert wird. Das CBL-Protein besitzt vier Domänen: die NH₂-terminale TKB (*tyrosin-kinase-binding*)-Domäne, die zentrale RING-Domäne, die ProR (*prolin rich*)-Domäne und die COOH-terminale UBA (*ubiquitin-associated*)-Domäne (Abb. 2.3). Die TKB-Domäne (AS 47-345) vermittelt die Bindung von CBL an Phosphotyrosin-Reste. Die zentrale, hoch konservierte RING-Domäne (AS 381-423) birgt die intrinsische Ubiquitin-Ligase-Aktivität und dient demnach der Übertragung von Ubiquitin-Molekülen auf Zielproteine. COOH-terminal von der RING-Domäne schließt sich die ProR-Domäne (AS 481-688) an, die eine Protein-Protein-Interaktion vermittelt, wie z. B. an das Adapterprotein GRB2. Am COOH-Terminus von CBL liegt die eine Ubiquitin-Bindung vermittelnde UBA-Domäne (AS 857-894). Die Domänen sind über sogenannte *linker*-Regionen verbunden (Schmidt und Dikic 2005; Thien und Langdon 2005).

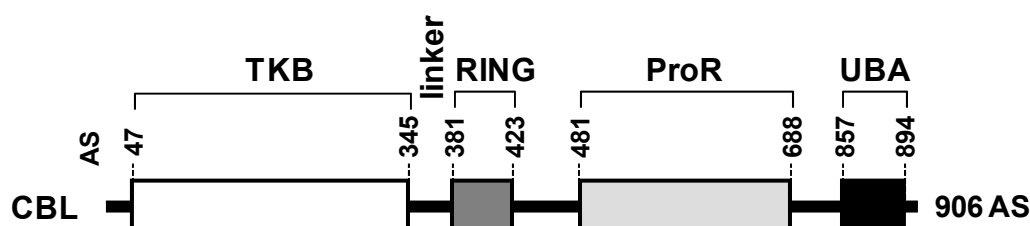


Abb. 2.3: Domänenstruktur von CBL. Die funktionellen Proteindomänen von CBL sind als Rechtecke dargestellt. Die Gesamtanzahl der Aminosäuren im CBL-Protein ist rechts neben der Domänenstruktur, die Bezeichnung der einzelnen Domänen über den Rechtecken angegeben. AS, Aminosäuren; TKB: *tyrosine kinase binding domain*; linker: *linker sequence*; RING: *RING finger domain*; ProR: *proline-rich region* und UBA: *ubiquitin-associated domain*.

Ubiquitin-E3-Ligasen, wie z. B. CBL, spielen eine essentielle Rolle bei der Ubiquitin-Übertragung von E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen auf Zielproteine, z. B. auf den EGFR. Ubiquitin ist ein kleines ubiquitär exprimiertes Protein, das kovalent an Zielproteine gebunden werden kann. Bei der Übertragung von Ubiquitin auf Substrate handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, der Ubiquitylierung genannt und von drei Enzymen (E1, E2 und E3) katalysiert wird (Abb. 2.4). Im ersten Schritt wird Ubiquitin aktiviert, indem das E1-Enzym ATP-abhängig eine Thioesterbindung zwischen Ubiquitin und einem spezifischen Cysteinrest des E1-Enzyms stimuliert. Im zweiten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin auf einen Cysteinrest des E2-Enzyms (Ubiquitin-konjugierendes Enzym) übertragen und im

dritten Schritt wird schließlich das Ubiquitin, katalysiert durch eine Ubiquitin-E3-Ligase (E3-Enzym), vom E2-Enzym auf ein Lysin des Zielproteins (Substrats) übertragen (Fang und Weissman 2004).

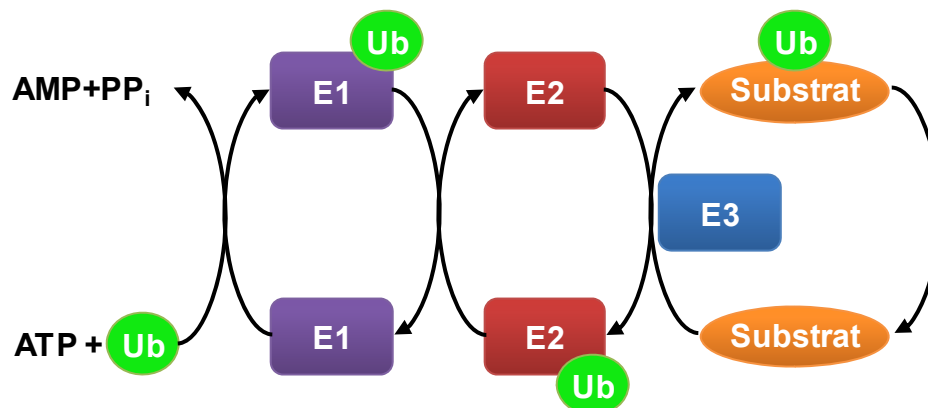


Abb. 2.4: Ablauf der Ubiquitylierung. Der genaue Ablauf der Ubiquitylierung ist im Text erklärt. E1, Ubiquitin-aktivierendes Enzym; E2, Ubiquitin-konjugierendes Enzym; E3, Ubiquitin-E3-Ligase; ATP, Adenosintri-phosphat; AMP, Adenosinmonophosphat; PP_i, Pyrophosphat; Ub, Ubiquitin.

Substrate können einfach (Monoubiquitylierung) oder mehrfach ubiquityliert werden. Bei der Mehrfachubiquitylierung werden entweder weitere Ubiquitin-Moleküle auf andere Lysine des Zielproteins (Multiubiquitylierung) oder auf schon gebundene Ubiquitinreste (Di-Ubiquitylierung oder Polyubiquitylierung) übertragen. Je nach Ubiquitylierungsmuster wird über das Schicksal der Zielproteine entschieden; sind diese monoubiquityliert werden sie im Lysosom abgebaut (Miranda und Sorkin 2007), sind sie polyubiquityliert, erfolgt ein Abbau über das Proteasom (Pickart und VanDemark 2000). Über diesen Mechanismus können beispielsweise Signalwege geregelt werden (siehe auch Kapitel 2.2.1).

2.2.1 CBL reguliert das *trafficking* des EGF-Rezeptors

Für CBL wurde bereits eine Funktion in der Liganden-induzierten Internalisierung und postendozytotischen Sortierung von verschiedenen Zelloberflächenproteinen, wie dem EGFR, beschrieben (Piper und Lehner 2011), welcher einen wichtigen Zugang zum RAS-MAPK-Signalweg darstellt. Derzeit wird von folgendem Modell ausgegangen: Nach Liganden-vermittelter Aktivierung des EGFR wird CBL direkt durch die Interaktion mit dem Rezeptor über einen Phosphotyrosin-Rest (Levkowitz et al. 1999) und indirekt durch das Adapterprotein GRB2 (Waterman et al. 2002;

Jiang et al. 2003) an den aktiven EGFR rekrutiert. E2-Ubiquitin-konjugierende Enzyme werden dann an die RING-Domäne von CBL rekrutiert, um beispielsweise die EGFR-Ubiquitylierung zu katalysieren. Anschließend wird durch eine Interaktion mit Ubiquitin-bindenden Proteinen, wie z. B. Epsin, und anderen endozytotischen Proteinen, wie z. B. AP-2, die EGFR-Internalisierung initiiert (Sorkin und Goh 2009). Der EGFR kann auf unterschiedliche Weise endozytiert werden: Nach Stimulation mit niedriger EGF-Konzentration erfolgt die Internalisierung ausschließlich über eine Clathrin-abhängige Endozytose (*clathrin-mediated endocytosis*, CME). Bei Stimulation mit höheren Konzentrationen werden nur noch ca. 60% der EGFR über CME und ca. 40% über die Clathrin-unabhängige Endozytose (*non-clathrin-mediated endocytosis*, NCE) internalisiert (Sigismund et al. 2005; Sigismund et al. 2008). Die EGFR-Ubiquitylierung scheint für die NCE notwendig zu sein (Sigismund et al. 2013); die Notwendigkeit für eine CME wird noch kontrovers diskutiert (Madhus und Stang 2009; Dikic und Schmidt 2007; Haglund und Dikic 2012; Sorkin und Goh 2009; Sigismund et al. 2012). Dass die Ubiquitin-Markierung des EGFR für die Degradierung essentiell ist, konnte bereits in diversen Studien gezeigt werden (Levkowitz et al. 1998; Levkowitz et al. 1999; Hall et al. 2003). Nachdem der EGFR internalisiert und zum Endosom transportiert wurde, wird ein großer Anteil zurück zur Plasmamembran transportiert (*recycling*) und kann erneut internalisiert werden. Nur ein kleiner Teil der Rezeptoren wird in das Lysosom transportiert und dort abgebaut. EGFR, die durch Ubiquitin markiert sind, werden im frühen Endosom durch die ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-Maschinerie erkannt und durch Invagination in intraluminale Vesikel der vesikulären Körperchen (*multivesicular bodies*, MVBs) eingeschlossen. Durch Fusion der MVBs mit lysosomalen Vesikeln, die proteolytische Enzyme enthalten, entstehen die Lysosomen, in denen die EGFR abgebaut werden (Futter et al. 1996). Demnach wird durch die Degradierung der EGFR, vermittelt durch die Ubiquitylierung, die zelluläre Anzahl an Rezeptoren vermindert; ein Prozess, der auch Rezeptor-*downregulation* genannt wird und in der Zelle zur Regulierung der Stärke und Dauer einer Signalübertragung dient (Sorkin und Goh 2009). Damit reguliert CBL durch die Kontrolle von EGFR-Internalisierung und -Degradierung den EGFR-RAS-MAPK-Signalweg. Damit einhergehend konnte gezeigt werden, dass Mutationen in CBL zu

einer eingeschränkten Ubiquitylierung sowie verminderten EGFR-Internalisierung und -Degradierung führen (Waterman et al. 2002; Thien et al. 2001; Jiang et al. 2003) und somit zu einer Hyperstimulation des RAS-MAPK-Signalwegs (Martinelli et al. 2010; Niemeyer et al. 2010; Sargin et al. 2007).

2.3 Die kleine GTPase RRAS

RRAS konnte erst kürzlich als Krankheitsgen für die RASopathien identifiziert werden (Flex et al. 2014). Das RRAS-Protein gehört zu der RAS-Superfamilie und wird in der Zelle ubiquitär exprimiert (Gotoh et al. 1997). Das kleine GTP-bindende Protein RRAS übernimmt in der Zelle als molekularer Schalter eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion (Abb. 2.5) (Lowe und Goeddel 1987). Die Aktivierung von RRAS, also der Austausch von GDP zu GTP, erfolgt insbesondere über die beiden GEFs RAS-GRF (*RAS-specific guanine nucleotide-releasing factor 2*) und C3G, wohingegen SOS keinen Effekt auf RRAS hat (Gotoh et al. 1997). Die dadurch hervorgerufene Konformationsänderung von RRAS führt zu einer erhöhten Affinität zu Effektorproteinen (Abb. 2.5) (Milburn et al. 1990).

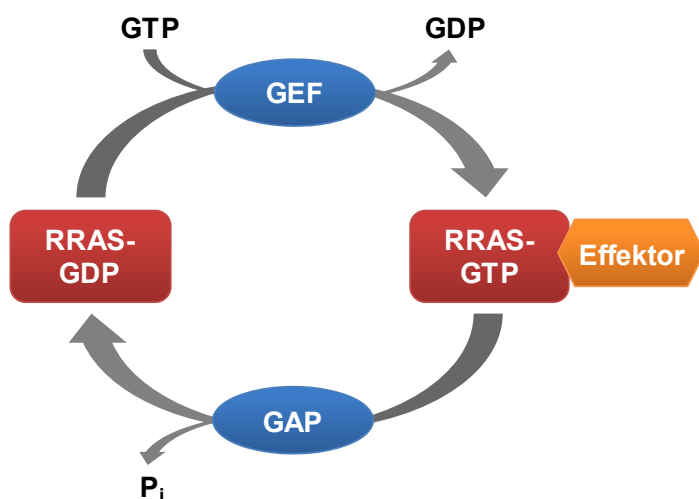


Abb. 2.5: Der RRAS-GTPase Zyklus. Die kleine GTPase RRAS alterniert zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen und einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand, in dem sie mit Effektorproteinen interagiert und so Signaltransduktionskaskaden stimuliert. Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysieren den Übergang von dem inaktiven in den aktiven Zustand. GTPase aktivierende Proteine (GAPs) stimulieren die Hydrolyse von GTP zu GDP und P_i (Orthophosphat). GDP, Guanosindiphosphat; GTP, Guanosintriphosphat.

RRAS weist eine 55%ige Aminosäuresequenzhomologie zu den bekannten RAS-GTPasen HRAS, NRAS und KRAS auf, verfügt aber über einen einzigartigen NH_2 -Terminus mit 26 zusätzlichen Aminosäuren mit völlig unbekannter Funktion (Lowe und Goeddel 1987). Aktives RRAS stimuliert durch eine Interaktion mit den Effektorproteinen PI3K (*phosphoinositide-3-kinase*), RAF und RAL-GDS (*RAL*

guanine nucleotide dissociation stimulator) (Marte et al. 1997; Rodriguez-Viciano et al. 1994) zelluläre Signaltransduktionskaskaden und ist damit theoretisch in der Lage, eine Vielzahl von zellphysiologischen Funktionen zu modulieren und zu regulieren (Karnoub und Weinberg 2008). Allerdings scheint RRAS im Gegensatz zu HRAS bzw. KRAS nur PI3K zu aktivieren, nicht aber RAF oder RAL-GDS, was auf funktionelle Unterschiede zwischen RRAS, HRAS und KRAS hinweist (Marte et al. 1997; Sethi et al. 1999; Urano et al. 1996). Bereits vor der Entdeckung von Keimbahnmutationen in den verschiedenen *RAS*-Genen als Ursache für RASopathien, war schon lange die onkogene Bedeutung somatischer *RAS*-Mutationen bekannt. Die in Tumoren identifizierten *RAS*-Mutationen führen zu RAS-Proteinen, die konstitutionell (unabhängig von Wachstumsfaktoren) aktiv sind, da GTP nicht mehr hydrolysiert werden kann (Barbacid 1990; Bos 1989; Scheffzek et al. 1997).

Wie auch die anderen RAS-GTPasen, verfügt das RRAS-Protein über eine P-Loop, sowie eine Switch I- und Switch II-Region. Die Abbildung 2.6 zeigt zur Veranschaulichung eine schematische Darstellung des RRAS-Proteins. Die Aminosäuren im P-Loop vermitteln die Bindung von GDP und GTP sowie eines Magnesium-Ions, welches die Nukleotid-Bindung unterstützt (Milburn et al. 1990). Die Switch I- und auch die Switch II-Region sind für eine Interaktion von RRAS mit Regulatoren und bereits genannten Effektoren erforderlich (Vetter und Wittinghofer 2001). Der COOH-Terminus von RRAS beinhaltet eine Prolin-reiche (ProR) Sequenz, die eine Klasse II SH3-Bindesequenz darstellt und demnach eine Protein-Protein-Interaktion vermittelt (Wang et al. 2000), sowie eine CVLL (Cystein-Valin-Leucin-Leucin)-Sequenz, die eine posttranslationale Modifizierung durch Palmitoylierung vermittelt; diese dient der Membranlokalisation des Proteins (Ahearn et al. 2012). RRAS lokalisiert in der Zelle an Endomembranen, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat, sowie an der Plasmamembran (Furuhjelm und Peränen 2003; McHugh et al. 2010). In COS7-Zellen konnte RRAS auch in endosomalen Strukturen beobachtet werden (Takaya et al. 2007; Conklin et al. 2010).

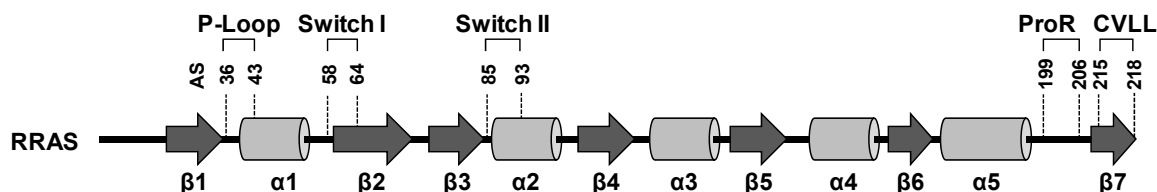


Abb. 2.6: Das RRAS-Protein. Die schematische Abbildung zeigt die RRAS-Proteinsekundärstruktur mit α -Helices als Zylinder und β -Faltblättern als Pfeile. Die wichtigsten funktionellen Proteinregionen sind über der Sekundärstruktur angegeben. AS, Aminosäuren. P-Loop: *phosphate-binding loop*; Switch I; Switch II; ProR: *proline-rich region*; CVLL: *Cystein-Valin-Leucin-Leucin*.

2.3.1 RRAS und die Integrinbiologie

Die Aktivierung von RRAS führt zu einer vermehrten Bildung von fokalen Adhäsionen und größeren adhäsiven Strukturen in der Zelle (Furuhjelm und Peränen 2003). Des Weiteren ist bekannt, dass RRAS-abhängige Signalwege zur Integrin-Aktivierung führen und damit eine verstärkte Zelladhäsion ermöglichen (Kinbara et al. 2003; Zhang et al. 1996). Diese Funktion von RRAS stellt einen grundlegenden Unterschied zu dem homologen HRAS dar, denn HRAS hat einen inhibierenden Effekt auf die Aktivierung von Integrinen (Zhang et al. 1996). Allerdings sind die molekularen Mechanismen, wie RRAS die Regulation von Integrinen und fokalen Adhäsionen steuert, noch völlig unbekannt.

Fokale Adhäsionen (FAs) sind Multi-Protein-Komplexe, die eine Verbindung der Zelle über Transmembran-Rezeptoren mit der extrazellulären Matrix (EZM) ermöglichen. Diese Verbindung hat zum einen eine strukturelle Aufgabe und zum anderen dient sie dem Informationsaustausch. FAs nehmen damit eine wichtige Rolle für Zellmigration, -proliferation und -differenzierung ein (Zamir und Geiger 2001; Zaidel-Bar et al. 2004; Geiger und Yamada 2011). In den meisten FAs vermitteln Integrine über ihre extrazellulären Domänen eine Bindung an Komponenten der EZM, wie z. B. Fibronectin und Kollagen, und interagieren über den zytoplasmatischen Teil mit dem Aktin-Zytoskelett. FAs beinhalten neben den Integrinen verschiedene Gerüst- und Adapterproteine, wie z. B. Talin und Paxillin. Die FAs und die dort lokalisierten, transmembranen Integrine vermitteln einen bidirektionalen Informationsaustausch zwischen der EZM und dem Zytoskelett; dieser Austausch wird auch als *inside-out*- bzw. *outside-in-signaling* bezeichnet (Abram und Lowell 2009). Ein Beispiel für das *inside-out-signaling* ist die durch intrazelluläre Signale vermittelte Integrin-

Aktivierung. Dabei kommt es durch eine Interaktion der zytoplasmatischen Domäne mit bestimmten Aktivatoren zu einer Konformationsänderung der extrazellulären Domäne der Integrine; diese Konformationsänderung führt zu einer höheren Affinität zu extrazellulären Liganden (z. B. Fibronectin) (Kinbara et al. 2003). Für Talin, ein Protein des Aktin-Zytoskeletts, wurde bereits beschrieben, dass es an Integrine binden und diese über eben diesen Mechanismus aktivieren kann (Calderwood 2004; Tadokoro et al. 2003). Talin weist eine 220 kDa schwere *rod*-Domäne und eine 47 kDa schwere COOH-terminale *head*-Domäne auf (Critchley 2009; Roberts, Gordon C K und Critchley 2009). Der Talin-*head* besteht aus der FERM-Domäne, die aus den drei Subdomänen F1, F2 und F3 sowie einer NH₂-terminalen F0-Domäne zusammengesetzt ist (Elliott et al. 2010). Sowohl die F0-Domäne als auch die F1- und F3-Subdomänen sind essentiell für die Aktivierung von Integrinen (Calderwood et al. 2002; García-Alvarez et al. 2003; Anthis et al. 2009). Eine zentrale Fragestellung der Integrinbiologie beschäftigt sich mit der Regulation der Talin-Integrin-Interaktion und somit der Kontrolle der Integrin-Aktivierung. Eine Arbeit weist auf eine Beteiligung von RAS-GTPasen bei der Talin-vermittelten Integrin-Aktivierung hin (Kinbara et al. 2003). Bemerkenswert ist auch, dass in Talin-defizienten Zellen RRAS nicht mehr in der Lage ist, Integrine zu aktivieren (Tadokoro 2003), und interessanterweise weist die F0-Domäne von Talin eine hohe strukturelle Homologie zu der RBD (RAS-binding domain) von RALGDS, einem RAS-Effektorprotein auf (Huang et al. 1998). Des Weiteren zeigt die Oberfläche von Talin die gleiche elektrostatische Ausrichtung wie die der RBD von RALGDS und anderer RBDs (Goult et al. 2010). Es wurde bereits vor einigen Jahren postuliert, dass auch die kleinen GTPasen RAP1A und RAP1B eine Funktion bei der Aktivierung von Integrinen haben (Bos 2005; Kooistra et al. 2007). Bemerkenswerterweise weist RAP1 zu RRAS eine etwa 50% identische Aminosäurekomposition auf [Daten nicht gezeigt; *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), BLAST[®]] und Strukturdaten lassen ebenfalls auf eine gute Kongruenz dieser beiden kleinen GTPasen schließen [Daten nicht gezeigt; RCSB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*), PDB (*Protein Data Base*)]. RAP1 rekrutiert im aktiven Zustand über eine Bindung an das Effektor- und Adapterprotein RIAM (RAP1-GTP interactin adapter molecule) (Lafuente et al. 2004) das Protein Talin in die Nähe der

FAs an die Plasmamembran. Die Interaktion wird über die *rod*-Domäne von Talin vermittelt und führt zu einer Aktivierung von Integrinen. In einem Modell wurde daraufhin ein RAP1-induzierter „Integrin-Aktivierungs-Komplex“ beschrieben, der sowohl Talin als auch RIAM beinhaltet (Han et al. 2006; Lee et al. 2009) (Abb. 2.7).

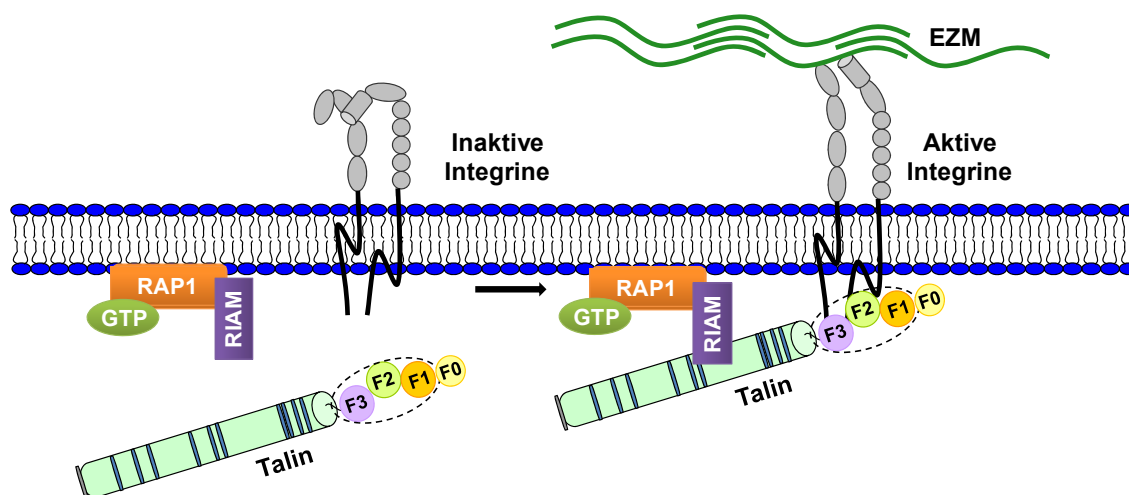


Abb. 2.7: RAP1-vermittelte Integrin-Aktivierung. RAP1 rekrutiert im aktiven, GTP-gebundenen Zustand RIAM an die Plasmamembran. Dies führt, durch Bindung der Talin-*head*-Domäne an die zytosolmatischen Integrinmotive, zur Bildung von Integrin-Aktivierungs-Komplexen und zur Aktivierung der Integrine. Die darauf folgende Konformationsänderung der extrazellulären Integrindomänen ermöglicht schließlich die Bindung von Liganden. EKM, extrazelluläre Matrix; F0, F1, F2 und F3; Talin-(Sub) Domänen; GTP, Guanosintriphosphat.

Diese Daten lassen eine Beteiligung von RRAS bei der Talin-vermittelten Integrin-Aktivierung vermuten; möglicherweise über eine direkte Rekrutierung von Talin, über dessen F0-Domäne, an die Plasmamembran oder über eine bisher noch nicht bekannte Funktion von RRAS innerhalb des beschriebenen Integrin-Aktivierungs-Komplexes.

3 Ziel der Arbeit und Arbeitshypothesen

Das Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von CBL- und RRAS-Proteinvarianten, um damit zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie von RASopathien beizutragen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten die funktionellen Konsequenzen der bereits bekannten mit dem Noonan-Syndrom assoziierten CBL-Mutationen c.1144A>G/p.K382E, c.1168G>T/p.D390Y und c.1259G>A/p.R420Q untersucht werden. Diese Mutationen liegen innerhalb der *linker*-RING-Finger-Domäne der Ubiquitin-Ligase CBL und betreffen somit eine für die Ubiquitylierungskapazität von CBL essentielle Proteinregion. Da der intrazelluläre Transport des EGFR stark von der CBL-vermittelten Ubiquitylierung des EGFR abhängt, sollte insbesondere das EGFR-*trafficking* analysiert werden. In CBL-Proteinvarianten ektoptisch exprimierenden COS7-Zellen sollte die EGFR-Ubiquitylierung mittels Koimmunpräzipitationen und die EGFR-Degradierung durch Quantifizierung der EGFR-Gesamtmenge nach EGF-Stimulation untersucht werden. Mit Hilfe von Zelloberflächenbiotinylierungs-Experimenten und eines fluoreszenz-basierten Liganden-Internalisierungsexperiments sollten die EGFR-Internalisierung sowie die Menge an Zellmembran-assoziiertem EGFR nach EGF-Stimulation bestimmt werden. Mögliche Konsequenzen der Mutationen auf den RAS-MAPK-Signalweg sollten schließlich durch Bestimmung der Menge an phosphoryliertem ERK überprüft werden.

RRAS ist bidirektional an der Regulation durch bzw. von Integreine/n beteiligt: Einerseits wird berichtet, dass RRAS durch Integrin-Liganden Bindung reguliert wird, andererseits spielt RRAS eine Rolle bei der Talin-vermittelten Integrin-Aktivierung. Ob eine Integrin-Stimulation zu einer RRAS-Aktivierung führt, sollte mit Hilfe von GTPase-*Pull-Down*-Experimenten in stabil RRAS^{WT}-exprimierenden CHO-Zellen verifiziert werden. Um einen ersten Einblick in die bisher noch ungeklärten molekularen Mechanismen der RRAS-abhängigen Integrin-Aktivierung zu bekommen, sollten die folgenden drei Arbeitshypothesen mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen und GTPase-*Pull-Down*-Experimenten in RRAS-Proteinvarianten ektoptisch exprimierenden COS7-Zellen, überprüft werden:

- (i) **RRAS als „triggering adapter“ von Talin:**
RRAS rekrutiert Talin an die Plasmamembran. Dort bindet Talin an den intrazellulären Teil der Integrine und aktiviert diese.
- (ii) **RRAS als Rekrutor für RIAM, einem Talin Bindeprotein:**
RRAS rekrutiert RIAM an die Plasmamembran. RIAM bindet an Talin und initiiert so die Aktivierung der Integrine.
- (iii) **RRAS als Aktivator von RAP1, einem *signaling*-Protein *upstream* von Talin:**
RRAS aktiviert RAP1 an der Plasmamembran. Aktives RAP1 rekrutiert RIAM und vermittelt damit eine Talin-abhängige Integrin-Aktivierung.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Bakterienstämme und Zelllinien

Tab. 4.1: Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien. Angegeben ist jeweils die Bezeichnung, die genetischen Eigenschaften bzw. der Zelltyp, die Herkunft und falls vorhanden eine Referenz für die verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien. ATCC: *American Type Culture Collection*.

	Bezeichnung	Eigenschaften/Zelltyp	Herkunft	Referenz
Bakterienstamm	<i>E.coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ- <i>rpsL</i> (Str^R) <i>nupG</i></i>	Invitrogen (Karlsruhe)	
	<i>E.coli</i> BL21	F- <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_Bm_B</i>) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen (Karlsruhe)	
Zelllinie	Flp-InTM- CHO	Adhärenente Fibroblasten aus Ovarien des Chinesischen Hamsters	Invitrogen (Karlsruhe)	
	CHO-K1	Adhärenente Fibroblasten aus Ovarien des Chinesischen Hamsters	DSMZ (Braunschweig)	(Puck et al. 1958)
	COS7	Adhärenente Fibroblasten aus Nieren der Grünen Meerkatze	DSMZ (Braunschweig)	(Gluzman 1981)
Stabile Zelllinien	RRAS ^{WT} -Flp- In-CHO	Stabil RRAS ^{WT} - exprimierende CHO-Zellen	AG Rosenberger	
	HA-RRAS ^{WT} -Flp- In-CHO	Stabil HA-RRAS ^{WT} - exprimierende CHO-Zellen	diese Arbeit	
	HA-RRAS ^{G38V} -Flp- In-CHO	Stabil HA-RRAS ^{G38V} - exprimierende CHO-Zellen	diese Arbeit	
	HARRAS ^{S43N} -Flp- In-CHO	Stabil HA-RRAS ^{S43N} - exprimierende CHO-Zellen	diese Arbeit	

4.1.2 Zur Verfügung gestellte Plasmide

4.1.2.1 Konstrukte für die Expression in Eukaryoten

Tab. 4.2: Vorliegende Konstrukte für die Expression in Eukaryoten. Angegeben ist jeweils der Name des Konstrukts, der Name des Inserts mit Genbank-Eintragsnummer, der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz sowie die Herkunft des Konstrukts.

Name des Konstrukts	Name des Inserts (Genbank- Eintragsnummer)	Kodierte Amino- säuren	Herkunft
pcDNA3-DEST-c-CBL	Wildtyp- <i>c-Cbl</i> (NM_005188.3)	1-906	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pcDNA3-DEST- c-CBLC381A	c-CBL mit Mutation C381A	1-906	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pcDNA3-DEST- c-CBLK382E	c-CBL mit Mutation K382E	1-906	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pcDNA3-DEST- c-CBLD390Y	c-CBL mit Mutation D390Y	1-906	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pcDNA3-DEST- c-CBLR420Q	c-CBL mit Mutation R420Q	1-906	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pcDNA3-EGFR	Wildtyp- <i>EGFR</i> (NM_005228.3)	1-1210	S. Parsons (Charlottesville, USA)
pRK5-HA-Ubiquitin-WT	Wildtyp- <i>UbiquitinC</i> (NM_021009.5)		Addgene (USA)
pMT2SM-HA-RAP1A ^{WT}	Wildtyp-RAP1A (NM_001010935.2)	1-181	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pFLAG-CMV4-RAP1B ^{WT}	Wildtyp-RAP1B (NM_001010942.2)	2-185	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pEGFP-C1-RIAM	Wildtyp- <i>RIAM</i>		AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pEGFP-C1-Talin1- <i>full-length</i>	Wildtyp- <i>Talin1</i> NM_011602.5	1-2541	Addgene (USA)
pEGFP-C1-Talin1- <i>head</i>	Wildtyp- <i>Talin1</i> NM_011602.5	1-433	Addgene (USA)
pEGFP-C1-Talin1- <i>rod</i>	Wildtyp- <i>Talin1</i> NM_011602.5	434-2541	Addgene (USA)
pCMV6-XL4-RRAS	Wildtyp-RRAS NM_006270.3	1-218	Origene (USA)

4.1.2.2 Vorliegende Konstrukte für die Expression in Bakterien

Tab. 4.3: Vorliegende Konstrukte für die Expression in Bakterien. Angegeben ist jeweils der Name des Konstrukts, die Eigenschaften des Plasmids, die Herkunft und falls vorhanden eine Referenz.

Name des Konstrukts	Name des Inserts (Genbank- Eintragsnummer)	Kodierte Amino- säuren	Herkunft
GST-PI3K[RBD]	<i>PI3Kα</i> [RBD] (p110)	127-314	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pGEX-RALGDS[RBD]	<i>RALGDS</i> (NM_001271776.1)	777-872	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)

4.1.2.3 Ausgangsvektoren zur Herstellung neuer Konstrukte

Tab. 4.4: Übersicht über verwendete Vektoren zur Herstellung neuer Konstrukte. Angegeben ist jeweils der Name, die Eigenschaften, die Herkunft und falls vorhanden eine Referenz.

	Name	Eigenschaften	Herkunft	Referenz
Eukaryotische Expressions- vektoren	pMT2SM-HA	Amp ^r , HA-Epitop	R. M. Ahmadian (Dortmund)	(Kaufman et al. 1987)
	pENTR/D-TOPO	Km ^r	Invitrogen (Karlsruhe)	
Gateway™- Vektoren	pEF5/FRT/V5- DEST	Amp ^r , Hyg ^r , <i>ccdB</i> , FRT-Seq., Cm ^r , V5-Epitop	Invitrogen (Karlsruhe)	
	pFLAG-CMV-4- DEST	Amp ^r , Neo ^r , <i>ccdB</i> , FLAG- Epitop	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)	

4.1.3 Hergestellte Plasmide

4.1.3.1 Konstrukte für die eukaryotische Expression

Tab. 4.5: Hergestellte Konstrukte für die Expression in Eukaryoten. Die Klonierung dieser Konstrukte erfolgte durch PCR-vermittelte Mutagenese (außer für pMT2SM-HA-RRAS^{WT}), Restriktion und anschließende Ligation. Angegeben sind der Name, die für die PCR eingesetzten Oligonukleotide, das Template für die PCR und der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz.

Name des Konstrukts	Oligonukleotide	Template	Kodierte Aminosäuren
pMT2SM-HA-RRAS ^{WT}	pMT2_NotI_RRAS_for pMT2_NotI_RRAS_rev	pCMV6-XL4-RRAS	2-218
pMT2SM-HA-RRAS ^{G38V}	pMT2_NotI_RRAS_for pMT2_NotI_RRAS_rev RRAS_G38V_for RRAS_G38V_rev	pCMV6-XL4-RRAS	2-218

pMT2SM-HA-RRAS ^{S43N}	pMT2_NotI_RRAS_for pMT2_NotI_RRAS_rev RRAS_S43N_for RRAS_S43N_rev	pCMV6-XL4-RRAS	2-218
--------------------------------	--	----------------	-------

4.1.3.2 Mittels Topoisomerase-Reaktion hergestellte GatewayTM-Eingangskonstrukte

Tab. 4.6: Mit Hilfe einer Topoisomerase-Reaktion hergestellte Eingangsvektoren für die GatewayTM-Technologie. Angegeben sind die Namen, die für die PCR verwendeten Oligonukleotide und Templates und der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz.

Name des Konstrukts	Oligonukleotide	Template	Kodierte Aminosäuren
pENTR TM /D-TOPO_RRAS ^{WT}	RRAS_pEDT_for RRAS_pEDT_rev	pMT2SM-HA-RRAS ^{WT}	1-218
pENTR TM /D-TOPO_RRAS ^{G38V}	RRAS_pEDT_for RRAS_pEDT_rev	pMT2SM-HA-RRAS ^{G38V}	1-218
pENTR TM /D-TOPO_RRAS ^{S43N}	RRAS_pEDT_for RRAS_pEDT_rev	pMT2SM-HA-RRAS ^{S43N}	1-218
pENTR TM /D-TOPO_HA-RRAS ^{WT}	HA-RRAS_pEDT_for HA-RRAS_pEDT_rev	pMT2SM-HA-RRAS ^{WT}	1-218
pENTR TM /D-TOPO_HA-RRAS ^{G38V}	HA-RRAS_pEDT_for HA-RRAS_pEDT_rev	pMT2SM-HA-RRAS ^{G38V}	1-218
pENTR TM /D-TOPO_HA-RRAS ^{S43N}	HA-RRAS_pEDT_for HA-RRAS_pEDT_rev	pMT2SM-HA-RRAS ^{S43N}	1-218

4.1.3.3 Mittels GatewayTM-Technologie hergestellte Zielkonstrukte für die eukaryotische Expression

Tab. 4.7: Mit Hilfe der GatewayTM-Technologie hergestellte Konstrukte. Es sind der Name, die Methodik der Herstellung und der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz angegeben.

Name des Konstrukts	Herstellung	Kodierte Aminosäuren
pFLAG-CMV-4-DEST-RRAS ^{WT}	Rekombination aus pENTR TM /D-TOPO_RRAS ^{WT}	1-218
pFLAG-CMV-4-DEST-RRAS ^{G38V}	Rekombination aus pENTR TM /D-TOPO_RRAS ^{G38V}	1-218
pFLAG-CMV-4-DEST-RRAS ^{S43N}	Rekombination aus pENTR TM /D-TOPO_RRAS ^{S43N}	1-218

pEF5/FRT/V5-DEST_HA-RRAS ^{WT}	Rekombination aus pENTR TM /D-TOPO_HA-RRAS ^{WT}	1-218
pEF5/FRT/V5-DEST_HA-RRAS ^{G38V}	Rekombination aus pENTR TM /D-TOPO_HA-RRAS ^{G38V}	1-218
pEF5/FRT/V5-DEST_HA-RRAS ^{S43N}	Rekombination aus pENTR TM /D-TOPO_HA-RRAS ^{S43N}	1-218

4.1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden manuell designt und von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Vor der Verwendung wurde eine Stocklösung der entsalzten, lyophilisierten Oligonukleotide mit 1x TE und einer Konzentration von 100 pmol/μl hergestellt. Als Gebrauchslösungen wurde eine 1:10-Verdünnung der Stocklösung in Aqua bidest. eingesetzt.

4.1.4.1 Oligonukleotide für Klonierungen

Tab. 4.8: Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen. Angegeben sind jeweils der Name, die Sequenz der Oligonukleotide sowie der Hersteller.

Bezeichnung	Oligonukleotide 5' → 3'	Herkunft
pMT2_NotI_RRAS_for	AAGGAAAAAAGCGGCCGCAAGCAGCGGGGCGGCGT	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
pMT2_NotI_RRAS_rev	CCGGAATTCCTCACTACAGGAGGACGCAGGGGCAG	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
RRAS_G38V_for	GTCGTGGGCGGCGTTCGGCGTGGGCAAGAG	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
RRAS_G38V_rev	CTCTTGCCCACGCCGACGCCGCCACGAC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
RRAS_S43N_for	CGTGGGCAAGAACGCGCTGACCATCCAG	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
RRAS_S43N_rev	CTGGATGGTCAGCGGTTCTTGCCCACG	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
RRAS_pEDT_for	CACCATGAGCAGCGGGGCGGCGTCCGGGACA	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
RRAS_pEDT_rev	CTACAGGAGGACGCAGGGGCAGCCCCGCCCTTCTT	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
HA-RRAS_pEDT_for	CACCATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCG TCGATGAGCAGCGGGGCGGCGTCCGGGACA	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
HA-RRAS_pEDT_rev	CTACAGGAGGACGCAGGGGCAGCCCCGCCCTTCTT	Sigma Aldrich (Taufkirchen)

4.1.4.2 Oligonukleotide für Sequenzierreaktionen

Tab. 4.9: Verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen. Angegeben sind jeweils der Name, die Sequenz der Oligonukleotide sowie der Hersteller.

Bezeichnung	Oligonukleotide 5' → 3'	Herkunft
pMT2_seq	CACTCCCAGGTCCAACCTGCATAAG	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
pFLAG-CMV-N	AATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
M13 uni	GTAAAACGACGGCCAGT	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
pFRT-for	GAGACCCAAGCTGGCTAGGTAA	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
RRAS seq	AGCTCTTCACGCAGATTCTG	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F1	GCATGATTTCGTGAGCGGATCC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F2	CCTGAATGGCTCCCATCCTGTC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F3	CGACAGAAGGCGAGCAGATC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F4	CGTAAGAACAAGATGGATGAATC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F5	GGTAGCACCTACAATCAGC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F6	GAAAGCTCCTGAGTGCTGC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F7	GCGCAAAGAACCTAGGCACTGC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F8	CCAGCAAAGGCTTGCTCAGG	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F9	GACGGACAGCATCAACCAGCTC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F10	CCAAACACACATCTGCATTGTG	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F11	GACCTAGATCAGGCTTCGC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F12	GCCATCAACCAGCTAGATG	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F13	GGTATCATTGCTGACCTCGAC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F14	GGTGACCAATGTGACATCATTGC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F15	GGAGTGTGCCAATGGTTACC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F16	GCTCCTGGTAGCTTGCAAGGTC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_F17	GCCTCTGGTCCTGAGAATTTCC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_R1	CATCCACCATGATAGTCTTCACC	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_R2	GAGTCTCAAAGTCATCCAG	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Talin_R3	GTGAGTGGTTCAAAGTACTG	Sigma Aldrich (Taufkirchen)

4.1.5 Antikörper

4.1.5.1 Primärantikörper

Tab. 4.10: Übersicht über die verwendete Primärantikörper. Angegeben ist jeweils der Name des Primärantikörpers, das erkannte Antigen, der Wirtsorganismus für die Herstellung des Antikörpers und dessen Hersteller bzw. Vertriebsfirma. Außerdem ist die jeweilige Verdünnung des Antikörpers für die Anwendung im Western-Blot (WB) oder in der Immunfluoreszenzanalyse (IF) angegeben.

Antikörper	Antigen	hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
anti-c-Cbl (C-15)	humanes c-Cbl	Kaninchen	WB 1:1000 IF 1:200	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-EGFR (1005)	humanes EGFR	Kaninchen	WB 1:300	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-ERK(1/2)	humanes ERK	Kaninchen	WB 1:1000	Cell Signaling-NEB (Frankfurt a. Main)
anti-Phospho-ERK(1/2) Thr202/Tyr204	humanes p(Thr202/Tyr204)-ERK1	Kaninchen	WB 1:1000	Cell Signaling-NEB (Frankfurt a. Main)
anti-GFP	synthetisches GFP-Peptid	Kaninchen	WB 1:200	Clontech (USA)
anti- α -Tubulin	humanes α -Tubulin	Maus	WB 1:2000	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

4.1.5.2 Sekundärantikörper

Tab. 4.11: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper. Angegeben ist jeweils der Name des Sekundärantikörpers, das erkannte Antigen, das Antikörperkonjugat, der Wirtsorganismus und der Hersteller. Außerdem ist die jeweilige in dieser Arbeit eingesetzte Verdünnung im Western-Blot (WB) und in der Immunfluoreszenzanalyse (IF) angegeben.

Antikörper	Antigen	Konjugat	hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
AlexaFluor [®] -546 Ziege anti-Kaninchen	Kaninchen Immunglobuline	AlexaFluor [®] -546	Ziege	IF 1:1.000	Molecular Probes (Karlsruhe)
ECL [™] Esel-anti-Kaninchen-HRP	Kaninchen Immunglobulin G	Meerrettich-Peroxidase	Esel	WB 1:7.000- 1:15.000	GE Healthcare (Freiburg)
ECL [™] Schaf-anti-Maus-HRP	Maus Immunglobulin G	Meerrettich-Peroxidase	Schaf	WB 1:4.000- 1:15.000	GE Healthcare (Freiburg)
anti-FLAGM2-Peroxidase	synthetisches FLAG-Peptid	Meerrettich-Peroxidase	Maus	WB 1:7.500	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

anti-HA-HRP, High Affinity (3F10)	humanes Hämagglutinin	Meerrettich- Peroxidase	Ratte	WB 1:15.000	Roche (Mannheim)
anti-V5-HRP	P/V-Protein des Paramyxovirus SV5	Meerrettich- Peroxidase	Maus	WB 1:5.000	Invitrogen (Karlsruhe)

4.1.6 Chemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA 30%; 37,5:1)	Biorad (München)
Agar	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ampicillin-Natriumsalz (C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ S·Na)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Milchpulver)	Biorad (München)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim)
Cycloheximid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
D-Glucose	Merck (Darmstadt)
4', 6-Diamidino-2-phenyl-indole/2HCl (DAPI)	Serva (Heidelberg)
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
1,4-Dithioerythritol (DTT; C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Epidermal Growth Factor (EGF), human	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Epidermal Growth Factor (EGF)-Alexa Fluor 488	Invitrogen (Karlsruhe)
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	J.T. Baker (Griesheim)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethylendinitrietetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Scientific (Bonn)
EZview™ Red Anti-HA Affinity Gel	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
EZview™ Red Streptavidin Affinity Gel	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
GFP-Trap_A	Chromotek (Planegg-Martinsried)
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Roth (Karlsruhe)
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Roth (Karlsruhe)
GST-Bind™ Resin	Novagen (Darmstadt)
Hefeextrakt	Invitrogen (Karlsruhe)
Isopropanol (C ₄ H ₁₀ O)	Merck (Darmstadt)
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
L-Glutathion, reduziert (C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lipofectamin™2000 Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid-Heptahydrat (MgCl ₂ ·7H ₂ O)	Merck (Darmstadt)
Methanol (CH ₃ OH)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker (Griesheim)
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)

Natriumsalz-Deoxycholsäure (DOC; C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	Roth (Karlsruhe)
N-Ethylmaleimide (C ₆ H ₇ NO ₂)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED; C ₆ H ₁₆ N ₂)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nonidet P40 / Igepal (C ₃₀ H ₅₄ O ₁₂)	ICN (Eschwege)
Normal Goat Serum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Orange-G	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim)
Poly-L-Lysinhydrobromid (C ₆ H ₁₂ N ₂ OHBr) _n +H ₂ O	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurat (Tween 20; C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Polyvinylalkohol 488 [Mowiol 488; (C ₂ H ₄ O) _x]	Fluka (Neu-Ulm)
Protein-A-Agarose	Roche (Mannheim)
Restore ^{IM} Western-Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific (Bonn)
SimplyBlue TM SafeStain	Invitrogen (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trizma® Base (Tris; C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg)
Wasser für Chromatographie (HPLC)	Merck (Darmstadt)

4.1.7 Kits, Enzyme, Nukleotide und Standards

BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Immobilon TM Western	Millipore (Schwalbach)
JetQuick PCR Product Purification Spin Kit	Genomed (Löhne)
NucleoBond® Xtra Maxi	Macherey/Nagel (Düren)
pENTR TM /D-TOPO® Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Gateway® LR Clonase TM Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
PfuULTRA TM HF DNA Polymerase	Stratagene (Waldbronn)
Phusion TM DNA Polymerase	NEB (Frankfurt a. Main)
Quick Ligase	NEB (Frankfurt a. Main)
Restriktionsendonukleasen	Promega (Mannheim)
RNase A	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA-Standard Fast-Ruler TM	Fermentas (St. Leon-Rot)
PageRuler TM Plus Prestained Protein	Fermentas (St. Leon-Rot)
100 Bp DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
1 Kb DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)

4.1.8 Medien und Zusätze

4.1.8.1 Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten

Anzucht und Kultivierung von Bakterien:

LB-Medium:	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Natriumchlorid
	ad 1000 ml	Aqua dest.
	pH	7,0
Agar für Festmedien:	+ 15 g/l	
Ampicillin:	1 ml/l	LB-Medium von Stocklösung 250 mg/ml (in Aqua dest.)
Kanamycin:	1 ml/l	LB-Medium von Stocklösung (25 mg/ml in Aqua dest.)
SOC-Medium:	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,5 g	Natriumchlorid
	ad 970 ml	Aqua dest.
	10 ml	steril filtriertes 1M MgSO ₄
	10 ml	steril filtriertes 1M MgCl ₂
	10 ml	steril filtrierte 40% Glucose

Herstellung chemisch kompetenter E.coli-Zellen

ψB-Medium	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,75 g	Kaliumchlorid
	ad 966 ml	Aqua dest.
	pH	7,6
	34 ml	steril filtriertes 1M MgSO ₄
TfBI	1,47 g	Kaliumacetat
	4,95 g	Manganchlorid
	6,05 g	Rubidiumchlorid
	0,74 g	Calciumchlorid
	75 ml	Glycerol
	ad 500 ml	Aqua dest.
	pH	5,8
TfBII	10 ml	100 mM MOPS
	1,1 g	Calciumchlorid
	0,12 g	Rubidiumchlorid
	15 ml	Glycerol
	ad 100 ml	Aqua dest.

4.1.8.2 Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten

Medien und Zusätze für die Zellkultivierung

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit L-Glutamin	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
F-12 Nutrient Mixture (Ham)	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Opti-MEM® I serumreduziertes Medium mit GlutaMAX™ I	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
TrypLE™ Express	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Fötales Rinderserum (FBS)	PAA Laboratories (Karlsruhe)
Hygromycin (50mg/ml)	Calbiochem (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml / 100 mg/ml)	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

Spezialmedien für durchgeführte Experimente

Einfriermedium	10% DMSO (v/v) in Vollmedium (siehe 3.4.1.1)
Hungermedium	0,1% BSA (w/v) 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) in DMEM

4.1.9 Puffer und Lösungen

4.1.9.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli (Mini-Präparation)

Lösung I	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl, pH 8 10 mM EDTA
Lösung II	0,2 N NaOH 1% SDS (w/v)
Lösung III	4 M KAc, pH 5,5 2 M Essigsäure

1x TE-Puffer	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	pH	7,5
TE/RNase-Puffer	100 µl/ml	RNase A in 1x TE-Puffer

Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli (Maxi-Präparation)

RES (Zellsuspension)	50 mM	Tris, pH 8
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase
LYS (Zelllyse)	200 mM	NaOH
	1%	SDS (w/v)
NEU (Neutralisation)	3 M	KAc, pH 5,5
EQU (Säulenäquilibrierung)	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7
	15%	Isopropanol (v/v)
	0,15%	Triton-X-100 (v/v)
WASH (Waschpuffer)	1 M	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7
	15%	Isopropanol (v/v)
ELU (Elutionspuffer)	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris, pH 8,5
	15%	Isopropanol (v/v)

Agarose-Gelelektrophorese

10x TBE	890 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA
	890 mM	Tris
	pH	8
10x Ladepuffer	25 ml	Glycerin
	25 ml	1x TBE
	20 mg	Orange-G
Ethidiumbromid	0,05%	(w/v, in Aqua dest.)

4.1.9.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten

Zellyse

RIPA-Lysepuffer	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 8
	0,5%	DOC (w/v)
	1%	NP-40 (v/v)
	0,1%	SDS (w/v)

GTPase-Pull-Down-Experimente

<i>Pull-Down</i> -Lysepuffer	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 8
	1%	NP-40 (v/v)
GTBL I-Puffer	50 mM	Tris-HCl, pH 8
	40 mM	EDTA
	25%	Saccharose (w/v)
GTBL II-Puffer	50 mM	Tris-HCl, pH 8
	100 mM	MgCl ₂
	25%	Saccharose (w/v)
Waschpuffer	50 mM	Tris-HCl, pH 8
	50 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂

TB-Medium zur Kultivierung des BL21 E.coli-Bakterienstammes

Lösung I	12 g	Bacto Tryptone
	24 g	Hefeextrakt
	4 ml	Glycerol
Lösung II	2,31 g	KH ₂ PO ₄
	12,54 g	KH ₂ HPO ₄

Vor Versuchsbeginn Lösung I und Lösung II zusammen geben und Ampicillin (1:1000) dazu geben.

Koimmunpräzipitation

GFP- <i>trap</i> -Puffer	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	0,5 mM	EDTA

	0,5%	NP-40 (v/v)
HA- <i>trap</i> -Puffer	150 mM	Tris-HCL, pH 8
	50mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	0,5%	NP-40 (v/v)
Triton-Lysepuffer	150mM	NaCl
	50 mM	HEPES
	5mM	EDTA
	1%	Triton X-100 (v/v)

SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-Page)

4x Trenngelpuffer	2 g	SDS
	91 g	Tris
	ad 500 ml	Aqua dest.
	pH	8,8 mit H ₃ PO ₄
4x Sammelgelpuffer	2 g	SDS
	30,3 g	Tris
	ad 500 ml	Aqua dest.
	pH	6,8 mit H ₃ PO ₄
4x Lämmli-puffer (Ladepuffer)	0,01%	Bromphenolblau (v/v)
	33%	Glycerol (v/v)
	6,7%	SDS (w/v)
	0,3 M	DTT
	80 mM	Tris-HCl, pH 6,8
10x SDS-Laufpuffer	288,4 g	Glycin
	40 g	SDS
	60,6 g	Tris
	ad 2000 ml	Aqua bidest.
	pH	8,3

Western-Blot

Transferpuffer	150 mM	Glycin
	25 mM	Tris
	10%	Methanol (v/v)
	pH	8,3
10x PBST	4 g	KCl
	4,8 g	KH ₂ PO ₄
	160 g	NaCl

	28,8 g	Na ₂ HPO ₄
	20 ml	Tween 20
	ad 2000 ml	Aqua dest.
	pH	7,2
10x TBST	1,5 M	NaCl
	200 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	1%	Tween 20 (v/v)
Antikörperlösung für Antikörper von :		
<i>Cell Signaling Technology, Invitrogen</i>	5%	BSA in 1x TBST (w/v) (TBST/BSA)
<i>Abcam, Sigma-Aldrich, Upstate BD Transduction Laboratories</i>	0,5%	Milchpulver in 1x TBST (w/v) (TBST/M)
<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	5%	Milchpulver in 1x PBST (w/v) (PBST/M)

4.1.9.3 Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten

Zellkultur

10x PBS ^{-/-}	2 g	KCl
	2,4 g	KH ₂ PO ₄
	80 g	NaCl
	14,4 g	Na ₂ HPO ₄
	ad 1000 ml	Aqua dest.

Immunfluoreszenzanalysen

1x PBS ^{+/+}	0,9 mM	CaCl ₂
	0,52 mM	MgCl ₂
	0,16 mM	MgSO ₄
	in	1x PBS ^{-/-}
Hochsalzpuffer	500 mM	NaCl
	in	1x PBS ^{+/+}
Fixierlösung	4%	Paraformaldehyd (w/v)
	in	1x PBS ^{+/+}
Blockierlösung	2%	BSA (w/v)

	3% Ziegen-Serum (v/v)
	0,5% Igepal (v/v)
	in 1x PBS ^{+/+}
Antikörperlösung	3% Ziegen-Serum (v/v)
	0,1% Igepal (v/v)
	in 1x PBS ^{+/+}
Mowiol-Einbettmedium	25% Propylgallatlösung (v/v)
	75% Mowiol-488-Lösung (v/v)
	in 1x PBS ^{+/+}

Biotinylierungsexperimente

HBSS	1,3 mM CaCl ₂
	5,6 mM Glucose
	5,4 mM KCl
	0,4 mM KH ₂ PO ₄
	0,5 mM MgCl ₂
	0,6 mM MgSO ₄
	137 mM NaCl
	4,2 mM NaHCO ₃
	0,3 mM Na ₂ HPO ₄
	pH 7,4
Wasch-HBSS	5 mM Tris-HCl, pH 7,4
	in HBSS
Glutathion-Puffer	1 mM EDTA
	50 mM Glutathion
	75 mM NaCl
	frisch dazu: 10% FBS (v/v)
	frisch dazu: 75 mM NaOH

4.1.10 Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien

100 und 60 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Sarstedt (Nürnberg)
6-Loch und 12-Loch-Zellkulturplatten	Sarstedt (Nürnberg)
Agarplatten	Greiner (Essen)
Autoklav	Tecnomara (Fernwald)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
CO ₂ Water-Jacketed Inkubator	Nuaire™ US AUTOFLOW (USA)
Deckgläser	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Digitalkamera	OLYMPUS (Hamburg)
Drucker <i>Digital Graphic Printer</i>	SONY (Japan)

Filmentwickler <i>OPTIMAX X-Ray Film Processor</i>	Protec® (Oberstenfeld-Gronau)
Gelelektrophoresekammer	BioRad (München)
Heizblock (Typ:52526101)	Liebisch (Bielefeld)
Inkubator Shaker Model G25	New Brunswick Scientific. Co INC (Edison, New Jersey, USA)
Kryoröhrchen	Nunc (Langenselbold)
Kühlzentrifuge <i>5417R</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
Kunststoff-Tubes (Falcon)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Laserscanmikroskop DMIRE2	Leica (Mannheim)
Magnetrührer <i>RET basic</i>	IKA Labortechnik (Staufen i. Br.)
Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
PCR-Cycler <i>PTC 200</i>	MJ Research, Inc. (USA)
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik GmbH (Oldenburg)
Photometer Novaspec II	Pharmacia Biotech (Schweden)
PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten <i>Finnpipetten</i>	Thermo Labsystems (Mannheim)
PVDF (Polyvinylidendifluorid) Western Blotting	
Membranen	Roche (Mannheim)
Röntgenfilme (<i>Cronex 5</i>)	AGFA (Berlin)
Schüttelapparat 3006	GFL (Burgwedel)
Schüttelapparat „Centromat R“	B. Braun Biotech International (Melsungen)
Semi-Dry <i>Fastblot B34</i>	Biometra (Göttingen)
Spannungsgeber <i>Standard Power Pack P25</i>	Biometra (Göttingen)
Sterilwerkbank <i>HERA safe Typ 12/2, 1995</i>	Heraeus (Hanau)
Sterilwerkbank <i>Lamin Air Instruments</i>	Heraeus (Hanau)
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge <i>Biofuge Pico</i>	Heraeus (Hanau)
UV-Transilluminator	Bachofer (Reutlingen)
Ultraschallgerät	Hielscher (Teltow)
Vortex-Gerät <i>Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000</i>	Scientific Industries, INC. (USA)
Waage “Sartorius ISO 9001”	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad <i>GFL 1003</i>	GFL (Burgwedel)
Wasserbad <i>GFL 1083</i>	GFL (Burgwedel)
Whatman-3mm-Chromatographie-Papier	Whatman (Dassel)
Zentrifuge <i>Megafuge 1.0</i>	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge <i>Labofuge GL</i>	Heraeus (Hanau)

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Anzucht von Bakterienkulturen

Zur Anzucht von *E.coli* für eine Mini-Präparation wurden 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft, für eine Maxi-Präparation 200 ml LB-Medium mit einer 2 ml Vorkultur. Die Kultivierung der Bakterienkulturen erfolgte über Nacht bei 220 Upm und 37°C im Inkubationsschüttler.

4.2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* für die Transformation

Kompetente *E.coli* der Stämme BL21 und DH10B wurden nach der Calcium-Chlorid-Methode hergestellt. Dafür wurde eine Vorkultur aus 2 ml ψ B-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 Upm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden mit 1 ml dieser Vorkultur 100 ml ψ B-Medium beimpft und bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD_{550} von 0,3-0,4 kultiviert. Davon wurden 5 ml in 100 ml ψ B-Medium überführt und erneut bei 37°C und 200 Upm kultiviert, bis eine OD_{550} von 0,3-0,4 erreicht wurde. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 5 min in Eiswasser abgekühlt, in vorgekühlte Falcons überführt, 8 min bei 4°C und 2.500 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Permeabilität der bakteriellen Zellmembran für Fremd-DNA wurde durch die folgenden Schritte erhöht. Das Pellet wurde in 15 ml kaltem TfbI-Puffer resuspendiert und anschließend in Eiswasser für 30 min inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 8 min bei 4°C und 2.500 Upm, wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml eiskaltem TfbII-Puffer aufgenommen. Die erhaltenen kompetenten Zellen wurden in Aliquots 200 μ l aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.2.3 Hitzeschock-Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Die kompetenten *E.coli* wurden auf Eis aufgetaut und 100 µl der Bakterien-suspension mit ca. 100 ng Plasmid-DNA vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde für die optimale Aufnahme der DNA ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C durchgeführt. Der Transformationsansatz wurden dann für 5 min auf Eis abgekühlt und mit 700 µl SOC-Medium versetzt. Nach einer Inkubation für 60 min bei 37°C unter starkem Schütteln wurden die Zellen bei 8.000 Upm für 5 min bei RT abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in der zurückbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen. Diese wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.4 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Für analytische Zwecke wurde zunächst die in *E.coli* vervielfältigte Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation mit Hilfe der alkalischen Lyse isoliert. Dafür wurden die Bakterien einer 2 ml LB-Übernachtskultur zunächst für 5 min bei 8.000 Upm pelletiert und anschließend in 100 µl der Lösung I resuspendiert. Die basische Zellyse wurde durch Zugabe von 200 µl der Lösung II initiiert und die Suspension für 5 min bei RT inkubiert. Die Lyse wurde sodann durch Neutralisation mit 300 µl Lösung III abgestoppt, die Suspension vollständig durchmischt und 10 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung von Zelltrümmern folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 14.000 Upm und RT. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und die darin enthaltene Plasmid-DNA durch Zugabe von 350 µl Isopropanol gefällt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA für 5 min bei 14.000 Upm und RT abzentrifugiert und zum Abbau von verunreinigender RNA in 100 µl RNase A-haltigem TE-Puffer für 20 min bei 37°C inkubiert. Zur Reinigung der gewonnenen Plasmid-DNA-Lösung wurde 125 µl eines Gemisches aus 88% Isopropanol/0,2 M KAc dazugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde danach bei 14.000 Upm und RT für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 50 µl Aqua dest. gelöst und zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

4.2.5 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Für die effektive Transfektion eukaryotischer Zellen muss die Plasmid-DNA in einer höheren Menge und Reinheit vorliegen, als durch Mini-Präparation erreicht werden kann. Die in dieser Arbeit verwendete Plasmid-DNA wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie mit dem NucleoBond® Xtra Maxi Kit der Firma Macherey/Nagel gewonnen. Die gefällte DNA wurde in 200-1000 µl Aqua bidest. gelöst und bei -20°C gelagert.

4.2.6 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA mittels Nano-Drop

Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde mittels Nanodrop ND-1000 Spektrophotometers nach Herstellerangaben ermittelt.

4.2.7 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der Quantität und der Qualität der isolierten Plasmid-DNA wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen spezifische, meist palindromische Nukleotidsequenzen von 4-8 bp und hydrolysieren die Phosphodiester-Bindungen der vorliegenden Plasmid-DNA in unmittelbarer Nähe zu dieser Erkennungssequenz. Dabei entstehen enzymabhängig doppelsträngige, glatte (*blunt ends*) oder 3'- bzw. 5'-überhängende Enden (*sticky ends*). Dafür wurden pro Ansatz ca. 0,1-2 µg Plasmid-DNA und 0,5-1 U Enzym in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Analyse der Restriktionsspaltung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.2.10).

4.2.8 Ligation von DNA

Die Ligation sowohl von glatten als auch von 3'- bzw. 5'-überhängenden Restriktionsenden erfolgte entweder mit der T4-DNA-Ligase oder der Quick Ligase der Firma NEB. Diese Enzyme ermöglichen eine kovalente Verbindung von DNA-Fragmenten, indem sie eine Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Phosphat- und 3'-

Hydroxygruppen von freien DNA-Enden knüpfen. Für die Ligation wurde das PCR-Produkt in einem 3- bis 5-fachen molaren Überschuss zu der Vektor-DNA gegeben und nach Angaben der Hersteller mit Ligase (1 U) und dem dazugehörigen Puffer inkubiert.

4.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und PCR-vermittelte Mutagenese

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der spezifischen *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Fragmenten unter Verwendung von hitzestabilen DNA-Polymerasen. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der zyklischen Amplifikation eines DNA-Abschnittes, der von zwei Oligonukleotiden (Primern) flankiert wird. In dieser Arbeit wurde die PCR eingesetzt, um DNA-Fragmente zu amplifizieren und um Punktmutationen in DNA-Konstrukten zu erzeugen. Dafür wurden 2-10 ng Template-DNA, je 10 pmol eines 5'- und 3'-Primers sowie 0,2 µl (1U) Polymerase eingesetzt und diese mit 10x PCR-Puffer, Desoxy-Ribonukleosid-Triphosphaten (dNTPs; 2,5 mM je dNTP) und Aqua bidest. auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl gebracht. Im Anschluss an die Denaturierung des PCR-Ansatzes (3 min, 95°C) wurden 30 Zyklen durchlaufen, die sich aus Denaturierung (30 sec, 95°C), Primer-Anlagerung (*annealing*, 30 sec, 48-68°C) und Polymerisation (Elongation, 1-4 min, 72°C) zusammensetzen. Dabei richtet sich die gewählte *annealing*-Temperatur nach der Schmelztemperatur der vorliegenden Oligonukleotide und die Dauer der Elongation nach der Länge der zu amplifizierenden DNA-Fragmente. Die DNA-Polymerase kann etwa 500-1000 Basenpaare (Bp) pro Minuten polymerisieren. Für die Klonierung wurden spezielle DNA-Polymerasen mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität und somit Korrektoreigenschaft (*proofreading*) wie z.B. PfuULTRA™ HF- und Phusion™ DNA Polymerase, verwendet. Um ein gezieltes Einführen von Punktmutationen in DNA-Sequenzen zu ermöglichen, wurde die PCR-vermittelte Mutagenese angewandt (Ito et al. 1991). Dafür wurden zwei überlappende, etwa 35 Bp lange DNA-Fragmenten in zwei getrennten PCR-Reaktionen mit spezifischen Oligonukleotiden, die die gewünschten Basenaustausche aufwiesen, generiert. Nach Aufreinigung der amplifizierten PCR-

Produkte, die nun die gewünschte Mutation enthielten, wurden diese in einer weiteren PCR-Reaktion als Template eingesetzt (*Megaprime-PCR*). Dafür wurden jeweils 1 µl einer 1:10-Verdünnung der beiden PCR-Produkte sowie Puffer, dNTPs und Polymerase in einen Reaktionsansatz vermischt und ein Drei-Zyklus-Programm gestartet (Programm 1). Anschließend wurden nach Zugabe der 5'- und 3'-Primer 19 weitere Zyklen durchlaufen, wodurch die Amplifikation des Gesamtfragments ermöglicht wurde (Programm 2). Das Produkt enthielt nun die gewünschte Mutation und konnte je nach Klonierung mittels Restriktionsspaltung und Ligation oder mit Hilfe der TOPO[®]-Klonierungs-Technologie in den Gateway[™]-Zielvektor eingebaut werden. Zur Überprüfung der Integrität der PCR-Produkte wurde die Plasmid-DNA sequenziert.

Megaprime PCR-Ansatz

1 µl PCR Produkt 1 → 1:10-Verdünnung
1 µl PCR Produkt 2 → 1:10-Verdünnung
0,5 µl dNTP's (10 pmol/µl)
2,5 µl 10x PCR-Puffer
0,2 µl Polymerase
ad 25 µl Aqua bidest.

Programm 1:

1. 95°C / 3 min
2. 95°C / 15 s
3. 40°C / 20 s
4. 72°C / 3-5 min
5. *go to 2 / 2 times*
6. end

Zugabe der Primer zum Megaprime-Ansatz

+1 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
+1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)

Programm 2:

1. 95°C / 3 min
2. 95°C / 15 s
3. 55°C / 10 s
4. 72°C / 4 min
5. *go to 2 / 19 times*
6. 72°C / 10 min
7. end

4.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Darstellung von PCR-Produkten und die Auftrennung von fragmentierter DNA. Diese gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von Fragmenten verschiedener Größe in einer Matrix aus Agarose. Durch Anlegen einer Gleichspannung kann die negativ geladene DNA im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Größere Fragmente wandern dabei langsamer durch die Poren des Agarosegels als kleinere. Der Agarosegehalt des Gels richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente und lag zwischen 0,8-2,0% (w/v).

Für die Herstellung eines Agarosegels wurde zunächst die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE-Puffer aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt und in die mit Probenkammern versehenen Gelschlitten gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer gegeben. Schließlich wurden die Proben mit Ladepuffer versetzt [1/4 Volumen Ladepuffer (Orange G), 3/4 Volumen Probe] und in die Geltaschen pipettiert. Nach der Elektrophorese bei ca. 140 V für 60 min, wurde das Gel für mindestens 15 min in einer 0,05%-igen Ethidiumbromid-Lösung angefärbt; dieser Farbstoff interkaliert reversibel zwischen den Basen der DNA. Anschließend erfolgte die Detektion auf einem Transilluminator-Tisch, auf dem die durch Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmente bei Anregung mit UV-Licht (312 nm) eine sichtbare Fluoreszenz zeigten. Die Dokumentation erfolgte mit dem *DIGI CAM Digital Camera Control*-Programm.

4.2.11 Aufreinigung von PCR- und Restriktionsprodukten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des *Jetquick PCR Product Purification Spin Kit*. Dadurch wurden störende Oligonukleotide, kleinere DNA-Fragmente und Enzymreste entfernt, die für weitere Arbeitsschritte störend wären.

4.2.12 DNA-Sequenzierung

Um die zuvor isolierte Plasmid-DNA auf Integration des enthaltenen Inserts und korrekte PCR-Amplifikation zu überprüfen, wurde die Plasmid-DNA sequenziert. Die DNA-Sequenzierungen wurden mit dem ABI Prism Dye Terminator Kit und dem ABI 16-Kapillar-Sequenzierer (ABI Prism® 3500 Genetic Analyzer) der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Das Prinzip dabei beruht auf der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al. 1977); neben dNTPs werden auch fluoreszenz-markierte Didesoxy-Ribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs) in die zyklische Sequenzierreaktion eines spezifischen PCR-Produkts eingesetzt. Wird ein solches ddNTP in den entstehenden DNA-Strang eingebaut, kommt es zum Abbruch der Sequenzierreaktion. Da die Integration der ddNTPs in die entstehenden DNA-Stränge zufällig erfolgt, sind diese von unterschiedlicher Länge und je nach Didesoxynukleotid mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der bei der anschließenden Kapillarelektrophorese mittels Laser detektiert wird. Anhand der Größe der PCR-Fragmente und deren Fluoreszenzmarkierung kann das Sequenzchromatogramm einer Probe abgeleitet werden.

4.2.13 Klonierung mittels TOPO® -Klonierungs-Technologie

Bei der TOPO® -Klonierungs-Technologie handelt es sich um eine schnelle und effiziente Klonierungsstrategie zur direkten Insertion eines PCR-Produkts in einen Plasmidvektor. Die TOPO-Technologie nutzt dabei die Eigenschaft der Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus, welche sowohl DNA spalten als auch ligieren kann. Das Enzym bindet zunächst spezifisch an die doppelsträngige Vektor-DNA und durch die anschließende Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats eines Strangs wird ein einzelsträngiger 3'-Überhang erzeugt (Shuman 1991). Dieser dringt daraufhin in das doppelsträngige PCR-Produkt ein, ersetzt einen Teil des unteren Strangs und wird schließlich an das PCR-Produkt ligiert. Diese Reaktion ermöglicht u.a. die Generierung eines sogenannten Eingangsvektors (*entry vector*), der als Ausgangsvektor zur Klonierung eines bestimmten DNA-Fragments (Inserts) in verschiedene Zielvektoren (*destination vector*) des GATEWAY™-Systems verwendet

werden kann. Die TOPO-Klonierungs-Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers Invitrogen durchgeführt.

4.2.14 Klonierung mittels GATEWAY™-Technologie

Die Klonierung mittels GATEWAY™-Technologie bietet durch lokusspezifische Rekombinationen eine Alternative zur herkömmlichen Klonierungsstrategie durch Restriktion und Ligation. Diese Technologie nutzt die Eigenschaften des Bakteriophagen Lambda, welcher im Rahmen des lysogenen Zyklus in das Genom eines Bakteriums integriert werden kann. Um eine Integration des zu klonierenden DNA-Fragments (Inserts) in den Gateway™-Zielvektor zu ermöglichen, wird dieses von zwei spezifischen kurzen DNA-Sequenzen, den sogenannten Att-Stellen (*attachment sites*), flankiert. Das Einfügen des Inserts zwischen die Att-Stellen kann mittels herkömmlicher Klonierung (Restriktion und Ligation) oder mittels TOPO®-Technologie erfolgen. Der so erzeugte Eingangsklon mit Insert wird in einer enzymvermittelten LR-Reaktion mit einem Zielvektor mit äquivalenten Att-Stellen eingesetzt. In dieser Reaktion wird das Insert über eine Rekombination zwischen den Att-Stellen des Eingangsklons und des Zielvektors in diesen integriert. Die Herstellung eines Gateway-kompatiblen Zielvektors erfolgt einfach durch Einbau einer Gateway-Leserahmen-Kassette (*Gateway Reading Frame Cassette*) mit Att-Stellen in einen gewöhnlichen Plasmidvektor. Die GATEWAY™-Reaktionen in dieser Arbeit wurden nach den Angaben des Herstellers Invitrogen durchgeführt.

4.3 Zellbiologische Arbeitstechniken

4.3.1 Zellkultur

4.3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte in Begasungsbrutschränken bei konstanten Bedingungen von 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank bearbeitet. Für Experimente wurden die Zelllinien als Adhäsionskultur in 10 cm Zellkulturschalen

bzw. für Immunfluoreszenzanalysen auf Glasdeckgläschen in 12-Loch-Kulturplatten kultiviert.

Tab. 4.12: Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedien: Angegeben sind die für zellbiologische und biochemische Experimente verwendeten Zelllinien sowie zur Kultivierung benötigten Zellkulturmedien und Zusätze. Diese werden im Folgenden als Vollmedium bezeichnet.

Zelllinie	Medium	Zusätze
CHO-K1	F12 (Ham)	10% FBS (v/v) 1% P/S (v/v)
Flp-In TM -CHO	F12 (Ham)	10% FBS (v/v) 1% P/S (v/v) 100 µg/ml Zeocin (v/v)
stabil transfizierte Flp-In TM -CHO	F12 (Ham)	10% FBS (v/v) 1% P/S (v/v) 200 µg/ml Hygromycin (v/v)
COS7	DMEM	10% FBS (v/v) 1% P/S (v/v)

4.3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei -150°C in Aliquots gelagert und konnten bei Bedarf aufgetaut oder weggefroren werden. Zum Auftauen wurde die in Kryoröhrchen gelagerte Zellsuspension in einem 37°C Wasserbad erwärmt und unmittelbar in 8 ml Vollmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 900 Upm und RT zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 10 ml Vollmedium resuspendiert und auf eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Zum Einfrieren wurden die Zellen mit 2 ml TrypLETM Express (Trypsin) von den Zellkulturschalen gelöst und die Trypsin-Reaktion anschließend mit 8 ml Vollmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in einem Falcon für 5 min bei 900 Upm und RT zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde anschließend in 3 ml eiskaltem Einfriermedium [Vollmedium + 10 % DMSO (v/v)] resuspendiert, wobei DMSO die Bildung von Eiskristallen vermeidet. Nachdem die Zellsuspension in 1 ml Kryoröhrchen (Nunc) aliquotiert wurde, wurden diese in einem mit Isopropanol

befüllten Einfrierbehälter über Nacht bei -80°C zwischengelagert und am nächsten Tag in -150°C weggefroren.

4.3.1.3 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden zur kontinuierlichen Kultivierung je nach Bedarf, i. d. R. alle 3-4 Tage, bei einer Konfluenz von 80-90% auf neue Zellkulturschalen überführt. Dafür wurde das Vollmedium entfernt, die Zellen einmal mit 3 ml 1x PBS^{-/-} gewaschen und die Zellen durch Zugabe von 2 ml TrypLETM Express, einer kurzen Inkubation bei 37°C und leichtem Abklopfen von der Zellkulturschale gelöst. Anschließend wurden die Zellen in 8 ml Vollmedium resuspendiert und je nach Wachstumsgeschwindigkeit i. d. R. im Verhältnis 1:10 mit Vollmedium in einem Volumen von 10 ml verdünnt.

4.3.2 Methoden zur Transfektion eukaryotischer Zellen

Die verwendeten Transfektionsmethoden mittels LipofectaminTM2000 oder TurboFectTM beruhen auf dem Prinzip der Lipofektion. Bei dem verwendeten Transfektionsreagenzien handelt es sich um ein kationisches Lipid, welches aufgrund seiner positiven Ladung durch ionische Wechselwirkungen einen Komplex mit der negativ geladenen DNA eingeht. Dieser Lipid-DNA-Komplex kann durch Endozytose von den Zellen aufgenommen und so die gewünschte Plasmid-DNA in die Zellen eingebracht werden. Das optimale Verhältnis zwischen DNA und Transfektionsreagenz ist auf 1:2 festgelegt.

4.3.2.1 Transiente Transfektion mit LipofectaminTM2000

Am Vortag wurden die zu transfizierenden Zellen mit einer Konfluenz von 60-80% auf 10 cm Zellkulturschalen bzw. auf 12-Loch-Platten für IF ausgesät. Am nächsten Tag wurden zunächst zwei Transfektionsansätze angesetzt:

Transfektionsansatz I: 100-400 μl Opti-MEM[®] + 2-12 μl LipofectaminTM2000
Transfektionsansatz II: 100-400 μl Opti-MEM[®] + 1-6 μg Plasmid-DNA

Es folgte eine Inkubation der Transfektionsansätze für 5 min bei RT. Anschließend wurden die Ansätze miteinander vermischt und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die zu transfizierenden Zellen vorbereitet. Dafür wurden die Zellen mit 1 ml 1x PBS^{-/-} gewaschen und mit 3,2 ml bzw. 200 µl (für IF) vorgewärmten Opti-MEM[®] überschichtet. Der Transfektionsansatz wurde tröpfchenweise auf die Zellen gegeben, unter leichtem Schwenken der Kulturschale vermischt und für ca. 6 h bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Opti-MEM[®] entfernt und je nach Experiment entweder 10 ml bzw. 1 ml (für IF) Vollmedium oder Hungermedium (DMEM + 1% P/S + 0,1% FBS) auf die Zellen gegeben und für weitere 16-20 h bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert.

4.3.2.2 Transiente Transfektion mit TurboFect™

Auch für diese Transfektion wurden die zu transfizierenden COS7-Zellen am Vortag mit einer Konfluenz von 60-80% auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde zunächst der folgende Transfektionsansatz zusammen pipettiert:

1 ml Opti-MEM[®] + 2-6 µg DNA + 4-12 µl TurboFect™

Es folgte eine Inkubation des Ansatzes für 15-20 min bei RT. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen 1 x mit PBS gewaschen und anschließend 9 ml vorgewärmtes Opti-MEM[®] auf die Zellen gegeben. Der Transfektionsansatz wurde tröpfchenweise auf die Zellen gegeben, durch leichtes Schwenken der Kulturschale vermischt und für ca. 4-20 h bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. Je nach Experiment wurde entweder nach ca. 4-6 h 10 ml bzw. 1 ml (für IF) Vollmedium auf die Zellen gegeben oder der Transfektionsansatz mit Opti-MEM[®] als Hungermedium auf den Zellen belassen.

4.3.2.3 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Flp-In™ Systems

Die Herstellung stabil transfizierter eukaryotischer Zellen erfolgte mit Hilfe des Flp-In™ Systems der Firma Invitrogen. Die dafür verwendeten Flp-In™-CHO-Zellen verfügen über einen definierten Locus im Genom, wo eine cDNA-Sequenz eingebaut und stabil exprimiert wird. Die cDNA wird dazu über kurze, flankierende Erkennungssequenzen in einen Eingangsvektor kloniert und in die Zellen transfiziert. Zusätzlich muss eine Flp-Rekombinase mit Hilfe eines Expressionsvektors kotransfiziert werden, da die Flp-Rekombinase über die flankierenden Erkennungssequenzen der cDNA, die Rekombination zwischen Eingangsvektor und definiertem Locus im Genom der Zelle ermöglicht. Die Selektion auf transfizierte Klone erfolgte mittels einer zusätzlich integrierten Hygromycinresistenz. Der proteinbiochemische Nachweis der stabilen Expression des gewünschten Proteins ist über ein C-terminal gekoppeltes V5-Epitop möglich.

Am Vortag der Transfektion wurden $1,2 \times 10^6$ Flp-In™-CHO-Zellen/10 cm Zellkultur-schale ausgesät. Am nächsten Tag wurden Transfektionsansatz I (400 µl Opti-MEM® + 1,2 µg des gewünschten DNA-Plasmids + 9 µg des Flp-Rekombinase-Vektors) und Transfektionsansatz II (400 µl Opti-MEM® + 20 µl Lipofectamin™2000) angesetzt und eine Transfektion, wie unter 4.3.2.1 für Lipofectamin™2000 beschrieben, durchgeführt. Nach einer 6-stündigen Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz wurde dieser abgesaugt und durch 10 ml F12-Vollmedium (ohne Zeocin und Hygromycin) ersetzt. Danach wurden die Zellen für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank inkubiert und anschließend mit Selektionsmedium (F12-Vollmedium + 100 µg/ml Hygromycin) versetzt. Zur besseren Selektion positiver Klone wurden die Zellen am nächsten Tag trypsiniert und in 6-Loch-Kulturplatten umgesetzt. Nach mehrwöchiger Selektion mit ansteigender Hygromycinkonzentration (bis 200 µg/ml) im Selektionsmedium wurden die erzeugten Zelllinien mittels Immundetektion und Verwendung eines anti-V5-Antikörpers auf die stabile Protein-Expression der jeweils eingebrachten cDNA getestet.

4.3.3 Immunfluoreszenzanalysen

Mittels Immunfluoreszenzanalysen (IF) wurde die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Liganden (EGF) untersucht. Dafür wurden zunächst Glasdeckgläschen (18 mm) zur Sterilisation in 70%-igem Ethanol eingelegt, kurz abgeflammt und anschließend in 12-Loch-Platten platziert. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläschen mit 1x PBS^{-/-}-Puffer, wurden die COS7-Zellen am Vortag der Transfektion auf diese ausgesät und am nächsten Tag wie unter 4.3.2.1 beschrieben mit den *CBL*-Expressionskonstrukten transfiziert. Für die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Liganden wurden die Zellen am darauf folgenden Tag mit 100 ng/ml EGF-Alexa Fluor[®] 488 für 30 min stimuliert und anschließend mit 1x PBS^{-/-} gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 500 µl Paraformaldehyd-Lösung und einer Inkubation bei leichtem Schwenken für 10 min bei RT. Nach Entfernen der Fixierlösung, wurden die Zellen 3x mit 1x PBS^{+/+} für 10 min unter Schwenken bei RT gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren folgte eine Inkubation mit 400 µl Blockierlösung für 45 min unter leichtem Schwenken bei RT. Danach wurde der primäre Antikörper in einer Antikörperlösung verdünnt und auf einen in einer feuchten Kammer platzierten Parafilm pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite auf die Antikörperverdünnung platziert und für 2-3 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Antikörpern, wurden die Zellen nach Bindung des primären Antikörpers zunächst 2x 10 min mit Hochsalzpuffer und anschließend 2x 10 min mit 1x PBS^{+/+} gewaschen. Die Zellen wurden dann mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten sekundären Antikörpern in Antikörperlösung für 1 h in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Zusätzlich wurde der Farbstoff DAPI zu der Antikörperlösung gegeben; dieser lagert sich an AT-reiche Regionen der DNA an und ermöglicht so eine Visualisierung des Zellkerns. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS^{+/+} für 10 min wurden die Deckgläschen mit Mowiol-Einbettmedium auf einem Objektträger fixiert. Die Präparate wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (*confocal laser scanning microscope*; cLSM) *DMIRE2* der Firma Leica ausgewertet.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen

Adhärenz wachsende Zellen wurden auf Eis zweimal mit eiskaltem PBS^{+/+}-Puffer gewaschen und anschließend je nach Experiment mit dem entsprechenden Lyse-puffer (+ *Complete mini* Proteaseinhibitoren und bei Bedarf *PhosSTOP* Phosphatas-einhibitoren) versetzt und kurz bei 4°C inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine mechanische Lyse mithilfe eines Zellschabers. Die Zellsuspension wurde in ein vorgekühltes Zentrifugationsgefäß überführt, durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und zur Entfernung von Zelltrümmern für 10 min bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Bis zur weiteren Analyse mittels SDS-Page, Western-Blot und Immundetektion wurde der Überstand mit 4x Laemmli-Puffer versetzt und bei -20°C gelagert.

4.4.2 GTPase-Pull-Down-Experimente

Zur Bestimmung der Aktivität der kleinen GTPasen RRAS, RAP1A und RAP1B wurden sogenannte *GTPase-Pull-Down*-Experimente durchgeführt. Bei diesem Verfahren nutzt man die Tatsache, dass aktivierte, GTP-gebundene GTPasen mit einem Effektorprotein interagieren und mit diesem spezifisch präzipitiert werden können. Aus diesem Grund kann die aktive GTPase durch Zugabe von aufgereinigtem Fusionsprotein zwischen dem Effektorprotein und GST (Glutathion-S-Transferase) aus einem Zelllysat mit Glutathion-Sepharose präzipitiert und im Präzipitat mittels Immundetektion nachgewiesen werden. Für die Präzipitation von aktivem RRAS wurde als Effektorprotein die RBD von PI3K als GST-Fusionsprotein GST-PI3K[RBD] verwendet. Für die Präzipitation von aktivem RAP1A und RAP1B wurde als Effektorprotein die RBD von RALGDS als GST-Fusionsprotein GST-RALGDS[RBD] eingesetzt.

Aufreinigung von GST-PI3K[RBD]- bzw. GST-RALGDS[RBD]-Fusionsproteinen:

Die Möglichkeit einer hochspezifischen Aufreinigung von in *E.coli* überexprimierten GST-Fusionsproteinen ist aufgrund der Affinität zwischen Glutathion und Glutathion-

S-Transferase (GST) gegeben. Nach Transformation von *E.coli* BL21 mit 1 µl des pGEX-GST-PI3K[RBD]- bzw. des pGEX-GST-RAL[RBD]- Konstrukts wurden diese auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Bakterienkolonie gepickt und in 2 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium über den Tag bei 37°C und 200 Upm geschüttelt. Abends wurde eine der 2 ml Bakteriensuspensionen in 50 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und über Nacht bei 200 Upm und 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden wiederum 10 ml dieser Vorkultur in 1000 ml Ampicillin-haltigem TB-Medium überführt und bis zu einer $OD_{600}=0,6$ bei 37°C und 200 Upm kultiviert (ca. 4 h). Die Induktion der Expression des GST-PI3K[RBD]- bzw. GST-RAL[RBD]-Fusionsproteins erfolgte nach Erreichen der OD durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration von 0,1 mM). Nach einer weiteren Inkubation bei 30°C und 200 Upm für 2 h wurde die Bakterienkultur in ein Zentrifugationsgefäß überführt und für 20 min bei 4.000 Upm und RT zentrifugiert. Es folgte die Resuspension des Pellets in 20 ml 50 mM Tris HCl (pH 8). Zum Aufschluss wurden die Bakterien erneut für 20 min bei 4.000 Upm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Trockeneis schockgefroren und über Nacht bei -80°C gelagert.

Am nächsten Tag wurde das Pellet auf Eis aufgetaut und anschließend in 20 ml GTBLI-Puffer resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf einem Überkoprotator bei 4°C, wurden 8 ml GTBLII-Puffer dazu gegeben und der Ansatz erneut für 10 min auf einem Überkoprotator bei 4°C inkubiert. Zur Scherung bakterieller DNA wurde die Lösung auf Eis sonifiziert, in 50 ml Zentrifugationsgefäße überführt und für 60 min bei 4°C und 10.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues 50 ml Zentrifugationsgefäß gegeben, 1 ml gewaschene *GST-BindTM Resin* (Glutathion-Kügelchen) hinzugefügt und 1 h bei 4°C auf dem Überkoprotator gemischt. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 2.500 Upm und 4°C, wurde der Überstand verworfen und das Pellet 4x mit 5 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde 550 µl Lagerungspuffer zugegeben und die Proteinsuspension in 50-100 µl Aliquots bis zur Verwendung bei - 80°C gelagert.

Zellyse und RRAS- bzw. RAP1-Pull-Down:

Für den *RRAS-Pull-Down* wurden stabil *RRAS*-exprimierende CHO-Zellen verwendet. Für den *RAP1-Pull-Down* wurden am Tag vor dem *GTPase-Pull-Down*-Experiment COS7-Zellen wie unter 4.3.2.1 bzw. 4.3.2.2 beschrieben mit den *RRAS*- und *RAP1A*- bzw. *RAP1B*-Konstrukten transient transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte nach zweimaligem Waschen mit 5 ml eiskaltem PBS^{+/+}-Puffer, die Zellyse in 1 ml *Pull-Down*-Lysepuffer (+*Complete mini* Proteaseinhibitoren *EDTA-free* und *PhosSTOP* Phosphataseinhibitoren) auf Eis. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Schaber mechanisch von der Schale gelöst und in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen überführt. Zur Entfernung von Zelltrümmern folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 14.000 Upm und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen pipettiert und 75 µl als Rohlysat zurückbehalten. Dieses wurde mit 25 µl 4x Laemmli-Puffer vermischt und bis zur weiteren Analyse mittels SDS-Page und Western-Blot bei -20°C gelagert. Der Rest des Lysats wurde für den *RRAS*- bzw. *RAP1-Pull-Down* eingesetzt. Es wurden 15 µl des aufgereinigten GST-PI3K[RBD]- bzw. GST-RAL[RBD]-Fusionsproteins zu dem restlichen Lysat gegeben und für 45 min bei 4°C auf einem Überkoprotator inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Suspensionen für 2 min bei 4°C und 2.500 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und 3x mit *Pull-Down*-Lysepuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden 20 µl *Pull-Down*-Lysepuffer auf das Präzipitat gegeben, mit 20 µl 4x Laemmli-Puffer vermischt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

4.4.3 Koimmunpräzipitation

In dieser Arbeit wurde die Koimmunpräzipitation (KoIP) zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen sowie zur Analyse der EGFR-Ubiquitylierung eingesetzt.

Bei der KoIP wird zu einem Zellysat ein Antikörper gegeben, der spezifisch gegen ein Epitop eines der beiden zu untersuchenden Proteine (Protein X) gerichtet ist und über seine F_{ab}-Region an dieses Protein bindet. Dieser Antikörper bindet gleichzeitig über seine F_c-Region an speziell beschichtete Agarosekügelchen, welche ebenfalls zu dem Zellysat gegeben werden. Nach der Zellyse werden die Agarosekügelchen

und damit auch das zu untersuchende Protein X mittels Zentrifugation präzipitiert. Interagiert ein zweites Protein (Protein Y) mit Protein X, wird dieses kopräzipitiert und kann mittels spezifischer Antikörper im Präzipitat nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen, das Ezview™ Rot-Anti-HA-Affinitäts-Gel (*HA-trap*) und die GFP-Trap®_A (*GFP-trap*) verwendet. Für die KoIP von ubiquitylierten EGFR wurden Protein-A-Agarosekügelchen und ein anti-EGFR-Antikörper verwendet.

KoIP zur Untersuchung einer Protein-Protein-Interaktion:

Vorbehandlung der Agarosekügelchen:

Pro Ansatz wurden mit abgeschnittener Spitze 40 µl der bereits mit anti-HA-Antikörpern bzw. 20 µl der mit anti-GFP-Antikörpern gekoppelten Agarosekügelchen in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen pipettiert. Nach Zugabe von 500 µl eiskaltem *HA-trap*-Puffer bzw. *GFP-trap*-Puffer und vorsichtigem Invertieren, erfolgte eine Zentrifugation bei 8.000 Upm und 4°C für 1 min. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und der Waschschrift zweimal wiederholt.

Zellyse:

Die Zellen wurden am Vortag bei etwa 75%-iger Konfluenz, wie unter 4.3.2.1 bzw. 4.4.2.2 beschrieben, mit verschiedenen *RRAS*-Konstrukten sowie mit *Talin1*-, *RAP1*- bzw. *RIAM*-Expressionskonstrukten kotransfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen 1x mit eiskaltem PBS^{+/+} gewaschen und anschließend in 1 ml Lysepuffer (*HA-trap*- bzw. *GFP-trap*-Puffer + *Complete mini* Proteaseinhibitoren *EDTA-free* und *PhosSTOP* Phosphataseinhibitoren) von der Zellkulturschale abgeschabt und in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen überführt. Das Lysat wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 Upm und 4°C von Zelltrümmern befreit und der Überstand in ein frisches Zentrifugationsröhrchen überführt. 75 µl des Überstandes wurden als Rohlysat zurückbehalten, mit 25 µl 4x Laemmli-Puffer versetzt und bei -20 °C weggefroren. Der restliche Überstand wurde für die Koimmunpräzipitation eingesetzt.

Koimmunpräzipitation:

Der Überstand wurde zu den vorbehandelten Agarosekügelchen gegeben und für die KoIP mit Hilfe von HA-Antikörpern für 1 h und mit Hilfe von GFP-Antikörpern für 2 h auf einem Überkopffrotator bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 1 min bei 8.000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden 500 µl HA-*trap*- bzw. GFP-*trap*-Puffer zum Präzipitat gegeben, durch Invertieren vermischt, bei 8000 Upm und 4°C erneut für 30 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde 2x wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde 20 µl frischer HA-*trap*- bzw. GFP-*trap*-Puffer auf die Kügelchen gegeben und mit 30 µl 4x Laemmli-Puffer versetzt. Bis zur Analyse mittels SDS-Page, Western-Blot und Immundetektion wurde das Präzipitat zusammen mit dem Rohlysate bei -20 °C weggefroren.

KoIP zur Untersuchung der EGFR-Ubiquitylierung:Vorbehandlung der Agarosekügelchen:

Pro Ansatz wurden mit abgeschnittener Spitze 50 µl Protein-A-Agarosekügelchen in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen pipettiert, mit 500 µl RIPA-Puffer versetzt, invertiert und anschließend für 1 min bei 11.000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift zweimal wiederholt.

Stimulation:

COS7-Zellen wurden am Vortag wie unter 4.3.2.1 beschrieben mit den *CBL*-Expressionskonstrukten, sowie jeweils mit einem *HA-Ubiquitin*- und einem *EGFR*-Konstrukt transient transfiziert und über Nacht in Hungermedium kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 20 ng/ml EGF-haltigem Hungermedium bei 37°C im Begasungsbrutschrank bei konstanten 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ für 30 min inkubiert. Ein Ansatz blieb als Kontrolle unstimuliert und wurde direkt lysiert.

Zellyse:

Nach der Stimulation mit EGF wurden die Zellen 1x mit PBS^{+/+} gewaschen und anschließend in 1 ml RIPA-Puffer (+ *Complete mini* Proteaseinhibitoren *EDTA-free*)

lysiert, von der Zellkulturschale abgeschabt und in ein vorgekühltes Zentrifugationsgefäß überführt. Zur Inhibierung von deubiquitylierenden Enzymen wurde dem Lysepuffer vor der Zelllyse noch zusätzlich 10 mM *N*-Ethylmaleinimid zugefügt. Die Lysate wurden 10 min bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand schließlich in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen überführt. Es wurden 75 µl vom Überstand als Rohlysate zurückbehalten, mit 25 µl 4x Laemmli-Puffer versetzt und bei -20°C weggefroren.

Koimmunpräzipitation:

Zum restlichen Überstand wurden 5 µl anti-EGFR-Antikörper (spezifischer Antikörper des zu präzipitierenden Proteins) zugegeben und für 2 h bei 4°C auf einem Überkoprotator inkubiert. Um den entstehenden Antigen-Antikörper-Komplex zu präzipitieren wurden anschließend 50 µl der vorbehandelten Protein-A-Agarose zum Ansatz gegeben und die Bindung der Antikörper-Protein-Komplexe an die Agarosekügelchen während einer Inkubation über Nacht im Überkoprotator bei 4°C ermöglicht. Am nächsten Tag wurde der Ansatz für 1 min bei 11.000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Sodann wurden 500 µl Triton-Lysepuffer (+ *Complete mini* Proteaseinhibitoren *EDTA-free* + 0,05% SDS) zu den Präzipitaten gegeben und der Ansatz erneut für 1 min bei 11.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Abschließend wurden 20 µl Triton-Lysepuffer zu dem Präzipitat gegeben, mit 30 µl 4x Laemmli-Puffer vermischt und zusammen mit dem Rohlysate bei -20 °C bis zur Analyse mittels SDS-Page, Western-Blot und Immundetektion gelagert.

4.4.4 Biotinylierungsexperimente

Bei der Biotinylierung handelt es sich um eine biochemische Methode, bei der ein kleines, wasserlösliches Molekül namens Biotin an eine Vielzahl von Makromolekülen, wie z.B. Proteinen, gebunden werden kann. Die geringe Größe von Biotin bringt einerseits den Vorteil mit sich, dass ein Molekül bei Vorhandensein der entsprechenden Bindestellen mehrfach biotinyliert werden kann und zum anderen bleiben die biologischen und chemischen Eigenschaften des Proteins erhalten. Für

die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde das Thiol-spaltbare und Amin-reaktive Biotinylierungsreagenz Sulfo-NHS-SS-Biotin verwendet, da es aufgrund der Ladung des gebundenen Succinimidyl-Rings die Zellmembran nicht durchdringen kann. Somit reagiert die Estergruppe dieses Reagenz bei intakter Zellmembran nur mit den primären Aminogruppen von Proteinen an der Zelloberfläche, also mit der α -Aminogruppe der ersten Aminosäure der Proteins sowie der ϵ -Aminogruppe von Lysinen in dem Protein. Um eine mit dieser Interaktion verbundene sterische Hinderung des Proteins zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit Biotinmoleküle mit verlängerten Verbindungsarmen (*Biotin-crosslinker*) verwendet. Die Präzipitation der biotinylierten Proteine aus dem Zelllysat erfolgt mit Streptavidin-konjugierten Agarosekügelchen (EZview™ Red Streptavidin Affinitätsgel). Streptavidin ist ein 53 kDa schweres Homotetramer und wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnen. Streptavidin wird mit einer Affinität von mehr als 10^{15} M^{-1} von Biotin gebunden; damit ist der Streptavidin-Biotin-Komplex eine der stärksten, in der Natur vorkommenden, nicht-kovalenten Bindungen.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit dieser Methode der Einfluss von CBL-Aminosäuresubstitutionen auf die Menge von Zellmembran-assoziierten EGFR, sowie dessen Internalisierung ins Zellinnere untersucht werden. Dafür wurden COS7-Zellen am Vortag mit den verschiedenen *CBL*-Expressionskonstrukten, wie unter 4.3.2.1 bzw. 4.3.2.2 beschrieben, transient transfiziert und unter Serumentzug kultiviert.

4.4.4.1 Zelloberflächenbiotinylierung zu Detektion von Zellmembran-assoziiertem EGFR

Vorbehandlung der Streptavidin-Agarosekügelchen:

Pro Ansatz wurden 40 μl Streptavidin-Agarosekügelchen mit einer abgeschnittenen Spitze in ein Zentrifugationsröhrchen pipettiert und mit 1 ml RIPA versetzt. Nach vorsichtigem Invertieren wurde der Mix bei 8.700 Upm und 4°C für 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Biotinylierung:

Etwa 18 h nach Transfektion wurden die Zellen mit vorgewärmtem, mit 10 ng/ml EGF-haltigem Hungermedium versetzt und für 30 min bei 37°C in einem Begasungsbrutschrank inkubiert. Pro transfiziertem *CBL*-Konstrukt wurde eine Zellkulturschale nur mit Hungermedium ohne EGF versetzt und ebenfalls bei 37°C im Begasungsbrutschrank inkubiert (=0min-Wert). Zum Abstoppen der EGFR-Endozytose, wurden die Zellkulturschalen nach der Inkubationsphase direkt auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen 3x mit 5 ml eiskaltem HBSS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml 0,5mg/ml Biotin/HBSS-Puffer auf einem Schüttler für 15 min bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Biotin wurden die Zellen anschließend 3x mit 5 ml eiskaltem Wasch-HBSS-Puffer gewaschen.

Zellyse:

Nachdem die Zellen 1x mit 5 ml eiskaltem PBS^{+/+} gewaschen wurden, erfolgte die Zellyse durch Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer (+*Complete mini* Proteaseinhibitoren *EDTA-free*) pro Platte. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen überführt. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurden die Zellysate für 10 min bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert.

Präzipitation der biotinylierten Rezeptoren mit Streptavidin:

Vom Zentrifugationsüberstand wurden jeweils 75 µl als Rohlysat zurückbehalten, mit 25 µl 4x Laemmli-Puffer versetzt und bei -20 °C weggefroren. Zu dem Rest des Überstands wurde nun auf die vorbehandelten Streptavidin-Agarosekügelchen gegeben und für mindestens 2 h oder über Nacht bei 4°C in einem Überkopffrotator inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 8.700 Upm und 4 °C wurde der Überstand verworfen und die Streptavidin-Agarosekügelchen 2x mit je 500 µl RIPA gewaschen, der Ansatz durch Invertieren vermischt und erneut bei 8.700 Upm und 4°C für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Nach den Waschsritten wurden 20 µl RIPA-Puffer und 30 µl 4x Laemmli-Puffer zu den Kügelchen gegeben und durch Vortexen vermischt. Das Präzipitat wurde bis zur

weiteren Analyse mittels SDS-Page, Western-Blot und Immundetektion bei -20 °C gelagert.

4.4.4.2 Zelloberflächenbiotinylierung zur Quantifizierung der EGFR-Internalisierung

Mit diesem Biotinylierungsexperiment kann eine Aussage über die Menge von internalisierten Rezeptoren nach einem bestimmten Zeitraum der EGF-Stimulation gemacht werden, indem die Menge der internalisierten (präzipitierten) Rezeptoren auf die Gesamtmenge der Rezeptoren im Rohlysate normalisiert wird.

Vorbehandlung der Streptavidin-Agarosekügelchen:

Siehe Material & Methoden, *4.4.4.1 Zelloberflächenbiotinylierung zur Detektion von Zellmembran-assoziiertem EGFR*

Biotinylierung:

Siehe Material & Methoden, *4.4.4.1 Zelloberflächenbiotinylierung zur Detektion von Zellmembran-assoziiertem EGFR*

Internalisierung:

Um die Internalisierung von Zellmembran-assoziierten, biotinylierten EGFR zu induzieren, wurden die Zellen etwa 18 h nach Transfektion mit 37°C-warmem 10 ng/ml EGF-haltigem Hungermedium versetzt und für 30 min bei 37°C in einem Begasungsbrutschrank inkubiert. Die Internalisierung wurde gestoppt, indem die Zellen nach Stimulation direkt auf Eis gestellt wurden. Zur Entfernung von Biotin an nicht internalisierten Rezeptoren wurden die Zellen mit 5 ml Glutathion-Puffer versetzt und anschließend auf einem Horizontal-Schüttler für 25 min bei 4°C inkubiert. Dann wurde der Puffer entfernt und der Waschschriff wiederholt. Hierbei wurden Biotin-Moleküle von Zellmembran-ständigen Rezeptoren abgespalten. Um die Effektivität der Glutathion-Waschschriffe zu überprüfen blieb jeweils ein Ansatz unstimuliert und wurde direkt nach der Biotinylierung und dem HBSS-Waschschriff mit Glutathion-Puffer versetzt.

Zellyse und Präzipitation der biotinylierten Rezeptoren mit Streptavidin:

Siehe Material & Methoden, 4.4.4.1 *Zelloberflächenbiotinylierung zu Detektion von Zellmembran-assoziiertem EGFR*

4.4.5 Quantifizierung der EGFR-Degradierung bei inhibierter Proteinbiosynthese

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der EGFR-Degradierung nach EGF-Stimulation wurden COS7-Zellen am Vortag mit den verschiedenen *CBL*-Konstrukten transfiziert (wie in 4.3.2.1 bzw. 4.3.2.2 beschrieben) und über Nacht in Hungermedium kultiviert. Um die Proteinbiosynthese von EGFR während des Experiments zu inhibieren wurden die Zellen am nächsten Tag für 30 min bei 37°C mit 10 µg/ml Cycloheximid-haltigem Hungermedium im Begasungsbrutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 60, 120 und 240 min mit 20 ng/ml EGF-haltigem Hungermedium bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 5 ml eiskaltem PBS^{+/+} erfolgte die Zellyse durch Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer (+ *Complete mini* Proteaseinhibitoren *EDTA-free*). Pro transfiziertem *CBL*-Konstrukt blieb eine Platte unstimuliert und wurde sofort lysiert. Dieser Ansatz diente zur Bestimmung der EGFR-Anfangsmenge. Das Lysat wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 Upm und 4°C von Zelltrümmern befreit, 120 µl des Überstands in ein frisches Zentrifugationsröhrchen überführt und mit 40 µl 4x Laemmli-Puffer versetzt. Bis zur Analyse mittels SDS-Page, Western-Blot und Immundetektion wurden die Zellysate bei -20 °C gelagert.

4.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde die Methode der eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen angewandt. Eine Denaturierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) zugegeben. SDS bindet als anionisches Detergenz mit großer Affinität an Proteine und zerstört alle nicht kovalent gebundenen Wechselwirkungen und somit die physiologische

Proteinfaltung. Dabei kommt es zur Ausbildung von SDS-Protein-Komplexen. Die relativ geringe Eigenladung der Proteine wird durch die zahlreichen negativen Ladungen, die mit der Vielzahl gebundener SDS-Moleküle eingebracht werden, überdeckt. So wird das Ladung/Masse-Verhältnis aller Proteine nahezu gleich. Die Wanderungsgeschwindigkeit des jeweiligen Proteins in einem SDS-haltigen Gel wird somit durch das Molekulargewicht und die Porengröße des Gels bestimmt. Durch die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von Polyacrylamid kann die Porengröße des Gels bestimmt und so an die Größe der zu untersuchenden Proteine angepasst werden. Die Polyacrylamid-Trenngellösung wurde zur Gelelektrophorese nach der unten angegebenen Zusammensetzung (Tab. 4.12) hergestellt und zwischen zwei Glasplatten in einer Minigel-Apparatur (BioRad) gegossen. Um eine gleichmäßige Oberfläche des Trenngels zu gewährleisten, wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation des Trenngels durch Zugabe von APS und TEMED, wurde das Isopropanol mit Wasser vollständig entfernt. Zur Fokussierung der Protein/SDS-Komplexe vor der eigentlichen Auftrennung wurde anschließend auf das Trenngel ein Sammelgel gegossen und mit Probenkammern bestückt. Nachfolgend wurden die Proteinproben im Verhältnis 1:4 mit 4x Probenpuffer (Laemmli-Puffer) versetzt, 5 min bei 95°C aufgekocht, für 1 min bei 8.700 Upm und RT zentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 90-100 V im Sammelgel und bei 140-160 V im Trenngel. Zur Überprüfung der molekularen Masse der Proteine wurde zusätzlich ein Proteingrößenstandard aufgetragen.

Tab. 4.12: Zusammensetzung verschiedener Trenn- und Sammelgele.

	Trenngel			Sammelgel
	10%	12,5%	15%	5%
Aqua bidest. [ml]	5	4,2	2,95	7,8
4x Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer [ml]	3,13	3,13	3,13	3,4
30% AA/BisAA (37,5:1) [ml]	4,15	5	6,25	2,4
TEMED [μ l]	6,3	6,3	6,3	12,5
10% APS (w/v) [μ l]	125	125	125	125

4.4.7 Coomassie®-Färbung

Bei der Coomassie®-Färbung werden Proteine durch die Anlagerung des Farbstoffes an basische Seitenketten der Aminosäuren unspezifisch angefärbt. Das Polyacrylamidgel wurde dafür nach der Gelelektrophorese zunächst für ein paar Minuten mit Aqua bidest. gewaschen und anschließend für 1 h mit einer Coomassie® G-250 Färbelösung unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Nach erfolgreicher Färbung wurde das Gel erneut in Aqua bidest. gewaschen, bis es ausreichend entfärbt war.

4.4.8 Western-Blotting

Für den Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus den SDS-Gelen macht man sich die negative Ladung der durch die SDS-Page entstandenen SDS/Protein-Komplexe zu Nutzen (Elektroblot). Der Transfer erfolgte mittels einer *Semi-Dry-Blot*-Apparatur auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran. Dafür wurde eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten und für 30 s in 100% Methanol aktiviert, für 1 min in Aqua bidest. gewaschen und 5 min in Transferpuffer inkubiert. Zusätzlich wurden pro Gel vier 1 mm starke Whatman-Filterpapiere auf die Gelgröße zugeschnitten, die ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert wurden. Zur Entfernung von störenden Salzen wurden die Polyacrylamidgele nach Entnahme aus der Gelelektrophoresekammer kurz in Transferpuffer geschwenkt. Das Western-Blot-Sandwich wurde wie folgt in der Blot-Apparatur luftblasenfrei aufgeschichtet:

- seitens der Anode
- 2 Whatman-Filterpapiere
- PVDF-Membran
- SDS-Gel
- 2 Whatman-Filterpapiere
- seitens der Kathode

Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte für ein Gel bei 250 mA (3,5 mA/m²) für 60-90 min. Anschließend konnten die auf der PVDF-Membran immobilisierten Proteine durch Immundetektion nachgewiesen werden.

4.4.9 Immunologische Detektion auf PVDF-Membran

Die Immundetektion der auf einer PVDF Membran immobilisierten Proteine beruht auf der Interaktion eines primären Antikörpers mit seinem Antigen. Anschließend kann ein mit Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) konjugierter Sekundär-Antikörper an diesen Komplex binden. HRP katalysiert nach Zugabe eines geeigneten Substrats (Immobilon™ Western-Chemiluminescent HRP-substrate; ECL) eine Lichtreaktion, die auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Zur Absättigung freier Proteinbindungskapazitäten erfolgte nach dem Proteintransfer eine Inkubation der Membran in 5% (w/v) Milchpulver in 1x TBST [für Antikörper von Santa Cruz: 10% (w/v) Milchpulver in 1x PBST] für 30-90 min bei RT. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht unter leichtem Schwenken bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen der Membran für 10 min in 1x TBST bzw. 1x PBST entfernt. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte mit einem gegen diesen gerichteten HRP-konjugierten Sekundärantikörper, welcher unter leichtem Schwenken für 60 min bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurden die Membran erneut dreimal für 10 min bei RT mit 1x TBST bzw 1x PBST gewaschen. Zur Detektion der vom Antikörper erkannten Proteine wurde die Membran abschließend für ca. 3 min mit einer ECL-Substratlösung inkubiert und die entstehende Chemilumineszenz durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte in einem speziellen Entwicklergerät (*X-Ray Film Processor*). Für die immunologische Detektion eines weiteren Primär-Antikörpers, konnten die Membran nach der Erstdetektion durch Inkubation mit dem *Restore™ Western-Blot Stripping* Puffer von bisher gebundenen Antikörpern gereinigt werden.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Auswirkung von humanpathogenen Aminosäuresubstitutionen in CBL auf den zellulären Transport und die Ubiquitylierung des EGFR

Die Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q in der Ubiquitin-E3-Ligase CBL liegen innerhalb der *linker*-RING-Finger-Domäne und sind die Ursache für einen Noonan-Syndrom überlappenden Phänotyp (Martinelli et al. 2010; Niemeyer et al. 2010; Pérez et al. 2010) (Abb. 5.1). Da eine intakte RING-Finger-Domäne sowohl für eine Liganden-induzierte Internalisierung als auch für die Ubiquitylierung und Degradierung des EGFR essentiell ist (Sorkin und Goh 2009), sollten im ersten Teil dieser Arbeit die funktionellen Konsequenzen der drei RASopathie-assoziierten CBL-Aminosäuresubstitutionen auf die EGFR-Ubiquitylierung und den zellulären EGFR-Transport (*trafficking*) untersucht werden. Des Weiteren sollten im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Konsequenzen der CBL-Mutationen auf den RAS-MAPK-Signalweg analysiert werden. Als experimentelle Kontrollen dienten das CBL-Wildtyp-Protein (CBL^{WT}) und die bereits gut untersuchte RING-Finger-Mutante CBL^{C381A}, für die bereits ein eingeschränktes Ubiquitylierungspotential und eine verminderte EGFR-Internalisierung gezeigt werden konnte (Waterman et al. 1999; Thien et al. 2001), sowie jeweils eine Vektorkontrolle (*mock*). Für die experimentellen Analysen wurden CBL-Expressionskonstrukte (pcDNA3-DEST-CBL^{WT}, -CBL^{C381A}, -CBL^{K382E}, -CBL^{D390Y} und -CBL^{R420Q}) genutzt, die bereits vorlagen. Die Abbildung 5.1 zeigt die Positionen der in CBL veränderten Aminosäuren.

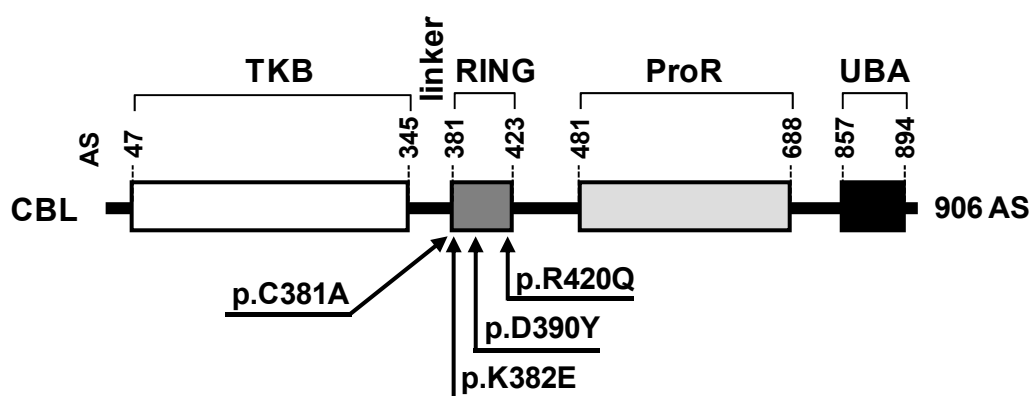


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von CBL mit den in dieser Arbeit analysierten Aminosäuresubstitutionen. Die funktionellen CBL-Proteindomänen sind als Rechtecke dargestellt. Die Bezeichnungen der einzelnen Domänen sind über den Rechtecken angegeben. Die Positionen der veränderten Aminosäuren sind durch schwarze Pfeile markiert, der jeweilige Aminosäureaustausch ist an den Pfeilen angegeben. Folgende Aminosäuresubstitutionen sind eingezeichnet: p.C381A (Austausch von Cystein an der Aminosäureposition 381 durch Alanin), p.K382E (Austausch von Lysin an der Position 382 durch Glutaminsäure), p.D390Y (Austausch von Asparaginsäure an der Position 390 durch Tyrosin) und p.R420Q (Austausch von Arginin an der Position 420 durch Glutamin). Die Gesamtanzahl der Aminosäuren im CBL-Protein ist rechts neben der Domänenstruktur angegeben. AS, Aminosäuren; TKB: *tyrosine kinase binding domain*; linker: *linker sequence*; RING: *RING finger domain*; ProR: *proline-rich region* und UBA: *ubiquitin-associated domain*.

5.1.1 Analyse der EGFR-Ubiquitylierung mittels Koimmunpräzipitation und Western-Blotting in COS7-Zellen nach Expression verschiedener CBL-Proteinvarianten

Die RASopathie-assoziierten CBL-Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q liegen in der RING-Finger-Domäne (Abb. 5.1), die die intrinsische E3-Ligase-Aktivität birgt und der Übertragung von Ubiquitin-Molekülen auf ihre Zielproteine dient (Schmidt und Dikic 2005). Daher kann vermutet werden, dass die genannten Aminosäuresubstitutionen einen Einfluss auf die EGFR-Ubiquitylierung haben. Um dieser Hypothese nachzugehen, sollte die Ubiquitylierung von EGFR mit Hilfe einer Koimmunpräzipitation (KoIP) überprüft werden. Bei diesem Experiment macht man sich zu Nutze, dass Ubiquitin kovalent an seine Zielproteine (z.B. an den EGFR) verknüpft wird und daher nach Immunpräzipitation des Zielproteins (z.B. mittels anti-EGFR-Antikörpern) im Präzipitat nachweisbar ist. Dafür wurden COS7-Zellen mit den verschiedenen CBL-Expressionskonstrukten (CBL^{WT} , CBL^{C381A} ,

CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} oder CBL^{R420Q}) bzw. dem Leervektor (*mock*) zusammen mit *EGFR*- und *HA-Ubiquitin*-Expressionskonstrukten kotransfiziert und über Nacht unter Serumentzug kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit EGF (t_{EGF} 30 min) stimuliert, wodurch unter anderem eine Ubiquitylierung von EGFR induziert wird. Ein Ansatz blieb zur Kontrolle unbehandelt (t_{EGF} 0 min). Um deubiquitylierende Enzyme zu inhibieren, wurde dem Lysepuffer *N*-Ethylmaleinimid (NEM) zugesetzt. Die spezifische Immunpräzipitation des EGFR erfolgte nach der Zelllyse durch Zugabe von anti-EGFR-Antikörpern und Protein-A-Agarose. Anschließend wurde das Präzipitat in der Immundetektion durch die Verwendung eines anti-HA-Antikörpers auf das Vorhandensein und die Menge von ubiquityliertem EGFR untersucht.

Es zeigte sich, dass verglichen mit CBL^{WT} -exprimierenden Zellen, die Expression von CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} und CBL^{R420Q} in COS7-Zellen nach EGF-Stimulation zu einer stark verminderten Ubiquitylierung des EGFR führte (Abb. 5.2 A, Präzipitate, 30 min, Ubiquitin; zwei von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt). Auch die *mock*-transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zu CBL^{WT} -transfizierten Zellen eine verminderte EGFR-Ubiquitylierung. Die Überexpression der ubiquitylierungsdefizienten Proteinvariante CBL^{C381A} (Waterman et al. 1999; Thien et al. 2001) führte in einem der hier dargestellten Experimente zu einer leicht verminderten Menge an ubiquityliertem EGFR (Abb. 5.2 A, Blot oben rechts, Präzipitate, 30 min, Ubiquitin) und in dem anderen gezeigten Experiment zu einer stark verminderten Ubiquitylierung des EGFR (Abb. 5.2 A, Blot oben links, Präzipitate, 30 min, Ubiquitin). Die densitometrische Quantifizierung von insgesamt drei unabhängigen Experimenten ($n=3$) zeigte, dass im Vergleich zu CBL^{WT} -exprimierenden Zellen, eine Expression von CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} und CBL^{R420Q} nach EGF-Stimulation zu einer statistisch signifikanten Reduktion der ubiquitylierten EGFR-Menge auf 69,2%, 62,5% und 65,3% führte (Abb. 5.2 C). COS7-Zellen, die CBL^{C381A} exprimieren, zeigten eine Reduktion der ubiquitylierten EGFR-Menge auf 76,4% (Abb. 5.2 C). Interessanterweise konnte in *mock*-transfizierten Zellen eine mittlere Menge an ubiquityliertem EGFR detektiert werden, ca. 20% weniger im Vergleich zu CBL^{WT} , aber ungefähr 10-17% mehr im Vergleich zu CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} und CBL^{R420Q} (Abb. 5.2 C). Dieses Ergebnis könnte auf einen dominant-negativen Effekt der *CBL*-Mutationen auf die EGFR-Ubiquitylierung hinweisen, der zusätzlich zu einem

Funktionsverlust von CBL wirken könnte. Des Weiteren wurden das Rohlysat und das Präzipitat mit anti-EGFR-Antikörpern auf die EGFR-Gesamtmenge überprüft. Übereinstimmend mit der Funktion von Ubiquitin als Markierung zum Proteinabbau (Swaminathan und Tsygankov 2006; Sorkin und Goh 2009), war die Gesamtmenge an EGFR in Zellen, welche funktionsfähiges CBL^{WT} exprimieren im Vergleich zu CBL^{C381A}-, CBL^{K382E}-, CBL^{D390Y}- und CBL^{R420Q}-exprimierenden Zellen sowohl im Rohlysat als auch im Präzipitat deutlich verringert (Abb. 5.2 A, Präzipitate und Rohlysate, 30 min, EGFR). In unstimulierten (0 min t_{EGF}) COS7-Zellen hingegen, wurde nach Transfektion mit den CBL^{C381A}-, CBL^{K382E}-, CBL^{D390Y}- oder CBL^{R420Q}-Konstrukten oder dem Leervektor (*mock*) kein signifikanter Unterschied zu CBL^{WT}-exprimierenden Zellen bezüglich der Ubiquitylierung des EGFR beobachtet (Abb. 5.2 B, Präzipitate, 0 min, Ubiquitin; ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt); lediglich eine sehr schwach erhöhte Ubiquitylierung lässt sich in CBL^{R420Q}-exprimierenden Zellen erahnen. Dementsprechend war auch die EGFR-Menge im Rohlysat und im Präzipitat zwischen den einzelnen CBL-Proteinvarianten relativ konstant (Abb. 5.2 B, Präzipitate und Rohlysate, 0 min, EGFR). Die in diesen Experimenten generierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die RASopathie-assoziierten CBL-Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von CBL stark herabsetzen, was sich zellphysiologisch insbesondere nach EGF-Stimulation auswirkt.

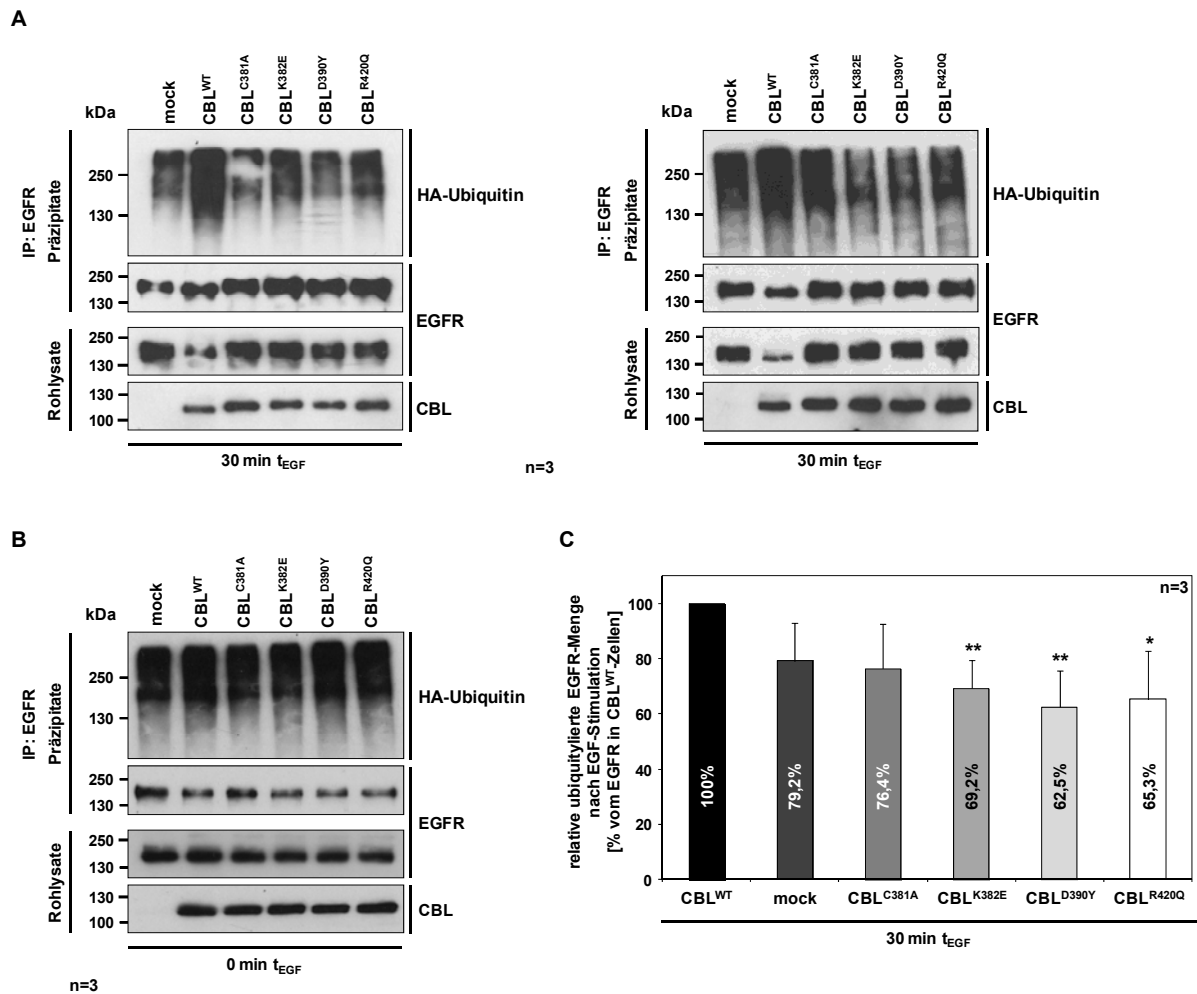


Abb. 5.2: Untersuchung der Ubiquitylierung des EGFR nach ektopischer Expression von verschiedenen CBL-Proteinvarianten in EGF-stimulierten und unstimulierten COS7-Zellen. COS7-Zellen wurden transient mit einem CBL-Expressionskonstrukt (CBL^{WT} , CBL^{C381A} , CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} oder CBL^{R420Q}) bzw. mit dem Leervektor (*mock*), sowie mit HA-Ubiquitin- und EGFR-Expressionskonstrukten kotransfiziert. Nach Serumzug über Nacht wurden die Zellen entweder mit 20 ng/ml EGF für 30 Minuten stimuliert (30 min t_{EGF}) (**A**) oder blieben unbehandelt (0 min t_{EGF}) (**B**). In (**A**) sind die Ergebnisse aus zwei Experimenten (aus $n=3$ unabhängigen Experimenten) nach 30 Minuten EGF-Stimulation und in (**B**) ist das repräsentative Ergebnis aus einem Experiment (aus $n=3$ unabhängigen Experimenten) ohne Stimulation gezeigt. Die Zellyse erfolgte jeweils in eiskaltem RIPA-Puffer, dem zur Inhibierung von deubiquitylierenden Enzymen 10 mM *N*-Ethylmaleinimid zugesetzt wurde. Die Präzipitation des EGFR erfolgte mit anti-EGFR-Antikörpern und Protein-A-Agarose. Die Rohlysate wurden schließlich nach Western-Blotting mittels Immundetektion mit anti-EGFR-Antikörpern (A, B; jeweils dritter Blot von oben) und die Präzipitate mit anti-HA- (A, B; jeweils oberster Blot) und anti-EGFR-Antikörpern (A, B; jeweils zweiter Blot von oben) analysiert. Die Expressionseffizienz der CBL-Proteinvarianten wurde im Rohlysat mit anti-CBL-Antikörpern (A, B; unterste Blots) überprüft. Die Molekulargewichte des mitgeführten Massenstandards sind auf der linken Seite, die jeweils detektierten Antigene rechts von den Blots angegeben. (**C**) Im Balkendiagramm sind die relativen Mengen (in %) an ubiquityliertem EGFR nach EGF-Stimulation (30 min t_{EGF}) als Mittelwerte mit Standardabweichungen (Fehlerbalken), berechnet aus drei unabhängigen Versuchen ($n=3$), dargestellt. Für die Berechnung wurde die densitometrisch ermittelte Menge an ubiquitylierten EGFR für CBL^{WT} -Zellen gleich 100% gesetzt. Einfaktorielle ANOVA zwischen Gruppen: $p < 0,05$. Post-Hoc p -Werte wurden mittels t-Test (zweiseitig, unabhängig) berechnet; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; IP, Immunpräzipitation; t_{EGF} , *time* EGF-Stimulation.

5.1.2 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener CBL-Proteinvarianten auf den EGFR-Abbau in COS7-Zellen

Die Ergebnisse aus Kapitel 5.1.1 zeigen, dass die RASopathie-assoziierten CBL-Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q eine verminderte Ubiquitylierung des EGFR verursachen. Wie in der Einleitung beschrieben, dient die Ubiquitylierung u. a. als Markierung für den EGFR-Abbau (Haglund und Dikic 2012). Übereinstimmend damit konnte im Vergleich zu CBL^{WT}-Zellen, nach Expression von CBL^{C381A}, CBL^{K382E}, CBL^{D390Y} oder CBL^{R420Q} eine erhöhte Menge an EGFR in den Lysaten festgestellt werden, was auf einen verminderten Abbau des EGFR nach EGF-Stimulation hindeutet (Kapitel 5.1.1). Daher sollten die Auswirkungen der CBL-Aminosäuresubstitutionen auf die EGFR-Degradierung näher untersucht werden. COS7-Zellen wurden mit den verschiedenen CBL-Expressionskonstrukten (CBL^{WT}, CBL^{C381A}, CBL^{K382E}, CBL^{D390Y} oder CBL^{R420Q}) bzw. dem Leervektor (*mock*) transfiziert und über Nacht unter Serumentzug kultiviert. Die Protein-Neusynthese wurde durch Inkubation der Zellen für 30 Minuten mit Cycloheximid geblockt. Sodann wurde in den Rohlysaten nach 60-, 120-, und 240-minütiger EGF-Stimulation mittels Immundetektion die EGFR-Gesamtmenge ermittelt. Als EGFR-Anfangsmenge wurde jeweils die EGFR-Gesamtmenge in unstimulierten Zellen bestimmt.

Die Überexpression von CBL^{WT} führte bereits nach 60-minütiger EGF-Stimulation zu einer starken Abnahme der zellulären EGFR-Gesamtmenge, welche dann über den weiteren Verlauf des Experiments konstant blieb (Abb. 5.3 A, Rohlysate, EGFR). Diese Beobachtung weist auf einen effektiven EGFR-Abbau in CBL^{WT}-Zellen hin. Im Gegensatz dazu nahm die EGFR-Gesamtmenge in *mock*-transfizierten Zellen im zeitlichen Verlauf nur sehr langsam ab, mit einer anfänglich schwachen Reduktion der EGFR-Gesamtmenge nach 60 Minuten EGF-Stimulation bis zu einer deutlichen Reduktion nach 240 Minuten EGF-Stimulation (Abb. 5.3 A, Rohlysate, EGFR). CBL^{K382E}-, CBL^{D390Y}- und CBL^{R420Q}-transfizierte COS7-Zellen zeigten eine ähnliche EGFR-Abbaukinetik wie *mock*-transfizierte Zellen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die humanpathogenen Aminosäuresubstitutionen in CBL zu einem Verlust der stimulierenden Wirkung von CBL auf den EGFR-Abbau führen. Interessanterweise scheint eine Expression von CBL^{C381A} den Abbau des EGFR in COS7-Zellen am effektivsten zu inhibieren, denn die EGFR-Gesamtmenge war nach 240 Minuten

EGF-Stimulation in diesen Zellen nur geringfügig vermindert (Abb. 5.3 A, Rohlysate, EGFR). Zur Quantifizierung und statistischen Auswertung wurden zusätzlich Ergebnisse aus Experimenten aus der Doktorarbeit von Dr. med. Hendrik Kentsch verwendet; Herr Kentsch arbeitete unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Georg Rosenberger am gleichen Projekt. Die densitometrische Quantifizierung von mehreren unabhängigen Experimenten (n) zeigte: Während eine Transfektion mit CBL^{WT} nach 60-minütiger EGF-Stimulation eine Reduktion der EGFR-Gesamtmenge auf 30,8% bewirkte, führte eine *mock*-Transfektion oder die Expression von CBL^{K382E} -, CBL^{D390Y} - und CBL^{R420Q} zu einer Abnahme der EGFR-Gesamtmenge auf 69,0%, 68,8%, 74,9% und 64,2% (Abb. 5.3 B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die stimulierende Wirkung von CBL auf die EGFR-Degradierung durch die krankheits-assoziierten Mutationen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q eingeschränkt wird; dies würde einem Funktionsverlust entsprechen. Dieser festgestellte Unterschied zwischen CBL-Mutanten- und CBL^{WT} -exprimierenden Zellen relativiert sich nach 240 Minuten EGF-Stimulation; an diesem Zeitpunkt wurde in CBL^{K382E} -, CBL^{D390Y} - und CBL^{R420Q} -exprimierenden und *mock*-transfizierten Zellen, eine ähnliche EGFR-Gesamtmenge wie in CBL^{WT} -Zellen detektiert (Abb. 5.3 B). Daraus kann geschlossen werden, dass der Abbau des EGFR durch die RASopathie-assoziierten Mutationen verzögert abläuft. Auffällig war, dass die zur Kontrolle analysierte CBL^{C381A} -Mutante den EGFR-Abbau am stärksten inhibiert. Nur 19% der EGFR-Gesamtmenge wurde nach 240-minütiger EGF-Stimulation abgebaut, was auf einen starken negativen Effekt der p.C381A-Mutation auf die Degradierung bzw. das *trafficking* des EGFR hinweisen könnte.

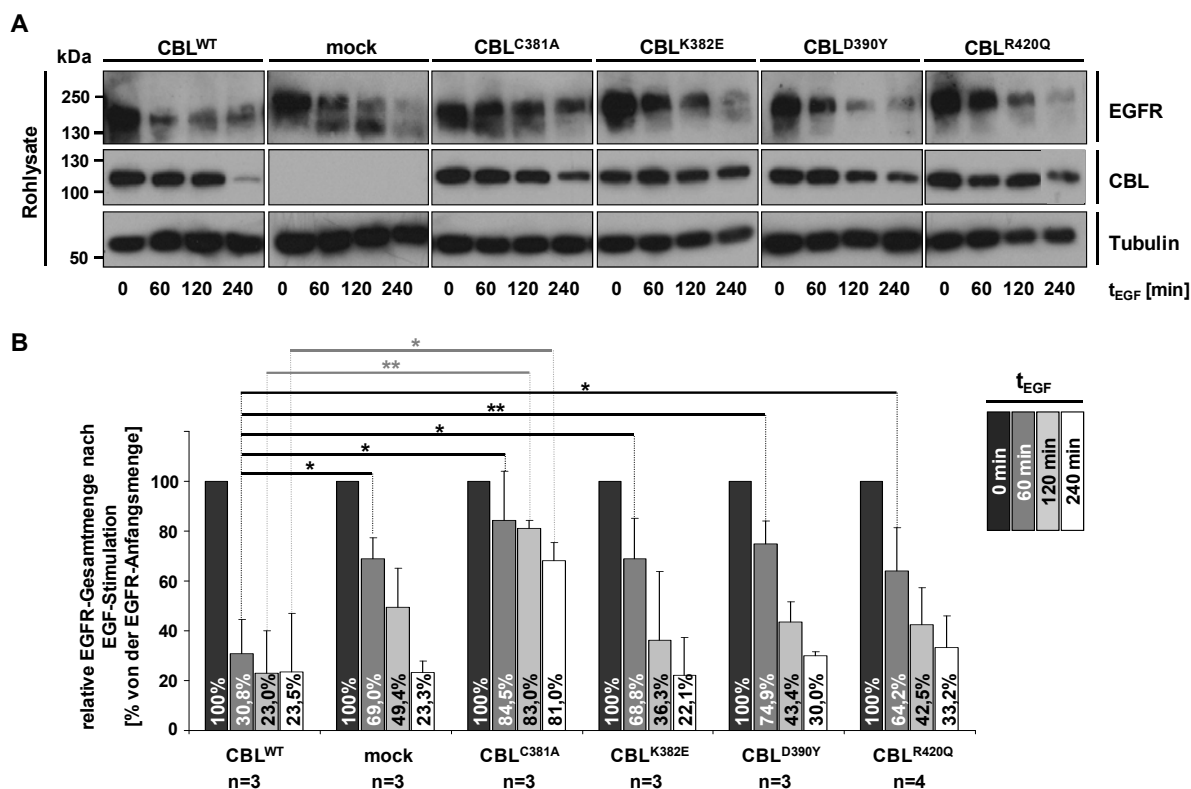


Abb. 5.3: Einfluss der ektopischen Expression von CBL-Proteinvarianten auf die EGFR-Degradierung in EGF-stimulierten COS7-Zellen. (A) COS7-Zellen wurden transient mit einem CBL-Expressionskonstrukt (CBL^{WT} , CBL^{C381A} , CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} oder CBL^{R420Q}) bzw. mit dem Leervektor (*mock*) transfiziert und über Nacht unter Serumentzug kultiviert. Um eine Protein-Neusynthese zu inhibieren, wurden die Zellen zunächst mit 10 μ g/ml Cycloheximid behandelt und anschließend für 60, 120 oder 240 Minuten mit 20 ng/ml EGF stimuliert (60, 120 oder 240 min t_{EGF}). Jeweils ein Ansatz blieb unstimuliert (0 min t_{EGF}). Die Immundetektion nach Western-Blotting erfolgte in den Rohlysaten mit anti-EGFR-Antikörpern (obere Blots). Als Ladekontrolle wurde die Menge an Tubulin detektiert (untere Blots). Die Überprüfung der Expressionseffizienz der CBL-Proteinvarianten erfolgte mittels anti-CBL-Antikörpern (mittlere Blots). Auf der linken Seite der Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards in kDa und auf der rechten Seite die jeweils dargestellten Proteine angegeben. **(B)** Densitometrische Quantifizierung der EGFR-Gesamtmenge nach EGF-Stimulation (0, 60, 120, 240 min t_{EGF}) in Prozent mit Standardabweichung vom Mittelwert (Fehlerbalken), berechnet aus jeweils mehreren unabhängigen Versuchen (n). Zur Berechnung wurde die Menge an EGFR auf die Tubulin-Menge normalisiert und für unstimulierte Zellen (0 min t_{EGF}) jeweils gleich 100% gesetzt. Einfaktorielle ANOVA zwischen Gruppen: $p_{60\text{min}} < 0,05$; $p_{120\text{min}} < 0,05$; $p_{240\text{min}} < 0,05$. Post-Hoc p -Werte wurden mittels t-Test (zweiseitig, unabhängig) berechnet; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

5.1.3 Bestimmung der Menge an Zellmembran-assoziiertem EGFR mittels Zelloberflächenbiotinylierung nach Expression verschiedener CBL-Proteinvarianten in COS7-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse weisen auf eine verminderte Ubiquitin-Ligase-Aktivität der RASopathie-assoziierten CBL-Mutanten CBL^{K382E}-, CBL^{D390Y}- und CBL^{R420Q} hin. Wie bereits einleitend erwähnt, vermittelt CBL via Ubiquitylierung nicht nur die Degradierung des EGFR, sondern auch eine Liganden-abhängige Internalisierung des Rezeptors (Sorkin und Goh 2009). Dies lässt vermuten, dass die CBL-Aminosäuresubstitutionen auch einen Einfluss auf die EGFR-Internalisierung haben könnten. Um dieser Annahme nachzugehen, sollte zunächst die Menge an Zellmembran-assoziiertem EGFR nach 30-minütiger EGF-Stimulation in COS7-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung ermittelt werden. Dazu wurden die Zellen mit den verschiedenen CBL-Expressionskonstrukten (CBL^{WT}, CBL^{C381A}, CBL^{K382E}, CBL^{D390Y} oder CBL^{R420Q}) bzw. mit dem Leervektor (*mock*) transfiziert und nach Serumentzug für 30 Minuten mit EGF stimuliert (30 min t_{EGF}). Ein Ansatz blieb jeweils unbehandelt (0 min t_{EGF}). Anschließend wurden die Zelloberflächenproteine bei 4°C mit einem nicht-membrangängigen Biotin-*crosslinker* markiert, die Zellen lysiert und die biotinylierten Proteine mittels Streptavidin-Agarose präzipitiert. Die Präzipitate wurden nach Western-Blotting mittels Immundetektion auf die Menge an Zellmembran-assoziierten EGF-Rezeptoren untersucht.

Die Auswertung der Western-Blots ergab, dass im Vergleich zu unstimulierten CBL^{WT}-exprimierenden Zellen (Abb. 5.4 A, Präzipitate, 0 min, EGFR), eine Stimulation mit EGF (Abb. 5.4 A, Präzipitate, 30 min, EGFR) zu einer deutlichen Abnahme der membranständigen EGFR-Menge führte. Im Gegensatz dazu konnte in CBL^{K382E}-, CBL^{D390Y}- und CBL^{R420Q}-exprimierenden Zellen oder in *mock*-transfizierten Zellen an der Zelloberfläche keine oder keine deutliche Abnahme der EGFR-Menge nach EGF-Stimulation detektiert werden (Abb. 5.4 A, Präzipitate, 0 min und 30 min, EGFR). Damit übereinstimmend verhinderte die zur Kontrolle untersuchte CBL^{C381A}-Mutante, für die bereits gezeigt wurde, dass sie die EGFR-Internalisierung vermindert (Waterman et al. 1999; Thien et al. 2001), ebenfalls eine signifikante Entfernung des EGFR von der Zelloberfläche (Abb. 5.4 A, Präzipitate, 0 min und 30 min, EGFR). Für die weitere Auswertung wurden zusätzlich Ergebnisse aus Experimenten aus der

Doktorarbeit von Dr. med. Hendrik Kentsch verwendet. Die densitometrische Quantifizierung mehrerer unabhängiger Experimente (n) zeigte schließlich, dass nach EGF-Stimulation in CBL^{WT} -exprimierenden COS7-Zellen nur 55,6% der anfänglichen EGFR-Menge (gemessen in unstimulierten Zellen) an der Zellmembran verblieben (Abb. 5.4 B). In Zellen, die eine der RASopathie-assoziierten CBL-Proteinvarianten überexprimieren oder mit dem Leervektor (*mock*) transfiziert wurden, konnte nach 30 Minuten EGF-Stimulation immerhin noch zwischen 73,8% und 88,1% der EGFR-Anfangsmenge an der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 5.4 B). Demnach scheint CBL^{WT} die EGF-induzierte EGFR-Internalisierung zu begünstigen, wohingegen die Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q sowie die bereits gut untersuchte RING-Finger-Mutation p.C381A diese Funktion zu beeinträchtigen scheinen. Auch wenn bei diesem Experiment kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen CBL^{WT} und den untersuchten CBL-Aminosäuresubstitutionen erreicht wurde, ist es offensichtlich, dass die untersuchten CBL-Mutationen eine Entfernung des EGFR von der Zelloberfläche negativ beeinflussen.

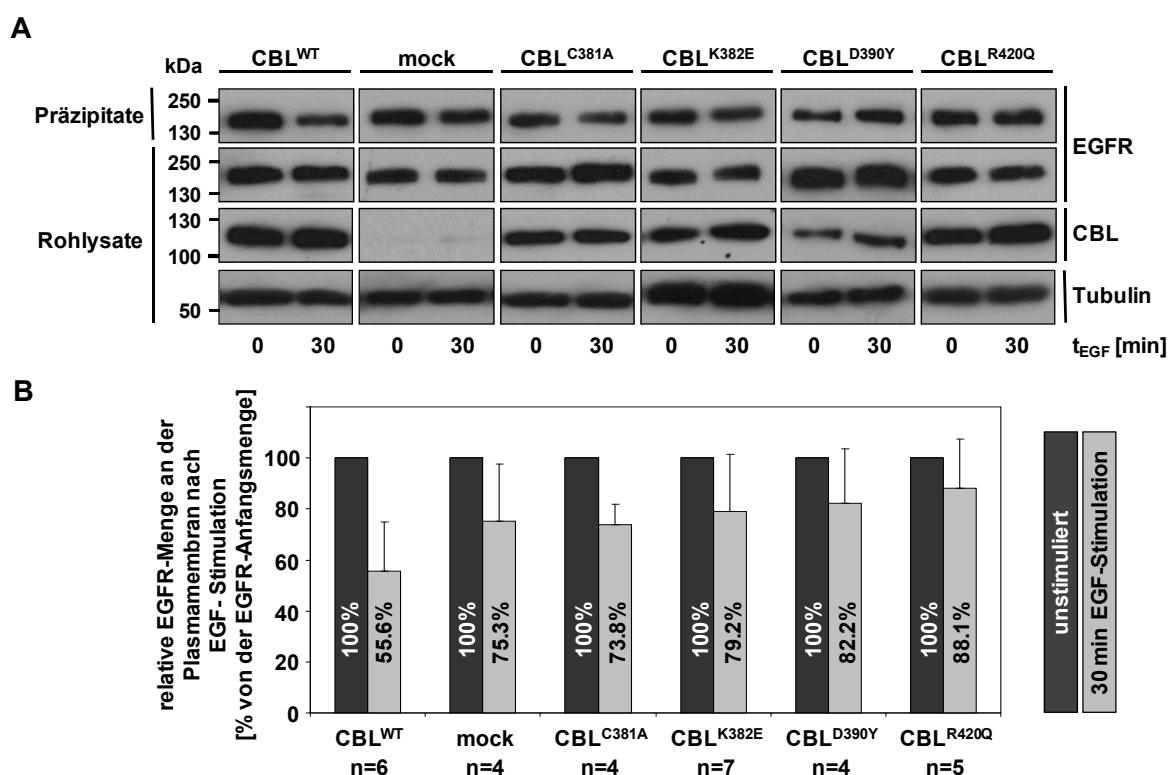


Abb. 5.4: Bestimmung des EGFR-Anteils an der Zelloberfläche nach ektopischer Expression der CBL-Proteinvarianten in COS7-Zellen. (A) COS7-Zellen wurden transient mit einem CBL-Expressionskonstrukt (CBL^{WT} , CBL^{C381A} , CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} oder CBL^{R420Q}) bzw. mit dem Leervektor

(*mock*) transfiziert. Nach Serumentzug über Nacht wurden die Zellen entweder mit 10 ng/ml EGF für 30 Minuten stimuliert (30 min t_{EGF}) oder blieben unbehandelt (0 min t_{EGF}). Es folgte die Zelloberflächenbiotinylierung, ein Waschschrift mit Glutathion-Puffer zur Entfernung von ungebundenem Biotin, die Lyse der Zellen und die Präzipitation der biotinylierten Oberflächenproteine mit Streptavidin-Agarose; alles auf 4°C. Rohlysate (jeweils zweiter Blot von oben) und Präzipitate (jeweils oberster Blot) wurden schließlich nach Western-Blotting mittels Immundetektion mit anti-EGFR-Antikörpern untersucht. Die CBL-Expressionseffizienz wurde mit anti-CBL-Antikörpern überprüft (jeweils dritter Blot von oben). Als Ladekontrolle wurde die Menge an Tubulin detektiert (jeweils unterster Blot). Auf der linken Seite der Blots sind die Molekulargewichte des mitgeführten Massenstandards aufgeführt. Die jeweils dargestellten Proteine sind rechts von den Blots angegeben. Die gezeigten Western-Blots stellen repräsentative Ergebnisse von jeweils mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen (n) dar. **(B)** Im Balkendiagramm sind die relativen EGFR-Mengen an der Zelloberfläche in Prozent als Mittelwerte mit Standardabweichungen (Fehlerbalken) für jeweils mehrere unabhängige Versuche (n) dargestellt. Zur Berechnung wurde die densitometrisch ermittelte Menge an oberflächen-ständigem EGFR (präzipitiertes EGFR) auf die EGFR-Gesamtmenge normalisiert und für unstimulierte Zellen gleich 100% gesetzt (0 min t_{EGF}). Einfaktorielle ANOVA zwischen Gruppen: $p > 0,05$ (nicht signifikant); ein Post-Hoc-Test wurde somit nicht durchgeführt.

5.1.4 Untersuchung der EGFR-Internalisierung in Abhängigkeit von verschiedenen CBL-Proteinvarianten in COS7-Zellen mittels Zelloberflächenbiotinylierung

Die in Kapitel 5.1.3 gezeigte Tendenz, dass Aminosäuresubstitutionen in CBL (p.K382E, p.D390Y und p.R420Q) das Entfernen von Zellmembran-assoziiertem EGFR vermindern, lässt eine beeinträchtigte Internalisierung des EGFR vermuten. Um dieser Überlegung experimentell nachzugehen, wurde die Liganden-induzierte EGFR-Internalisierung mittels Rezeptor-Biotinylierungsassays in COS7-Zellen überprüft. Dazu wurde die intrazelluläre EGFR-Menge in den verschiedene CBL-Proteinvarianten-exprimierenden Zellen nach EGF-Stimulation ermittelt. COS7-Zellen wurden transient mit CBL-Expressionskonstrukten (CBL^{WT} , CBL^{C381A} , CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} oder CBL^{R420Q}) bzw. mit dem Leervektor (*mock*) transfiziert und über Nacht unter Serumentzug kultiviert. Die Markierung von Zelloberflächenproteinen erfolgte durch Inkubation mit Biotin bei 4°C für 15 Minuten. Nachdem ungebundenes Biotin entfernt wurde, erfolgte eine Stimulation der EGFR-Internalisierung mit EGF für 5, 10 und 30 Minuten (5, 10 und 30 min t_{EGF}). Das an nicht-endozytierte Zelloberflächenproteine gebundene Biotin wurde durch einen Waschschrift mit reduzierendem Glutathion-Puffer entfernt. Zur methodischen Überprüfung dieses Schrittes blieb ein Ansatz unstimuliert (Daten nicht gezeigt). Nach der Zellyse wurden die biotinylierten Proteine mittels Streptavidin-Agarose präzipitiert und die Rohlysate und Präzipitate

wurden nach Western-Blotting mit Hilfe von anti-EGFR-Antikörpern immunologisch analysiert. Somit entsprechen die EGFR-Banden in den Rohlysaten der EGFR-Gesamtmenge und die EGFR-Banden in den Präzipitaten der Menge an internalisiertem EGFR (Abb. 5.5 A).

Nach EGF-Stimulation für 5 Minuten konnten in keinem der unterschiedlichen Ansätze von der Oberfläche internalisierte EGF-Rezeptoren nachgewiesen werden (Abb. 5.5 A, Präzipitate, 5 min, EGFR). Nach 10-minütiger EGF-Stimulation hingegen zeigte sich in allen Ansätzen, dass EGFR internalisiert wurde (Abb. 5.5 A, Präzipitate, 10 min, EGFR). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Menge an intrazellulärem EGFR zwischen den verschiedenen CBL-Proteinvarianten-exprimierenden Zellen nach 10-minütiger EGF-Stimulation nachgewiesen werden (Abb. 5.5 A, Präzipitate, 10 min, EGFR). Nach Stimulation mit EGF für 30 Minuten zeigten CBL^{WT}-exprimierende Zellen eine deutliche Erhöhung der intrazellulären EGFR-Menge, verglichen zu *mock*-transfizierten Zellen (Abb. 5.5 A, Präzipitate, 30 min, EGFR). Im Gegensatz dazu konnte in Zellen die eine der CBL-Mutanten (CBL^{K382E}, CBL^{D390Y}, CBL^{R420Q} oder CBL^{C381A}) exprimieren, nach 30-minütiger EGF-Stimulation im Vergleich zu *mock*-transfizierten Zellen eine etwas reduzierte Menge an internalisiertem EGFR detektiert werden (Abb. 5.5 A, Präzipitate, 30 min, EGFR; und Daten nicht gezeigt). Die quantitative Auswertung der Experimente nach 30-minütiger EGF-Stimulation mittels densitometrischen Messungen bestätigte die oben beschriebenen Beobachtungen (unter Berücksichtigung von Experimenten aus der Doktorarbeit von Dr. med. Hendrik Kentsch): Die RASopathie-assoziierten CBL-Aminosäuresubstitutionen führten zu einer signifikanten Reduktion der Liganden-induzierten EGFR-Internalisierung um 24,7-33% in Relation zu CBL^{WT} (Abb. 5.5 B). Die festgestellte intermediäre Effektivität der EGFR-Internalisierung nach Transfektion des Leervektors (*mock*), nämlich um etwa 15% reduziert im Vergleich zu CBL^{WT}-exprimierenden Zellen und ungefähr 15% erhöht im Vergleich zu CBL^{K382E}-, CBL^{D390Y}-, CBL^{R420Q}- und CBL^{C381A}-exprimierenden Zellen (Abb. 5.5 B), könnte darauf hinweisen, dass die RASopathie-assoziierten CBL-Mutationen neben einem Funktionsverlust noch einen zusätzlich dominant-negativen Effekt hinsichtlich der EGFR-Internalisierung bewirken.

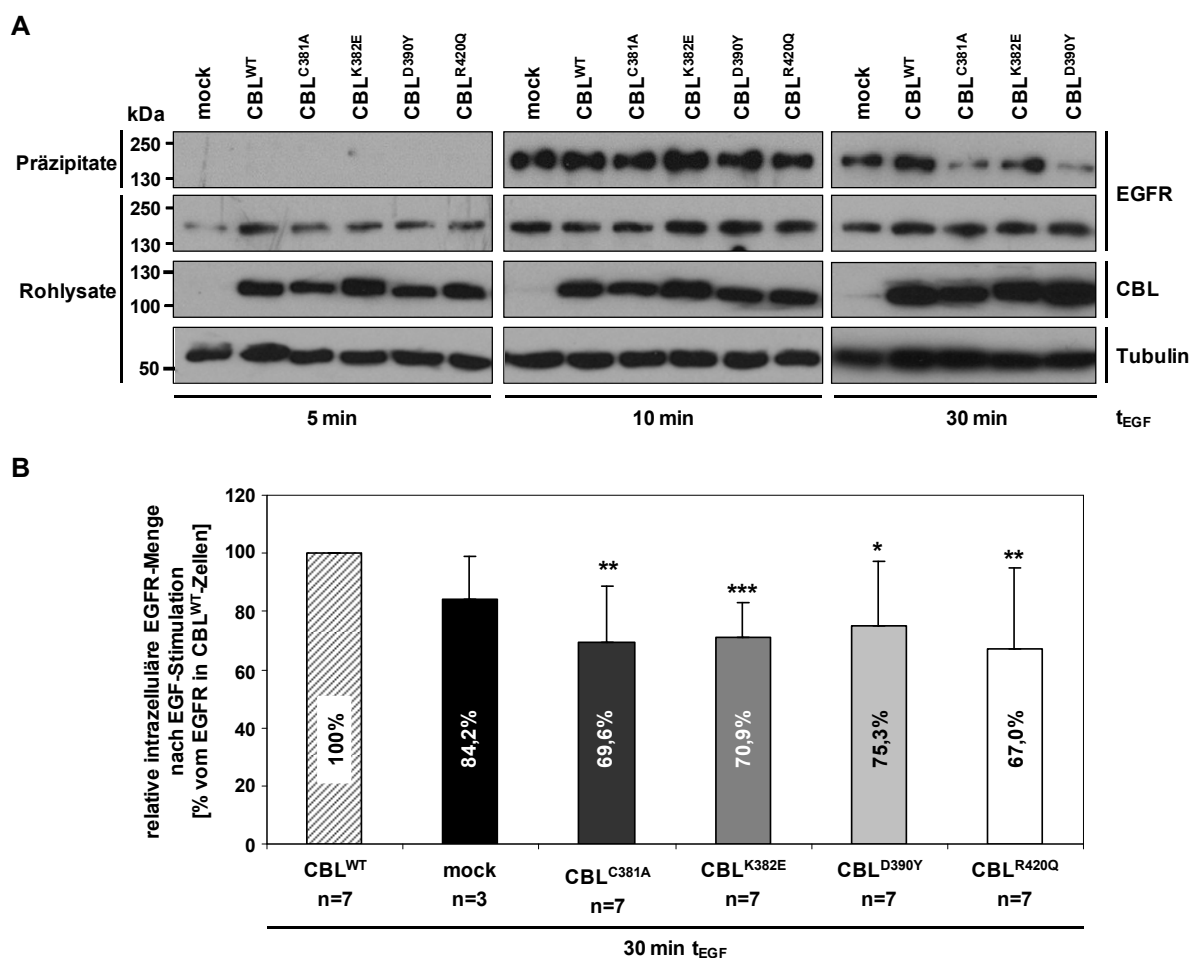


Abb. 5.5: Internalisierung des EGFR in COS7-Zellen nach Überexpression der verschiedenen CBL-Proteinvarianten. COS7-Zellen wurden transient mit einem CBL-Expressionskonstrukt (CBL^{WT}, CBL^{C381A}, CBL^{K382E}, CBL^{D390Y} oder CBL^{R420Q}) bzw. mit dem Leervektor (mock) transfiziert und über Nacht unter Serumentzug kultiviert. Am nächsten Tag folgten eine Biotinylierung der Oberflächenproteine und eine anschließende Stimulation der Zellen mit 10 ng/ml EGF für 5, 10 und 30 Minuten (5, 10 und 30 min t_{EGF}). Vor der Zellyse wurde das an Oberflächenproteine gebundene Biotin entfernt. Die Präzipitation der biotinylierten Proteine erfolgte mit Streptavidin-Agarose. Nach Western-Blotting folgte die Immundetektion von EGFR in den Rohlysaten (jeweils zweiter Blot von oben) und Präzipitaten (jeweils oberster Blot) mit anti-EGFR-Antikörpern. In den Rohlysaten wurde die Expression der CBL-Proteinvarianten mittels anti-CBL-Antikörpern überprüft (jeweils dritter Blot von oben) und als Ladekontrolle wurde mittels anti-Tubulin-Antikörpern die Menge an Tubulin dargestellt (jeweils unterster Blot). Auf der linken Seite der Blots sind die Molekulargewichte des mitgeführten Massenstandards in kDa und auf der rechten Seite die dargestellten Proteine aufgeführt. **(B)** Im Balkendiagramm sind die relativen internalisierten EGFR-Mengen (in %) nach EGF-Stimulation (30 min t_{EGF}) als Mittelwerte mit Standardabweichungen (Fehlerbalken), berechnet aus mehreren unabhängigen Versuchen (n), dargestellt. Zur Quantifizierung wurde die densitometrisch ermittelte Menge an internalisiertem EGFR auf die EGFR-Gesamtmenge normalisiert und CBL^{WT} nach 30 Minuten EGF-Stimulation gleich 100% gesetzt. Einfaktorielle ANOVA zwischen Gruppen: $p < 0,05$. Die Post-Hoc p -Werte wurden mittels t-Test (zweiseitig, unabhängig) berechnet; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

5.1.5 Einfluss der CBL-Aminosäuresubstitutionen auf die Rezeptor-vermittelte Internalisierung von fluoreszenz-markiertem epidermalem Wachstumsfaktor in COS7-Zellen

Um den in Kapitel 5.1.4 biochemisch ermittelten Einfluss der CBL-Aminosäuresubstitutionen auf die Internalisierung des EGFR in COS7-Zellen immunzytochemisch zu verifizieren, wurden COS7-Zellen mit den verschiedenen CBL-Expressionskonstrukten (CBL^{WT} , CBL^{C381A} , CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} oder CBL^{R420Q}) transfiziert und nach Serumentzug für 30 Minuten mit Alexa Fluor[®] 488-konjugiertem EGF (EGF488) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen CBL und einem fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Da für dieses Experiment ein anti-CBL-Antikörper verwendet wurde, der sowohl ektopisch exprimiertes, als auch endogenes CBL-Protein detektiert, können nicht transfizierte Zellen und Zellen mit einem sehr geringen endogenem CBL-Expressionslevel nicht unterschieden werden; daher wurden beide als Kontrollzellen betrachtet. Für die Auswertung der Präparate wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (*confocal laser scanning microscope*; cLSM) Leica *DMIRE2* verwendet.

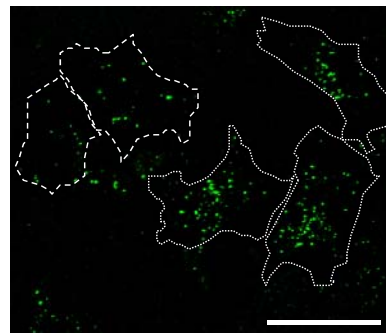
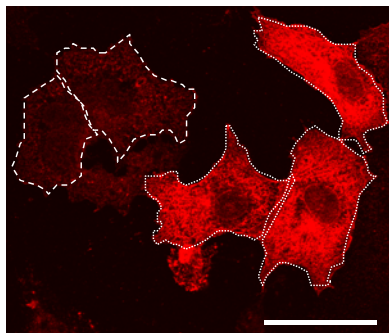
Im Vergleich zu Kontrollzellen auf derselben Probe (Abb. 5.6 A, gestrichelte Linie), führte die starke Expression von CBL^{WT} (Abb. 5.6 A, CBL, rot, gepunktete Linie) zu einer erhöhten intrazellulären EGF488-Menge (Abb. 5.6 A, EGF488, grün, gepunktete Linie). Im Gegensatz dazu wurde in Zellen, die CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} , CBL^{R420Q} oder CBL^{C381A} stark überexprimieren (Abb. 5.6 A, CBL, rot, gepunktete Linie), eine geringere intrazelluläre EGF488-Menge detektiert (Abb. 5.6 A, EGF488, grün, gepunktete Linie) als in Kontrollzellen auf derselben Probe (Abb. 5.6 A, gestrichelte Linie). Um diese Beobachtungen quantitativ zu bestätigen, wurden Probenausschnitte mit identischer Vergrößerung und Laser-Stärke aufgenommen und die Menge an EGF488 auf die jeweilige Zellgröße normalisiert. Die Quantifizierung der Immunfluoreszenzbilder erfolgte unter Anwendung der *ImageJ-Software*.

A

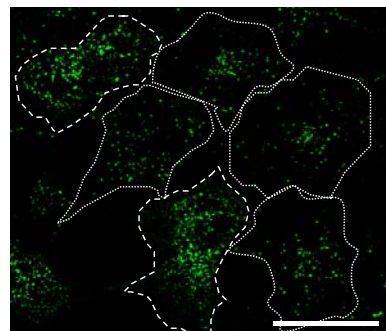
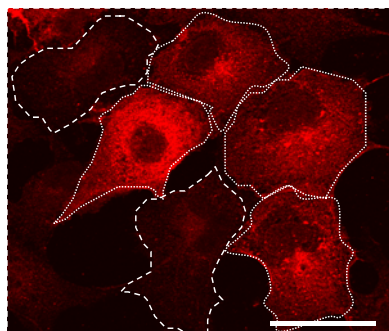
anti-CBL

EGF488

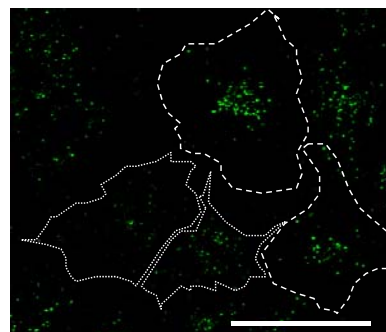
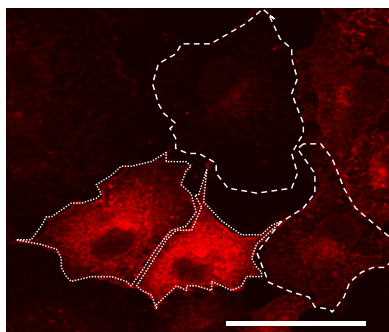
CBL^{WT}



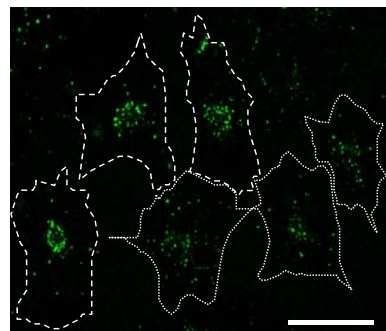
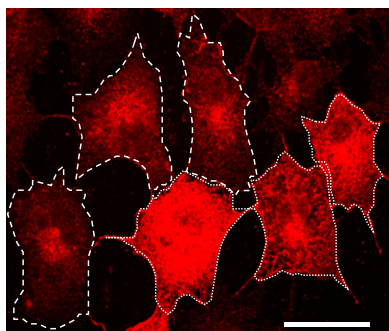
CBL^{C381A}



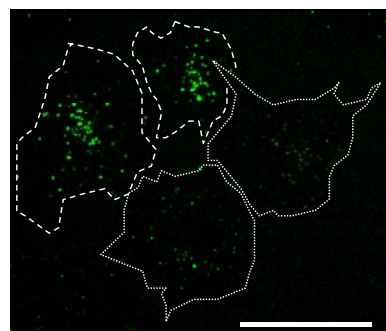
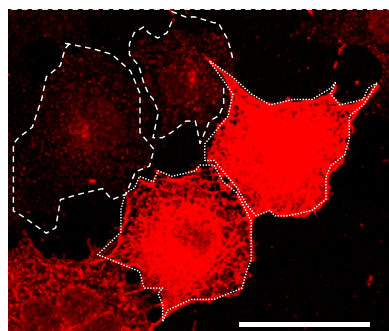
CBL^{K382E}



CBL^{D390Y}



CBL^{R420Q}



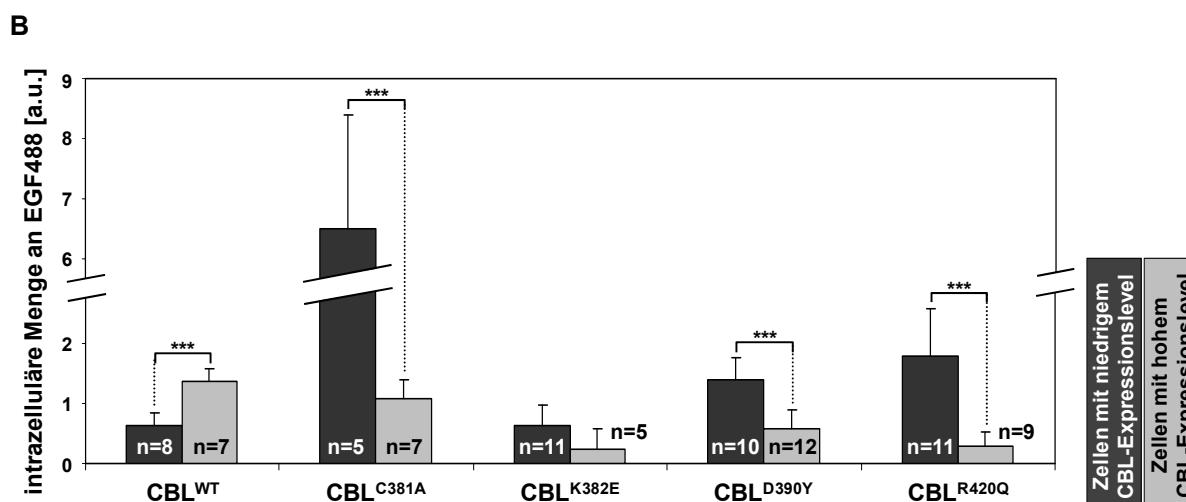


Abb. 5.6: Internalisierung von fluoreszenz-markiertem EGF in COS7-Zellen nach Überexpression der verschiedenen CBL-Proteinvarianten. (A) COS7-Zellen wurden transient mit einem CBL-Expressionskonstrukt (CBL^{WT} , CBL^{C381A} , CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} bzw. CBL^{R420Q}) transfiziert. Nach Serumentzug über Nacht wurden die Zellen für 30 Minuten mit 100 ng/ml Alexa Fluor® 488-konjugiertem EGF (EGF488, grün) stimuliert und anschließend für die Immunfluoreszenzanalyse fixiert. Endogenes und ektopisch exprimiertes CBL wurde mit Hilfe von anti-CBL-Antikörpern, gefolgt von Alexa Fluor® 546-gekoppelten Sekundäntikörpern visualisiert (CBL, rot). Gepunktete Linien markieren Zellen mit hohem CBL-Expressionslevel, gestrichelte Linien Zellen mit endogenem CBL bzw. schwachem ektopischem CBL-Expressionslevel. Die Immunfluoreszenzpräparate wurden an dem cLSM (*confocal laser scanning microscope*) DMIRE2 von Leica ausgewertet. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 48 μm . (B) Die Menge an intrazellulärem EGF wurde anhand von, mit der gleichen Vergrößerung und Laserintensität erstellten, Originalaufnahmen mittels *ImageJ-Software* quantifiziert. Um Zell-Größen-Effekte auszuschließen, wurde jeweils die intrazelluläre EGF488-Menge auf die Fläche der Zelle normalisiert. Das Balkendiagramm zeigt die Menge an intrazellulärem EGF488 nach EGF-Stimulation (30 min t_{EGF}) in *arbitrary units* (a. u.) als Mittelwerte mit Standardabweichungen (Fehlerbalken). Die Anzahl der jeweils ausgewerteten Zellen ist mit n angegeben. Die p -Werte wurden mittels t-Test (zweiseitig, unabhängig) berechnet; ***, $p < 0,001$.

Das Balkendiagramm zeigt, dass im Vergleich zu den CBL schwach exprimierenden Kontrollzellen, die intrazelluläre EGF488-Menge in CBL^{WT} -exprimierende Zellen signifikant erhöht ist (Abb. 5.6 B). Konträr dazu verringert sich das EGF488-Level in der Zelle bei starker ektopischer Expression einer RASopathie-assoziierten CBL-Proteinvariante (CBL^{D390Y} bzw. CBL^{R420Q}) oder der RING-Finger-Mutante CBL^{C381A} signifikant (Abb. 5.6 B). Lediglich für die CBL^{K382E} -Proteinvariante konnte keine signifikante Verminderung der intrazellulären EGF488-Menge, jedoch zumindest eine Tendenz in diese Richtung, detektiert werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 5.1.4 deuten diese Daten darauf hin, dass die CBL-Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q die relative Verteilung des EGFR zwischen

Zelloberfläche und Zellinnerem verändern, was auf eine beeinträchtigte EGFR-Internalisierung zurückzuführen sein könnte.

5.1.6 Analyse der Auswirkungen von verschiedenen CBL-Proteinvarianten auf die EGF-induzierte Aktivierung von ERK-Kinasen in COS7-Zellen

Derzeit gilt bei RASopathien die Hyperstimulation der RAS-MAPK-Signalkaskade als Hauptpathomechanismus (Aoki et al. 2008). Um zu klären, ob auch die mit RASopathien assoziierten CBL-Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q zu einer Hyperstimulation dieses Signalwegs führen, sollte die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der ERK-Kinasen untersucht werden. Dazu wurden COS7-Zellen mit den verschiedenen CBL-Expressionskonstrukten (CBL^{WT} , CBL^{C381A} , CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} oder CBL^{R420Q}) bzw. mit dem Leervektor (*mock*) transfiziert und nach Serumentzug für 10, 30 und 60 Minuten mit 20 ng/ml EGF stimuliert (10, 30 und 60 min t_{EGF}). Zur Kontrolle blieb jeweils eine Zellpopulation unstimuliert (0 min t_{EGF}). Nach der Zellyse erfolgte die Analyse der Rohlysate mittels Western-Blotting und Immundetektion mit Antikörpern gegen ERK sowie gegen phospho-ERK (pERK) (Abb. 5.7 A).

Zwischen CBL^{WT} - und CBL^{C381A} -, CBL^{K382E} -, CBL^{D390Y} - oder CBL^{R420Q} -exprimierenden Zellen wurden nach 10- und 30-minütiger Stimulation mit EGF keine Unterschiede in der ERK-Phosphorylierung detektiert werden (Abb. 5.7 A, 10 min und 30 min, pERK). Auch die *mock*-transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zu CBL^{WT} -exprimierenden Zellen nach EGF-Stimulation für 10 und 30 Minuten keinen Unterschied in der Menge an phosphoryliertem ERK (Abb. 5.7 A, 10 min und 30 min, pERK). In unstimulierten Zellen konnte im Vergleich zu CBL^{WT} nur für CBL^{R420Q} mehr phosphoryliertes ERK beobachtet werden (Abb. 5.7 A, 0 min, pERK). Nach 60-minütiger EGF-Stimulation hingegen konnte verglichen mit CBL^{WT} -exprimierenden Zellen, sowohl in den CBL^{C381A} -, CBL^{K382E} -, CBL^{D390Y} - oder CBL^{R420Q} -, als auch in *mock*-transfizierten Zellen eine erhöhte ERK-Phosphorylierung detektiert werden

(Abb. 5.7 A, 60 min, pERK). Die Quantifizierung der Blots mittels densitometrischer Messungen bestätigte diese Beobachtungen.

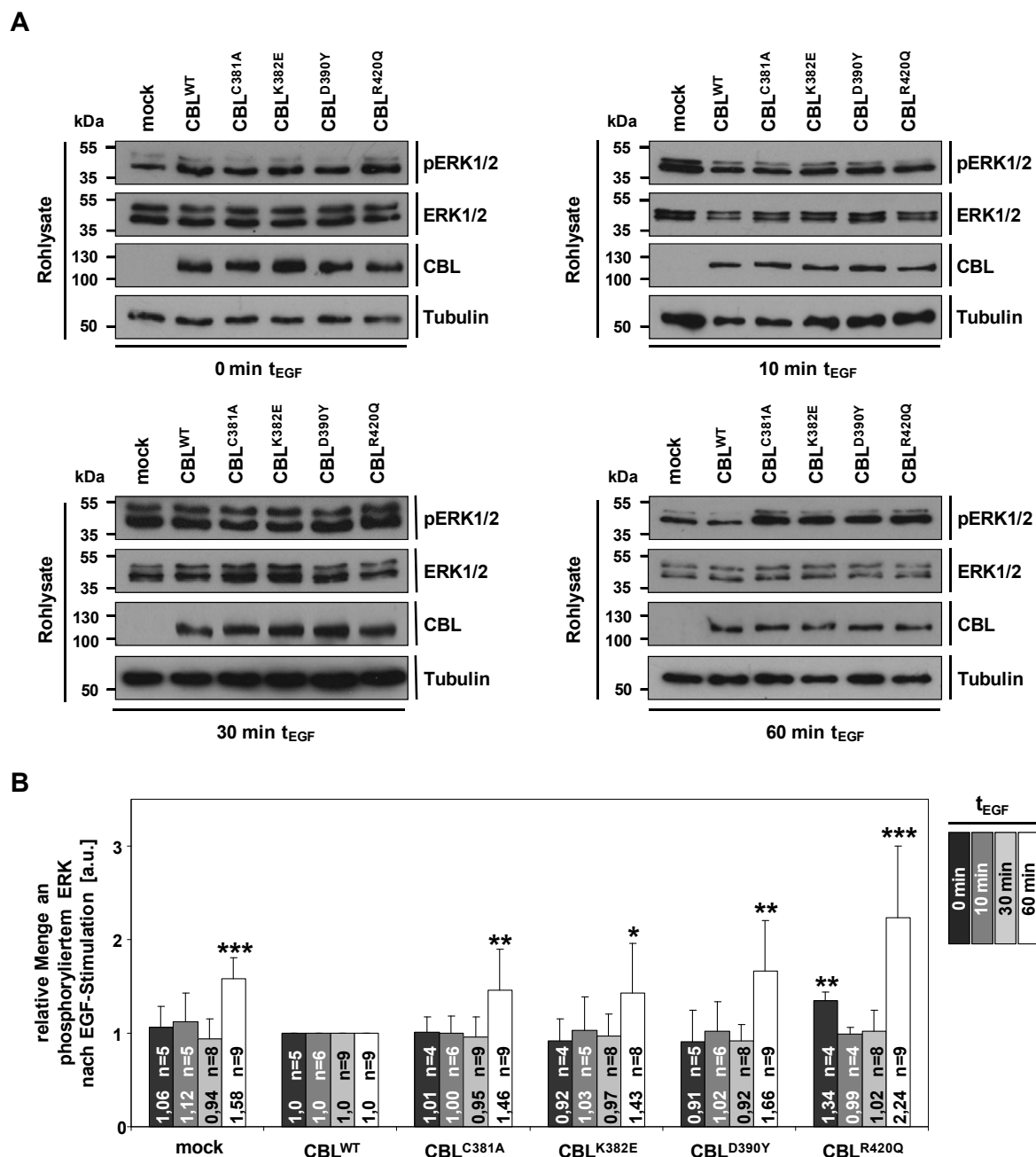


Abb. 5.7: Bestimmung der ERK-Phosphorylierung nach Expression verschiedener CBL-Proteinvarianten in unstimulierten und EGF-stimulierten COS7-Zellen. (A) COS7-Zellen wurden transient mit einem CBL-Expressionskonstrukte (CBL^{WT} , CBL^{C381A} , CBL^{K382E} , CBL^{D390Y} oder CBL^{R420Q}) bzw. mit dem Leervektor (*mock*) transfiziert und über Nacht unter Serumentzug kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 10, 30 oder 60 Minuten mit 20 ng/ml EGF (10, 30 und 60 min t_{EGF}) stimuliert oder blieben unbehandelt (0 min t_{EGF}). Es folgte die Zelllyse für die Immundetektion. Die Detektion der phosphorylierten ERK-Menge erfolgte nach Western-Blotting in den Rohlysaten mit Hilfe von anti-pERK-Antikörpern (jeweils oberster Blot). Die Gesamtproteinmenge von ERK wurde durch Verwendung von anti-ERK-Antikörpern detektiert (jeweils zweiter Blot von oben). Die Kontrolle der

Expressionseffizienz für die CBL-Proteinvarianten erfolgte mit Hilfe von anti-CBL-Antikörpern (jeweils dritter Blot von oben). Zur Ladekontrolle wurde Tubulin immunodetektiert (jeweils unterster Blot). Auf der linken Seite der Blots sind die Molekulargewichte des mitgeführten Massenstandards in kDa und auf der rechten Seite die dargestellten Proteine angeführt. **(B)** Im Balkendiagramm sind die relativen phosphorylierten Mengen der ERK-Kinasen nach 0, 10, 30 und 60 Minuten EGF-Stimulation (0, 10, 30, 60 min t_{EGF}) in *arbitrary units* (a.u.) als Mittelwerte mit Standardabweichungen (Fehlerbalken) dargestellt. Zur Berechnung wurde die densitometrisch ermittelte Menge an phosphoryliertem ERK auf die ERK-Gesamtmenge normalisiert und für CBL^{WT} gleich 1 gesetzt. Einfaktorielle ANOVA zwischen Gruppen: $p < 0,05$. Post-Hoc p -Werte wurden mittels t-Test (zweiseitig, unabhängig) berechnet; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Nach EGF-Stimulation für 10 und 30 Minuten wurden keine signifikanten Unterschiede in der ERK-Phosphorylierung eruiert (Abb. 5.7 B), im unstimulierten Zustand konnte in CBL^{R420Q}-exprimierenden Zellen, verglichen mit CBL^{WT}-transfuzierten Zellen, eine signifikante Erhöhung der Menge an phosphoryliertem ERK beobachtet werden (Abb. 5.7 B). Nach 60-minütiger EGF-Stimulation hingegen ergab die Quantifizierung eine 1,43- bis 2,24-fache Erhöhung der ERK-Phosphorylierung für CBL-Mutanten exprimierende bzw. mit dem Leervektor (*mock*) transfuzierte Zellen, jeweils in Relation zu CBL^{WT}-exprimierenden Zellen berechnet (Abb. 5.7 B). Die erhöhte ERK-Phosphorylierung ist für alle CBL-Proteinvarianten statistisch signifikant. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die RASopathie-assoziierten CBL-Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q die Funktion von CBL als negativer Regulator des RAS-MAPK-Signalwegs beeinträchtigen, was zur Hyperstimulation dieser Signalkaskade führt.

5.2 Analysen zur Funktion von RRAS bei der Regulation von Integrinen

Keimbahnmutationen im *RRAS*-Gen verursachen einen zum Noonan-Syndrom ähnlichen Phänotyp; auf Proteinebene führen die beiden beschriebenen Mutanten $RRAS^{G39dup}$ und $RRAS^{V55M}$ zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK und MEK (Flex et al. 2014). Im Rahmen von Vorarbeiten in den Arbeitsgruppen von Professor Dr. Kerstin Kutsche und Priv.-Doz. Dr. Georg Rosenberger konnten in einer mutationsnegativen RASopathie-Patientenkohorte ebenfalls Mutationen im *RRAS*-Gen identifiziert werden. Erste Untersuchungen weisen auf funktionelle Konsequenzen der entsprechenden *RRAS*-Proteinvarianten ($RRAS^{D59H}$, $RRAS^{P153L}$ und $RRAS^{S158Ffs*76}$; Abb. 5.8) hin, welche von negativen Effekten, wie z. B. von $RRAS^{S158Ffs*76}$ auf die *RRAS*-Aktivierung, bis hin zu stark stimulierenden Eigenschaften, wie z. B. von $RRAS^{D59H}$ auf die Bildung von fokalen Adhäsionen, reichen (Daten nicht gezeigt). Zwar ist bekannt, dass *RRAS* Integrine aktivieren und die Komposition bzw. Dynamik von FAs regulieren kann (Kinbara et al. 2003; Furuholm und Peränen 2003, Zhang et al. 1996, 1996), die molekularen Zusammenhänge sind allerdings noch unerforscht. Um die funktionellen Konsequenzen der identifizierten humanpathogenen *RRAS*-Mutationen detailliert untersuchen zu können, müssen diese Zusammenhänge erst aufgeklärt werden. Daher war das zentrale Ziel im zweiten Teil dieser Arbeit die molekular-mechanistische Aufklärung der *RRAS*-abhängigen Regulation von Integrinen und FAs. Für die experimentellen Analysen wurden neben dem *RRAS*-Wildtyp-Protein ($RRAS^{WT}$) auch eine dominant negative ($RRAS^{S43N}$) und eine konstitutiv aktive ($RRAS^{G38V}$) *RRAS*-Proteinvariante eingesetzt (Abb. 5.8) (Spaargaren und Bischoff 1994). $RRAS^{G38V}$ spricht nicht auf GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) an, die Hydrolyse von *RRAS*-gebundenem GTP zu GDP findet nicht statt und es kommt zu einer dauerhaften Aktivierung von *RRAS*. Im Gegensatz dazu hat $RRAS^{S43N}$ konstitutiv GDP gebunden und bildet inaktive Komplexe mit GEFs; diese Sequestrierung von GEFs führt gesamtzellulär zu einem dominant-negativen Effekt (Spaargaren et al. 1994; Huff et al. 1997). Zur Durchführung der funktionellen Analysen wurden zur ektopischen Expression der beschriebenen *RRAS*-

Proteinvarianten während dieser Arbeit die folgenden HA (Hämagglutinin)- und Flag-fusionierten *RRAS*-Expressionskonstrukte generiert: pMT2SM-HA-*RRAS*^{WT}, -*RRAS*^{G38V} und -*RRAS*^{S43N} sowie pFLAG-CMV-4-DEST-*RRAS*^{WT}, -*RRAS*^{G38V} und -*RRAS*^{S43N}. Des Weiteren wurden CHO-Zelllinien hergestellt, die jeweils stabil die HA-fusionierten *RRAS*-Proteinvarianten (HA-*RRAS*^{WT}, HA-*RRAS*^{G38V} und HA-*RRAS*^{S43N}) überexprimieren. Stabil V5-*RRAS*^{WT}-, V5-*RRAS*^{G38V}- und V5-*RRAS*^{S43N}-exprimierende CHO-Zellen wurden bereits in Vorarbeiten zu dieser Arbeit generiert. Der Vorteil von stabil exprimierenden Zelllinien liegt darin, dass jede Zelle die jeweilige *RRAS*-Proteinvariante überexprimiert. Die Abbildung 5.8 zeigt die Lokalisation der in *RRAS* veränderten Aminosäuren.

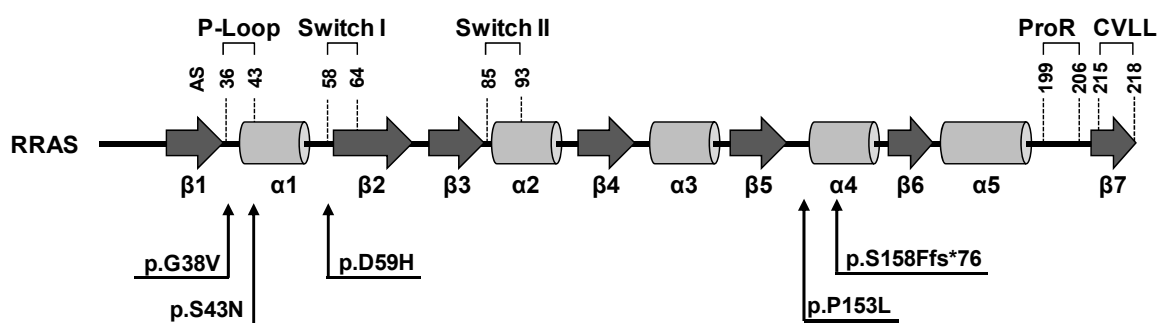


Abb. 5.8: Schematische Darstellung des *RRAS*-Proteins mit den in dieser Arbeit analysierten Aminosäuresubstitutionen sowie den humanpathogenen Mutationen. Die *RRAS*-Proteinsekundärstruktur ist mit α -Helices als Zylinder und β -Faltblättern als Pfeile dargestellt. Die Bezeichnungen der wichtigsten funktionellen Proteinregionen von *RRAS* sind über der Sekundärstruktur angegeben. Die Positionen der untersuchten konstitutiv aktiven Mutante p.G38V und der dominant negativen Mutante p.S43N sowie der drei humanpathogenen Mutationen p.D59H, p.P153L und p.S158Ffs*76 sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die G38V- und die S43N-Mutationen liegen beide in der P-Loop, die p.D59H-Mutation befindet sich in der Switch I-Region, die p.P153L-Mutation in einer *coil*-Region und die p.S158Ffs*76-Mutation in der α 4-Helix. Letztere führt zu einer Leserasterverschiebung und somit zu einer vollständig neuen COOH-terminalen Sequenz (Sequenz nicht gezeigt). P-Loop: *phosphate-binding loop*; Switch I; Switch II; ProR: *proline-rich region*; CVLL (Cystein-Valin-Leucin-Leucin); AS 215-118; AS, Aminosäuren.

5.2.1 Überprüfung einer möglichen Integrin-vermittelten Aktivierung von *RRAS* mittels GTPase-Pull-Down in stabil *RRAS*^{WT}-exprimierenden CHO-Zellen

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass *RRAS*-abhängige Signalwege zur Integrin-Aktivierung führen, was ein Beispiel für das *inside-out-signaling* ist (Kinbara et al. 2003; Zhang et al. 1996). Um zu überprüfen ob eine EZM-Stimulation der

Integrine in Form eines *outside-in-signaling* zu einer RRAS-Aktivierung führt, sollte die Menge an aktivem RRAS nach Integrin-Stimulation mit Hilfe von GTPase-*Pull-Down*-Experimenten bestimmt werden. Bei diesem Verfahren bedient man sich der Tatsache, dass RRAS nur im aktiven Zustand (GTP-gebunden) mit dessen Effektorprotein PI3K interagiert und so den PI3K-AKT-Signalweg aktiviert (Marte et al. 1997; Self et al. 2001). So kann nach Zugabe von bakteriell aufgereinigten und mit Glutathion-S-Transferase (GST)-fusionierten RAS-Bindedomänen (RBD) von PI3K, aktiviertes RRAS aus dem Zelllysate mit Glutathion-Sepharose präzipitiert und anschließend im Präzipitat nachgewiesen werden. Für dieses Experiment wurden die stabil transfizierten V5-RRAS^{WT}-CHO-Zellen genutzt. Zur Untersuchung der Integrin-vermittelten RRAS-Aktivierung wurden serumentzogene RRAS^{WT}-CHO-Zellen mit 3 µg/ml gelöstem Fibronectin (eine Komponente der EZM) für 45 min bei 37°C stimuliert und anschließend lysiert. Die Zelllysate wurden mit dem Fusionsprotein GST-PI3K[RBD] inkubiert und aktives RRAS mittels Glutathion-Kügelchen präzipitiert. Rohlysate und Präzipitate wurden nach Western-Blotting mittels Immundetektion unter Verwendung von anti-V5-Antikörpern untersucht. In Abb. 5.9 A sind die Western-Blots von einem aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt. Die RRAS-Gesamtmenge wird aus den Rohlysaten und die Menge an aktivem RRAS aus den Präzipitaten ersichtlich.

RRAS^{WT} konnte in allen Rohlysaten nachgewiesen werden (Abb. 5.9 A, Rohlysate, gesamtes RRAS). Nach Stimulation mit Fibronectin konnte in RRAS^{WT}-CHO-Zellen deutlich mehr aktives RRAS nachgewiesen werden als in unstimulierten Zellen (Abb. 5.9 A, oberster Blot, Präzipitate, aktives RRAS). Die quantitative Auswertung der zwei durchgeführten Experimente bestätigte diese Beobachtung: Nach Fibronectin-Stimulation konnte in RRAS^{WT}-CHO-Zellen die 2,7-fache Menge an aktivem RRAS im Vergleich zu unstimulierten RRAS^{WT}-CHO-Zellen gemessen werden (Abb. 5.9 B). Aufgrund der zu niedrigen Stichprobenmenge erfolgte keine statistische Auswertung der ermittelten Werte. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass RRAS^{WT} durch Stimulation der Integrine mit Fibronectin aktiviert wird; was somit auf eine Integrin-vermittelte RRAS-Aktivierung im Sinne eines *outside-in-signaling* schließen lässt.

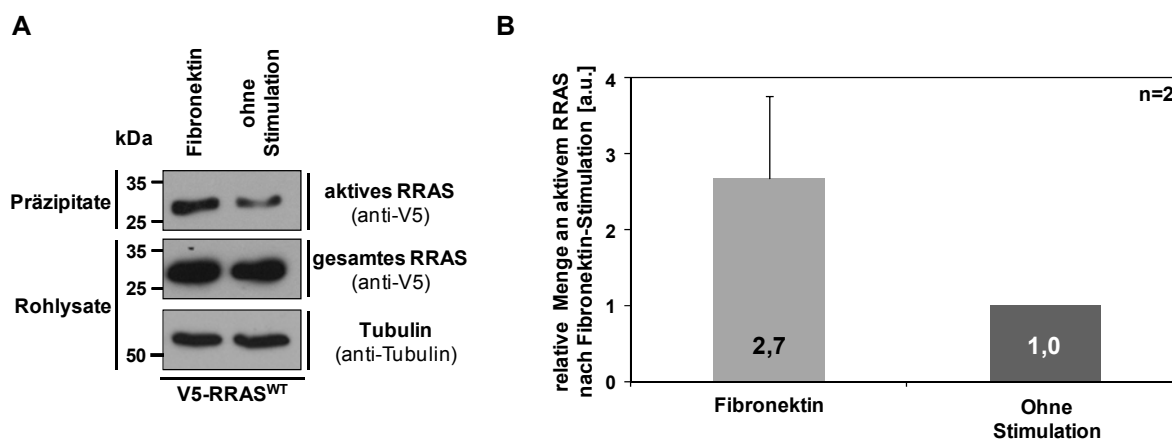


Abb. 5.9: Bestimmung der Menge an aktivem RRAS in RRAS^{WT}-CHO-Zellen nach Stimulation mit Fibronektin. (A) Nach Serumzug über Nacht wurden die RRAS^{WT}-CHO-Zellen mit 3 µg/ml Fibronektin für 45 Minuten bei 37° C stimuliert. Nach der Zellyse wurde aktives (GTP-gebundenes) RRAS mit Hilfe des GST-PI3K[RBD]-Fusionsproteins präzipitiert. Rohlysate (mittlerer Blot) und Präzipitate (oberer Blot) wurden nach Western-Blotting mittels Immundetektion mit anti-V5-Antikörpern analysiert. Die RRAS-Gesamtmenge ist in den Rohlysaten ersichtlich, die Menge an aktivem RRAS in den Präzipitaten. Auf der linken Seite der Blots sind die Molekulargewichte des mitgeführten Massenstandards in kDa, auf der rechten Seite die verwendeten Antikörper sowie die dargestellten Proteine aufgeführt. Im unteren Blot ist die Menge an Tubulin, das als Ladekontrolle eingesetzt wurde, gezeigt. (B) Das Balkendiagramm zeigt die relative Menge an aktivem RRAS nach Stimulation mit Fibronektin als Mittelwerte mit Standardabweichungen (Fehlerbalken) in *arbitrary units* (a. u.). Zur Berechnung wurde die densitometrisch ermittelte Menge an aktivem RRAS (präzipitiertes RRAS) auf die RRAS-Gesamtmenge normalisiert und für unstimulierte Zellen gleich 1 gesetzt.

5.2.2 Suche nach RRAS-Bindepartnern

Zur Identifikation von potentiellen RRAS Protein-Protein-Bindepartnern, die am Informationsfluss und/oder an der strukturellen Integrität von Integrin-haltigen fokalen Kontaktstellen beteiligt sein könnten, sollten diese aus dem Zellysat mit RRAS koimmunpräzipitiert werden. Die Präzipitate sollten sodann mit Coomassie[®] gefärbt und auffällige Banden mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Bei einer Koimmunpräzipitation (KoIP) nutzt man aus, dass ein Antikörper einerseits spezifisch an sein Antigen bindet und andererseits über seine F_c-Region an spezielle Agarosekügelchen binden kann, über welche das Antigen (Protein) spezifisch aus einem Zellysat präzipitiert werden kann. Unter den richtigen Pufferbedingungen lässt sich ein mit dem präzipitierten Protein interagierendes Protein kopräzipitieren und anschließend im Polyacrylamidgel (PAA-Gel) durch Coomassie[®]-Färbung oder nach Western-Blotting mit spezifischen Antikörpern immunbiochemisch im Präzipitat nachweisen. Für dieses Experiment wurden die stabil HA-RRAS^{WT}-, HA-RRAS^{G38V}-

und HA-RRAS^{S43N}-exprimierenden CHO-Zelllinien verwendet. Jeweils eine Kultur dieser CHO-Zelllinien wurde lysiert und anschließend einer KoIP mittels anti-HA-Antikörper-konjugierter Agarosekügelchen (HA-*trap*) unterzogen. Der Nachweis der stabilen Expression der HA-RRAS-Proteinvarianten und der Effektivität der Präzipitation erfolgte nach Western-Blotting durch Immundetektion mit anti-HA-Antikörpern in den Rohlysaten und Präzipitaten (Abb. 5.10, Rohlysate und Präzipitate, RRAS). Die sowohl im Rohlysat als auch im Präzipitat im Vergleich zu HA-RRAS^{WT} und HA-RRAS^{G38V} detektierte, geringere Menge an HA-RRAS^{S43N} (Abb. 5.10, Rohlysate und Präzipitate, RRAS) sowie die geringere Proteinmenge der Ladekontrolle Tubulin (Abb. 5.10, Rohlysate, Tubulin), könnte auf einen möglichen selektiven Nachteil von RRAS^{S43N}-exprimierenden CHO-Zellen hindeuten.

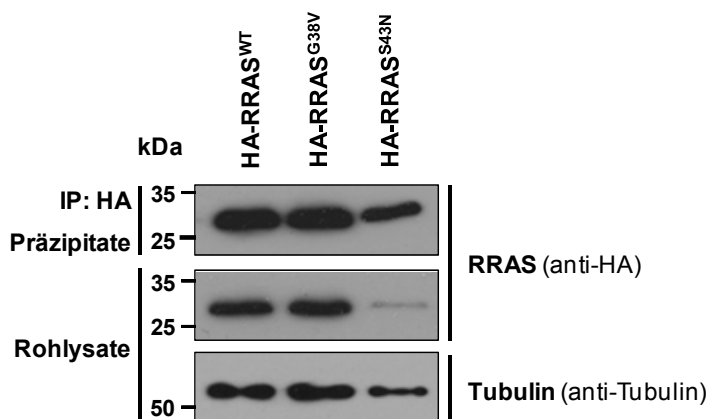


Abb. 5.10: Stabile Expression von RRAS^{WT}, RRAS^{G38V} und RRAS^{S43N} in CHO-Zellen und Anreicherung dieser RRAS-Proteinvarianten durch Koimmunpräzipitation: Stabil RRAS^{WT}-, RRAS^{G38V}- bzw. RRAS^{S43N}-exprimierende CHO-Zellen wurden lysiert und anschließend einer Koimmunpräzipitation mit anti-HA-Antikörper-konjugierten Agarosekügelchen unterzogen. Rohlysate (mittlerer Blot) und Präzipitate (oberer Blot) wurden nach Western-Blotting mittels Immundetektion mit anti-HA-Antikörpern analysiert. Als Ladekontrolle wurde die Menge an Tubulin mittels spezifischer Antikörper detektiert (unterer Blot). Auf der linken Seite der Blots sind die Molekulargewichte des mitgeführten Massenstandards in kDa und auf der rechten Seite die verwendeten Antikörper sowie das jeweilige Antigen angeführt. IP, Immunpräzipitation.

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Rohlysate und Präzipitate nach SDS-PAGE mittels Coomassie[®] gefärbt. In den Rohlysaten konnte eine Vielzahl an Banden detektiert werden (Abb. 5.11 A, Rohlysate), in den Präzipitaten hingegen nur wenige Banden (Abb. 5.11 A, Präzipitate). Theoretisch sollte die konstitutiv aktive, GTP-gebundene RRAS-Proteinvariante andere Proteine binden, als die dominant negative, GDP-gebundene RRAS-Proteinvariante, wodurch putative RRAS-Interaktionspartner gefunden werden können. Neben der *heavy*- (ca. 50 kDa) und

der *light-chain* (ca. 25 kDa) des verwendeten HA-Antikörpers, konnte sowohl HA-RRAS^{WT} als auch HA-RRAS^{G38V} in den Präzipitaten nachgewiesen werden (Abb. 5.11 A, Sternchen, Präzipitate). Die Lage der RRAS-Bande (ca. 25 kDa) wurde hierbei anhand eines Kontrollexperimentes eingegrenzt, in welchem CHO-Zellen transient mit dem HA-Leervektor bzw. mit dem HA-RRAS^{WT}-Expressionskonstrukt transfiziert wurden (Abb 5.11 B, Präzipitate). HA-RRAS^{S43N} konnte auch im PAA-Gel nicht nachgewiesen werden (Abb 5.11 A, Präzipitate). Alle weiteren Banden, die in den HA-RRAS^{WT}-, HA-RRAS^{G38V}- und HA-RRAS^{S43N}-Präzipitaten mittels Coomassie[®]-Färbung sichtbar wurden, waren sehr schwach und wurden in jedem der drei Präzipitate detektiert (Abb. 5.11 A, Präzipitate). Darüber hinaus konnten diese Banden auch in der Kontrollpräzipitation mit dem HA-Leervektor beobachtet werden (Abb. 5.11 B, Präzipitate). Zusammengefasst muss festgehalten werden, dass mittels KoIP und Coomassie[®]-Färbung keine abgrenzbaren Proteinbanden nachgewiesen werden konnten, sodass eine daraufhin folgende Massenspektrometrie obsolet wurde.

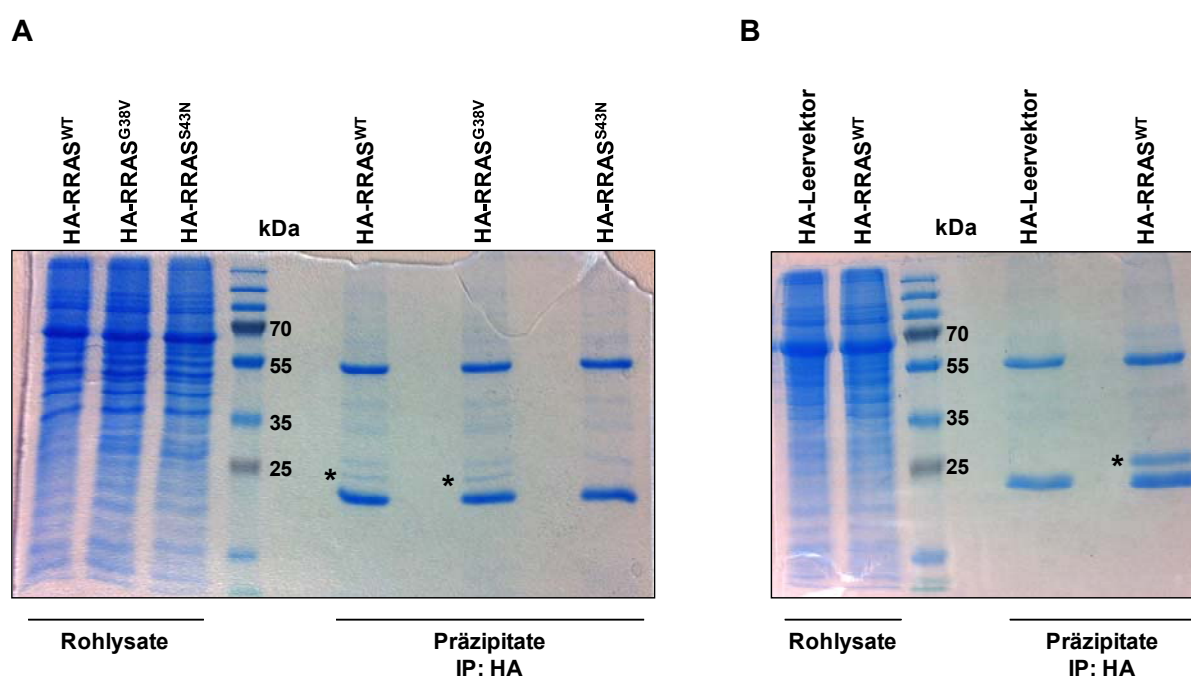


Abb. 5.11: PAA-Gelelektrophorese und Coomassie[®]-Färbung von Rohlysaten und Präzipitaten nach stabiler bzw. transients Expression von RRAS-Proteinvarianten in CHO-Zellen. Es wurden jeweils zwölf 10 cm Zellkulturschalen mit stabilen HA-RRAS^{WT}-, HA-RRAS^{G38V}- bzw. HA-RRAS^{S43N}-CHO-Zellen (**A**) bzw. am Vortag transient mit dem HA-RRAS^{WT}-Expressionskonstrukt oder dem HA-Leervektor transfizierte CHO-Zellen (**B**) lysiert und gepoolt. Nach Präzipitation der HA-RRAS-Proteinvarianten mit anti-HA-Antikörper-konjugierten Agarosekügelchen erfolgte eine Anfärbung der

Proteine im Polyacrylamidgel mit Hilfe einer Coomassie® G-250 Färbelösung. Die Banden links vom Massenstandard zeigen jeweils die Rohlysate und die Banden rechts davon jeweils die Präzipitate. In der Mitte sind die Molekulargewichte des mitgeführten Massenstandards in kDa aufgeführt. * markieren die RRAS-Banden. IP, Immunpräzipitation.

5.2.3 Untersuchungen zur Interaktion zwischen Talin1 und RRAS mittels Koimmunpräzipitation

Durch die ungerichtete Suche mittels KoIP und Massenspektrometrie (Kapitel 5.2.2) konnten keine neuen RRAS-Bindepartner gefunden werden. Daher sollte im Folgenden gerichtet nach RRAS-Interaktionspartnern mit Beteiligung bei der RRAS-induzierten Aktivierung der Integrine (*inside-out-signaling*) und/oder der Integrin-induzierten Aktivierung von RRAS (*outside-in-signaling*) gesucht werden. Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es Hinweise in der Literatur, die eine Beteiligung von RRAS bei der Talin-vermittelten Integrin-Aktivierung aufzeigen, möglicherweise über eine Bindung von RRAS an den Talin1-*head*; dies sollte mittels KoIP (GFP-*trap*) und Western-Blot-Analyse untersucht werden. Dafür standen GFP-fusionierte Expressionskonstrukte für drei Talin1-Proteinvarianten (GFP-Talin1-*head*, GFP-Talin1-*rod* und GFP-Talin1-*full-length*) zur Verfügung (Abb. 5.12).

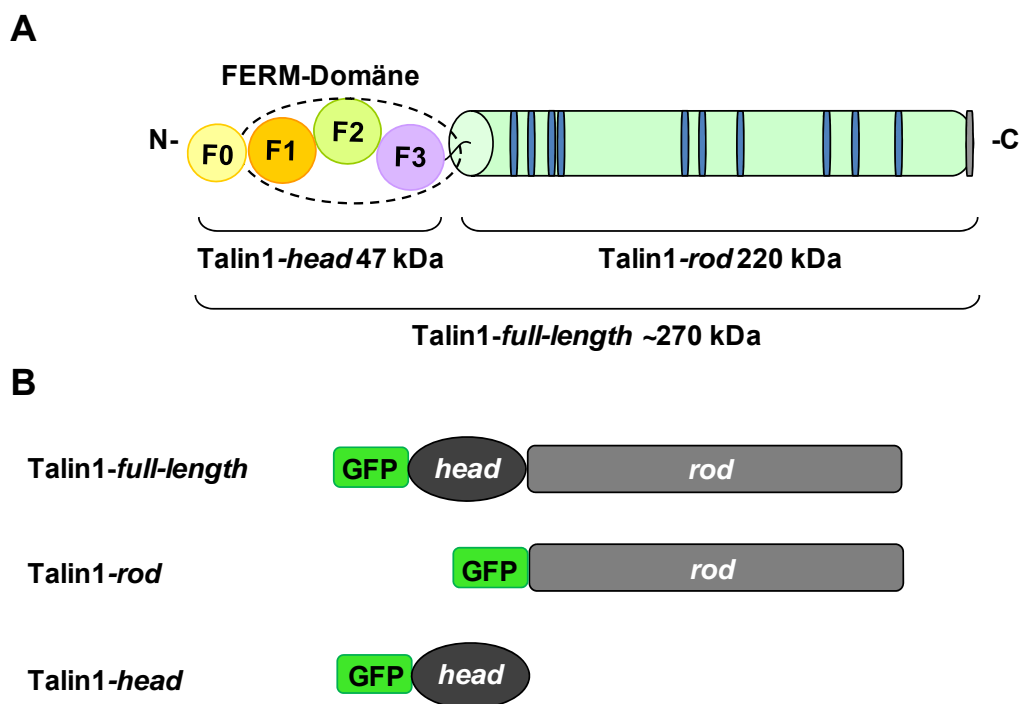


Abb. 5.12: Schematische Darstellung der Talin1-Domänenstruktur und der hier analysierten Talin1-Proteinvarianten. (A) Die drei Subdomänen F1, F2 und F3 umfassen die FERM-Domäne, die

zusammen mit der F0-Subdomäne den 47 kDa schweren Talin1-*head* bilden, der unter anderem eine Bindestelle für β -Integrine enthält (nicht gezeigt). Der 220 kDa schweren Talin1-*rod* enthält neben den hier dargestellten Vinculin-Bindestellen (blaue Balken) und der Dimerisierungs-Domäne (grauer Balken), noch zwei Aktin-Bindestellen und eine Integrin-Bindestelle (nicht dargestellt). **(B)** Die drei in dieser Arbeit analysierten Talin1-Proteinvarianten (*GFP-Talin-head*, *GFP-Talin1-rod* und *GFP-Talin1-full-length*) enthalten einen NH₂-terminalen GFP-tag. GFP, grün fluoreszierendes Protein.

COS7-Zellen wurden mit *FLAG-RRAS^{WT}*-Konstrukten zusammen mit *GFP-Talin1-head*-, *GFP-Talin1-rod*- oder *GFP-Talin1-full-length*-Expressionskonstrukten kotransfiziert. Als Negativkontrollen dienten COS7-Zellen, die mit dem GFP-Leervektor bzw. mit dem FLAG-Leervektor kotransfiziert wurden. Mit Hilfe von anti-GFP-Antikörper-konjugierten Agarosekügelchen wurde Talin1-*head*-, *-rod* bzw. *-full-length* aus den Zelllysaten präzipitiert und die Rohlysate und Präzipitate wurden nach Western-Blotting immunologisch mittels anti-FLAG- und anti-GFP-Antikörpern analysiert.

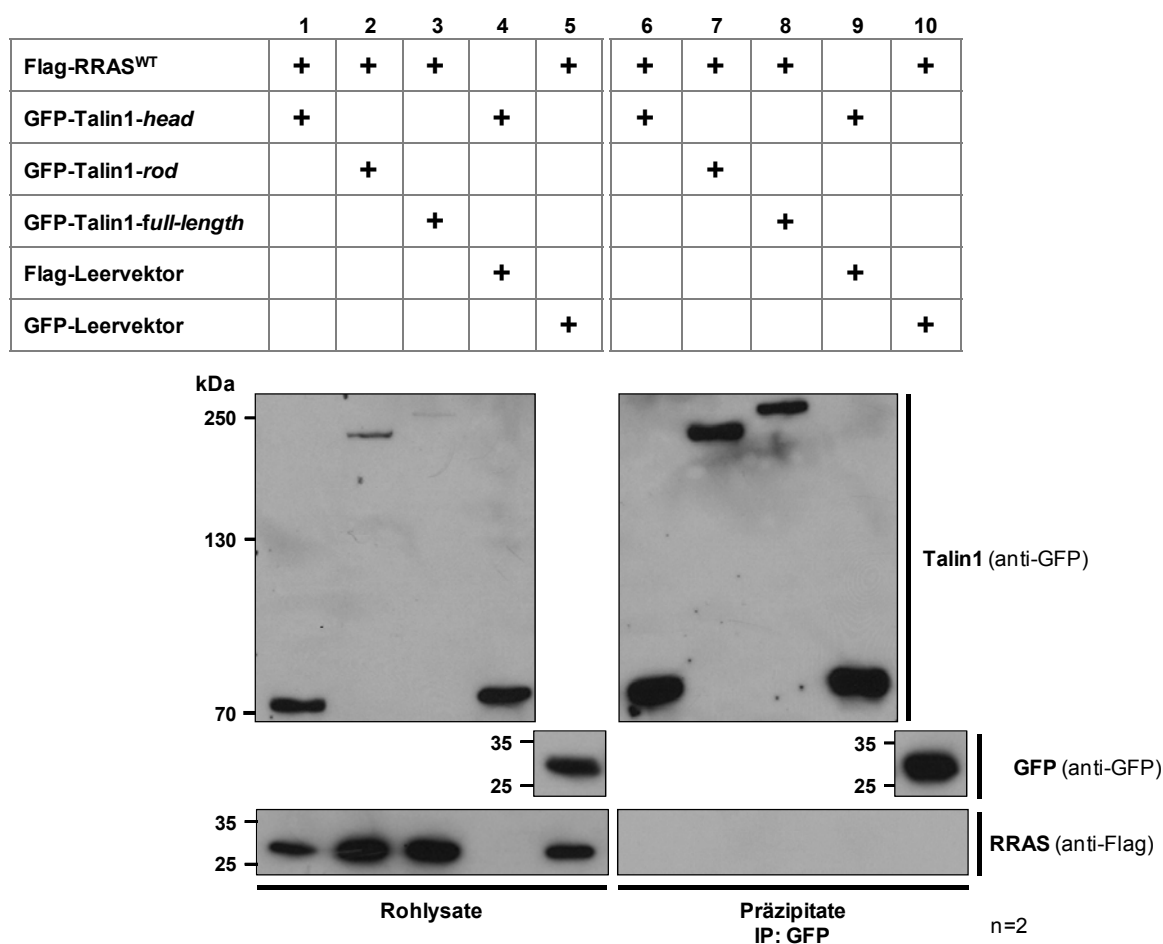


Abb. 5.13: Überprüfung einer möglichen Interaktion zwischen Talin1-Proteinvarianten und RRAS^{WT} in COS7-Zellen mittels KoIP. COS7-Zellen wurden, wie in der Abbildung angegeben, transient mit verschiedenen *GFP-Talin1*-Expressionskonstrukten (*GFP-Talin1-head*, *GFP-Talin1-rod* oder *GFP-Talin1-full-length*) und dem *FLAG-RRAS^{WT}*-Konstrukt kotransfiziert. Als Negativkontrollen

dienten Kotransfektionen mit dem GFP-Leervektor bzw. mit dem HA-Leervektor. Am nächsten Tag erfolgte nach der Zellyse in GFP-*trap*-Puffer die Präzipitation mittels anti-GFP-Antikörper-konjugierten Agarosekügelchen. Rohlysate (Blots auf der linken Seite) und Präzipitate (Blots auf der rechten Seite) wurden schließlich nach Western-Blotting mittels Immundetektion mit anti-GFP- und anti-FLAG-Antikörpern analysiert. Aufgrund der stark unterschiedlichen Größe von Talin1 und GFP, wurde GFP in den Rohlysaten und Präzipitaten der Negativkontrolle auf einem separaten Blot detektiert (Spuren 5 und 10). Dargestellt sind die repräsentativen Blots aus einem von zwei durchgeführten Experimenten (n=2). Die Molekulargewichte des mitgeführten Massenstandards (kDa) sind auf der linken Seite der Blots, die verwendeten Antikörper sowie die detektierten Antigene auf der rechten Seite aufgeführt. IP, Immunpräzipitation; GFP, grün fluoreszierendes Protein.

Die drei Talin1-Proteinvarianten konnten in den Rohlysaten und deutlich angereichert in den Präzipitaten nachgewiesen werden (Abb. 5.13, Rohlysate Spuren 1-3 und Präzipitate Spuren 6-8, Talin1). Auch FLAG-RRAS^{WT} konnte in den Rohlysaten außer in der Negativkontrolle detektiert werden (Abb. 5.13, Rohlysate Spuren 1-5, RRAS). RRAS^{WT} konnte allerdings mit keiner der GFP-Talin1-Proteinvarianten kopräzipitiert werden (Abb. 5.13, Präzipitate Spuren 6-8, RRAS). In den Präzipitaten aus den Kontrollansätzen war erwartungsgemäß kein RRAS^{WT} nachweisbar (Abb. 5.13, Präzipitate Spuren 9 und 10, RRAS).

In weiteren Versuchen wurde FLAG-RRAS^{G38V} zusammen mit GFP-Talin1-*head*, *-rod* oder *-full-length* ektopisch exprimiert, um zu testen, ob eine Interaktion zwischen der konstitutiv aktiven RRAS-Form (RRAS^{G38V}) und Talin1 nachweisbar ist. Die GFP-Talin1-Proteinvarianten konnten in den Rohlysaten und deutlich angereichert in den Präzipitaten nachgewiesen werden (Abb. 5.14, Rohlysate Spuren 1-3 und Präzipitate Spuren 6-8, Talin1). Ektopisch exprimiertes FLAG-RRAS^{G38V} konnte ebenfalls in allen Rohlysaten (außer in der Negativkontrolle) detektiert werden (Abb. 5.14, Rohlysate Spuren 1-5, RRAS). Bemerkenswerterweise kopräzipitierte RRAS^{G38V} schwach mit Talin1-*full-length*, jedoch nicht mit Talin1-*rod* und Talin1-*head* (Abb. 5.14, Präzipitate Spuren 6-8, RRAS). Nach Koexpression von RRAS^{G38V} und dem GFP-Leervektor konnte kein RRAS im Präzipitat detektiert werden (Abb. 5.14, Präzipitate Spur 10, RRAS); RRAS bindet also nicht unspezifisch an GFP. Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse vermuten, dass RRAS im aktivierten Zustand gemeinsam mit Talin1 in einem Proteinkomplex auftritt. Es bleibt allerdings noch zu klären, ob RRAS direkt oder über andere Proteine mit Talin1 interagiert und welche Proteinmotive diese Bindung(en) ermöglichen.

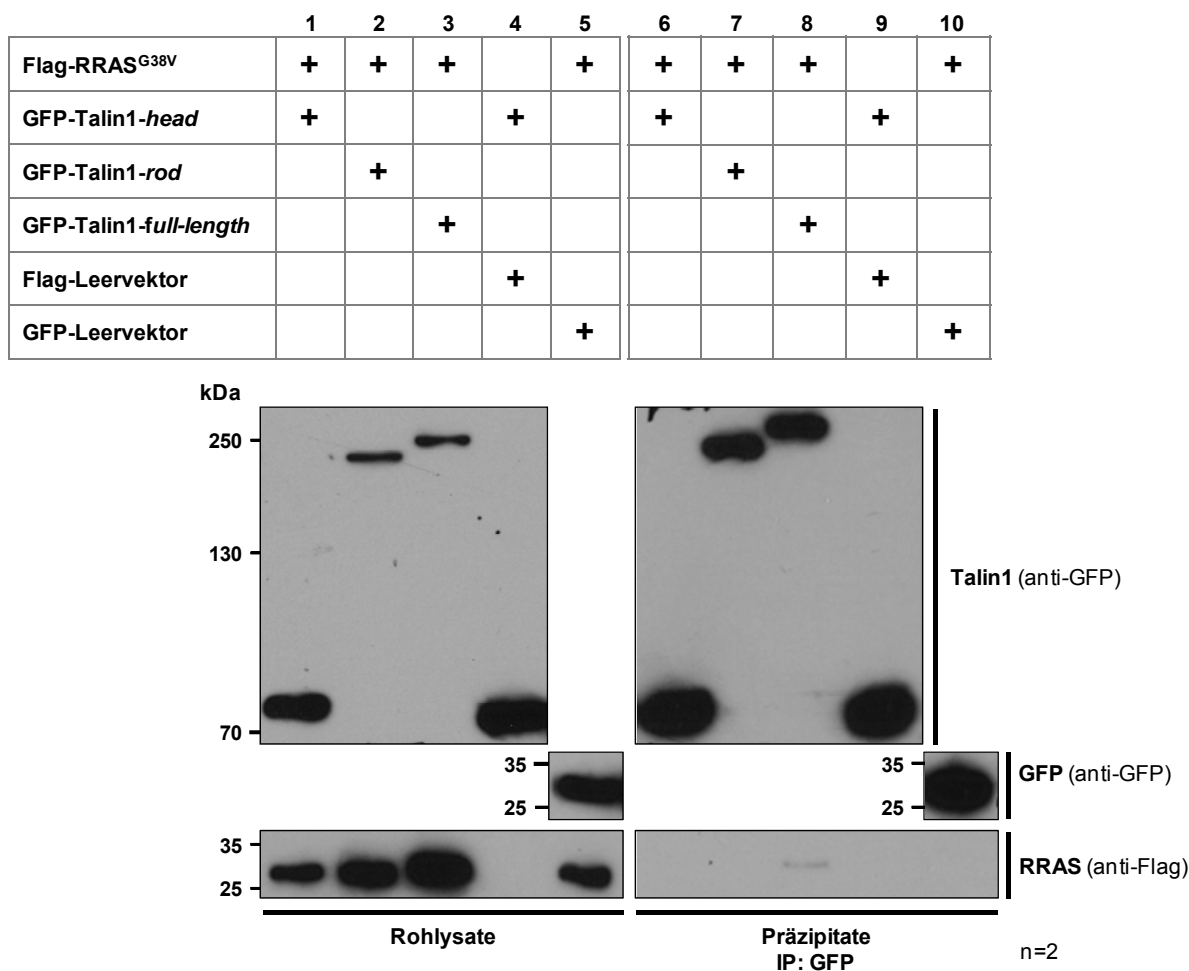


Abb. 5.14: Überprüfung einer Interaktion von Talin1-Proteinvarianten mit RRAS^{G38V} in COS7-Zellen durch KoIP. COS7-Zellen wurden mit FLAG-RRAS^{G38V}-Expressionskonstrukten zusammen mit GFP-Talin1-*head*-, GFP-Talin1-*rod*- oder GFP-Talin1-*full-length*-Konstrukten, wie in der Abbildung angegeben, transient kotransfiziert. Zur negativen Kontrolle wurde der FLAG-Leervektor bzw. der GFP-Leervektor eingesetzt. Die Talin1-Proteinvarianten wurden nach der Zelllyse mit anti-GFP-Antikörper-konjugierten Agarosekügelchen präzipitiert. Nach Western-Blotting erfolgte eine Immundetektion in den Rohlysaten (Blots auf der linken Seite) und Präzipitaten (Blots auf der rechten Seite) mit Hilfe von anti-GFP- und anti-FLAG-Antikörpern. Da Talin1 und GFP eine stark unterschiedliche Größe aufweisen, erfolgte die Detektion von GFP im Kontrollansatz auf einem separaten Blot (Spuren 5 und 10). Es sind die Blots von einem aus zwei durchgeführten Experimenten dargestellt (n=2). Auf der linken Seite der Blots sind die Molekulargewichte des mitgeführten Massenstandards in kDa und auf der rechten Seite die verwendeten Antikörper und das jeweils detektierte Antigen angegeben. IP, Immunpräzipitation; GFP, grün fluoreszierendes Protein.

5.2.4 Untersuchungen zur Interaktion zwischen RIAM und RRAS mittels Koimmunpräzipitation

Die bisher erhaltenen Ergebnisse erlauben noch keine Aussage darüber, ob RRAS direkt an Talin1 bindet. Eine RRAS-vermittelte Integrin-Aktivierung könnte auch über

zwischengeschaltete Proteine erfolgen. Wie bereits einleitend beschrieben, initiiert RAP1 über eine Interaktion mit dessen Adapter- und Effektorprotein RIAM eine Talin-vermittelte Integrin-Aktivierung. Strukturdaten zu RAP1 und RRAS (siehe Einleitung) führten zu der Hypothese, dass RRAS direkt mit RIAM interagieren und so eine Talin-vermittelte Integrin-Aktivierung initiieren könnte (Abb. 5.15).

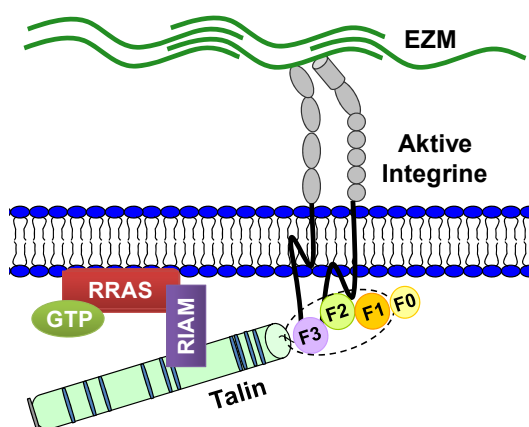


Abb. 5.15: RRAS als direkter Rekrutor von RIAM, einem Talin-Bindeprotein. Aktiviertes RRAS rekrutiert RIAM an die Plasmamembran und stimuliert so die Bildung von Integrin-Aktivierungs-Komplexen: RIAM bindet an den Talin-rod und bringt Talin so in den intrazellulären Bereich von Integrinen, was schließlich durch Talin-head-Interaktion zur Aktivierung der Integrine und Ligandenbindung führt. EZM, extrazelluläre Matrix; F0, F1, F2 und F3: Talin-Subdomänen; GTP, Guanosintriphosphat.

Diese Hypothese und ob der Aktivierungszustand von RRAS dabei eine Rolle spielt, sollte mit Hilfe von KoIPs untersucht werden. COS7-Zellen wurden mit verschiedenen RRAS-Expressionskonstrukten ($HA-RRAS^{WT}$, $HA-RRAS^{G38V}$ und $HA-RRAS^{S43N}$) zusammen mit $GFP-RIAM$ -Konstrukt kotransfiziert und am nächsten Tag lysiert. Als Negativkontrolle dienten mit GFP-Leervektor kotransfizierte COS7-Zellen. Mittels anti-GFP-Antikörper-konjugierten Agarosekügelchen wurde GFP-RIAM präzipitiert und in den Rohlysaten und Präzipitaten nach Western-Blotting mit anti-GFP-Antikörpern nachgewiesen (Abb. 5.16, Rohlysate Spuren 1, 3, 5 und Präzipitate Spuren 7, 9, 11, RIAM). Unter Einsatz von anti-HA-Antikörpern wurde ektopisch exprimiertes $RRAS^{WT}$, $RRAS^{G38V}$ bzw. $RRAS^{S43N}$ in den Rohlysaten detektiert (Abb. 5.16, Rohlysate Spuren 1-6, RRAS). In den Präzipitaten mit GFP-RIAM-Fusionsprotein, nicht aber mit GFP alleine, konnten interessanterweise alle drei RRAS-Proteinvarianten ($HA-RRAS^{WT}$, $HA-RRAS^{G38V}$ und $HA-RRAS^{S43N}$) nachgewiesen werden (Abb. 5.16, Präzipitate Spuren 7, 9 und 11, RRAS). Da sowohl konstitutiv aktives RRAS ($RRAS^{G38V}$), als auch dominant negatives RRAS ($RRAS^{S43N}$) mit GFP-RIAM kopräzipitiert, scheint diese putative Interaktion unabhängig vom RRAS Aktivitätszustand zu sein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass RIAM ein Protein-Bindepartner von RRAS ist.

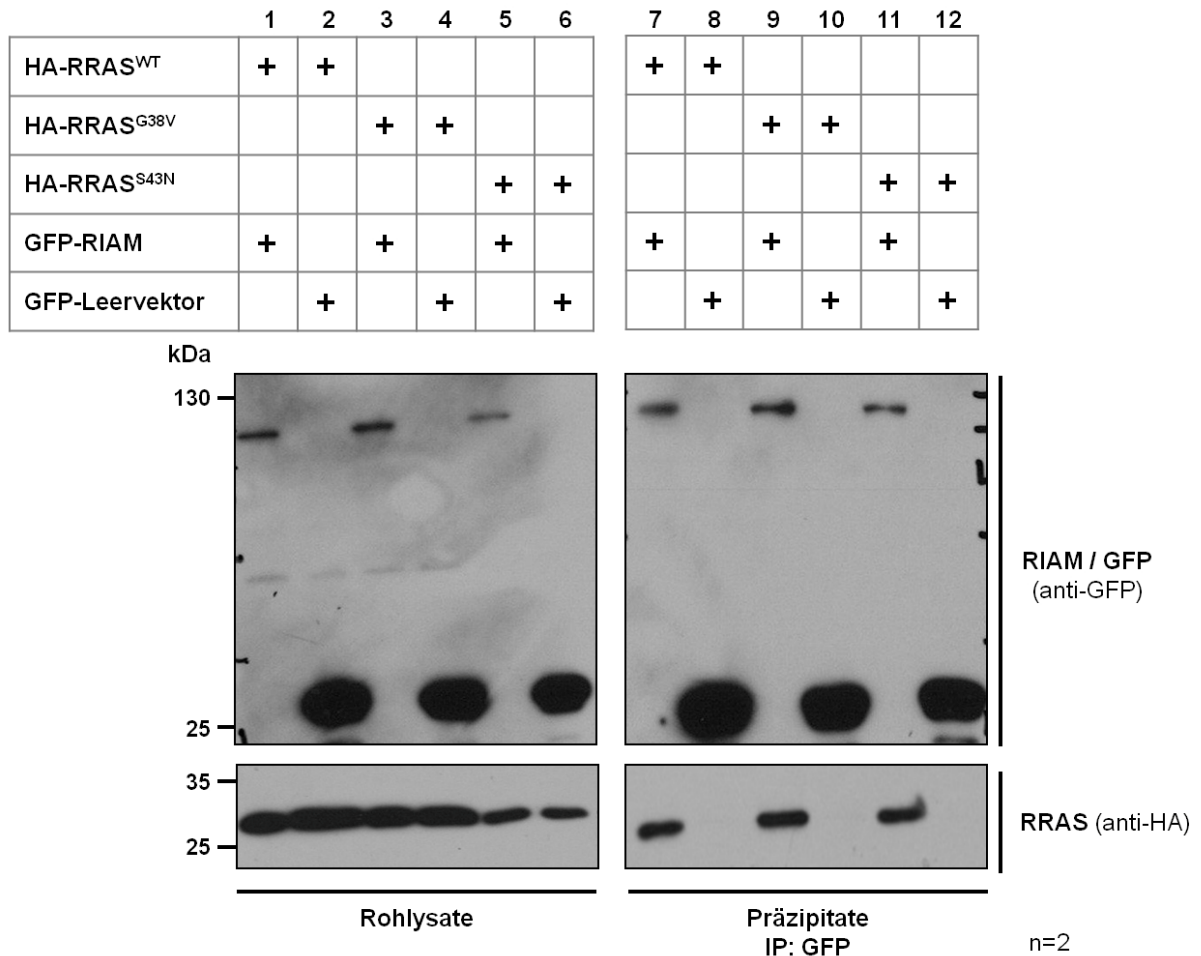


Abb. 5.16: Nachweis einer Interaktion zwischen RIAM und verschiedenen RRAS-Proteinvarianten mittels KoIP. COS7-Zellen wurden wie in der Abbildung angegeben mit verschiedenen *FLAG-RRAS*-Expressionskonstrukten (*FLAG-RRAS^{WT}*, *FLAG-RRAS^{G38V}* oder *FLAG-RRAS^{S43N}*) und einem *GFP-RIAM*-Konstrukt bzw. dem GFP-Leervektor als Negativkontrolle transient kotransfiziert. Nach der Zellyse in *GFP-trap*-Puffer erfolgte die Präzipitation mit anti-GFP-Antikörperkonjugierten Agarosekügelchen. Nach Western-Blotting erfolgte die Immundetektion in den Rohlysaten (Blots auf der linken Seite) und Präzipitaten (Blots auf der rechten Seite) mit Hilfe von anti-GFP- und anti-FLAG-Antikörpern. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen (n=2). Auf der linken Seite der Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Massenstandards in kDa angegeben, auf der rechten Seite sind die verwendeten Antikörper und das detektierte Protein angeführt. IP, Immunpräzipitation; GFP, grün fluoreszierendes Protein.

5.2.5 Untersuchungen zur Rolle von RRAS bei der Aktivierung von RAP1 mittels GTPase-Pull-Down-Experimenten in COS7-Zellen

Neben der Arbeitshypothese, dass RRAS über RIAM und Talin die Aktivierung der Integrine steuern kann, wurde parallel noch eine weitere Arbeitshypothese verfolgt: RRAS stimuliert *upstream* von RAP1 dessen Aktivierung, und erst dann kann GTP-gebundenes RAP1, über die Rekrutierung von RIAM, die Bildung von Integrin-Aktivierungs-Komplexen induzieren (Abb. 5.17).

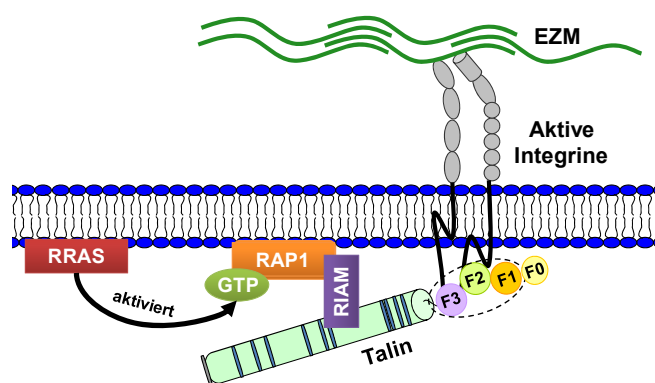


Abb. 5.17: RRAS als Aktivator von RAP1, einem Signaling-Protein upstream von Talin. RRAS aktiviert an der Plasmamembran RAP1, welches dann RIAM rekrutiert. Dies führt zur Bildung von Integrin-Aktivierungs-Komplexen und zur Aktivierung der Integrine durch Bindung von Talin-head an die zytosomatischen Integrinmotive. Die darauf folgende Konformationsänderung der extrazellulären Integrindomänen ermöglicht schließlich die Bindung an Liganden. EZM, extrazelluläre Matrix; F0, F1, F2 und F3: Talin-(Sub)Domänen. GTP, Guanosintriphosphat.

Um dieser Vermutung nachzugehen, sollte mit Hilfe von GTPase-Pull-Down-Experimenten die Menge an aktivem RAP1A und RAP1B nach Überexpression von RRAS^{WT}, RRAS^{G38V} bzw. RRAS^{S34N} in COS7-Zellen bestimmt werden. Dabei nutzt man die Tatsache, dass nur aktives (GTP-gebundenes) RAP1 spezifisch an dessen Effektorprotein RALGDS bindet (Roosj und Bos 1997). So kann mit Hilfe von aus *E.coli*-Bakterien aufgereinigten und mit GST-fusionierten RAS-Bindedomänen (RBD) von RALGDS aktiviertes RAP1 aus COS7-Zellen präzipitiert werden. In COS7-Zellen wurde HA-RAP1A bzw. FLAG-RAP1B zusammen mit verschiedenen RRAS-Proteinvarianten (RRAS^{WT}, RRAS^{G38V} oder RRAS^{S34N}) koexprimiert, die Zelllysate mit GST-RALGDS[RBD] inkubiert und aktives RAP1A bzw. RAP1B mit Hilfe von Glutathion-Kügelchen präzipitiert. Präzipitate und Rohlysate wurden nach Western-Blotting mittels Immundetektion unter Verwendung von anti-HA- und anti-FLAG-Antikörpern auf die Anwesenheit von RAP1A bzw. RAP1B analysiert.

In beiden Experimenten ist die Menge der ektopisch exprimierten RRAS-Proteinvarianten in den Rohlysaten vergleichbar (Abb. 5.18 A und B, Rohlysate, gesamtes RRAS); lediglich RRAS^{S43N} wird von den COS7-Zellen etwas schwächer exprimiert, was auf den bereits erwähnten selektiven Nachteil derartig transfizierter Zellen hindeutet (Abb. 5.18 A und B, Rohlysate, gesamtes RRAS). Auch die Menge von überexprimiertem RAP1A bzw. RAP1B ist innerhalb der zu vergleichenden Ansätze relativ konstant (Abb. 5.18 A und B, Rohlysate, gesamtes RAP1A bzw. RAP1B). Nur die Gesamtmenge an RAP1B scheint in RRAS^{WT}-exprimierenden COS7-Zellen etwas reduziert zu sein (Abb. 5.18 B, Rohlysate, gesamtes RAP1B). Allerdings ist diese Beobachtung auf eine verminderte Gesamtprotein-Menge zurückzuführen (Abb. 5.18 B, Rohlysate, Tubulin) und wurde in weiteren Experimenten nicht reproduziert. Im Vergleich zu RRAS^{WT}-exprimierenden Zellen, konnte nach Expression von RRAS^{G38V} bzw. RRAS^{S43N} in den jeweiligen Präzipitaten keine veränderte Menge, weder an aktiviertem RAP1A (Abb. 5.18 A, Präzipitate, aktives RAP1A), noch an aktiviertem RAP1B (Abb. 5.18 B, Präzipitate, aktives RAP1B) detektiert werden. Damit konnte die oben aufgestellte Hypothese, dass RRAS *upstream* von RAP1 dessen Aktivierung stimuliert, experimentell nicht bestätigt werden.

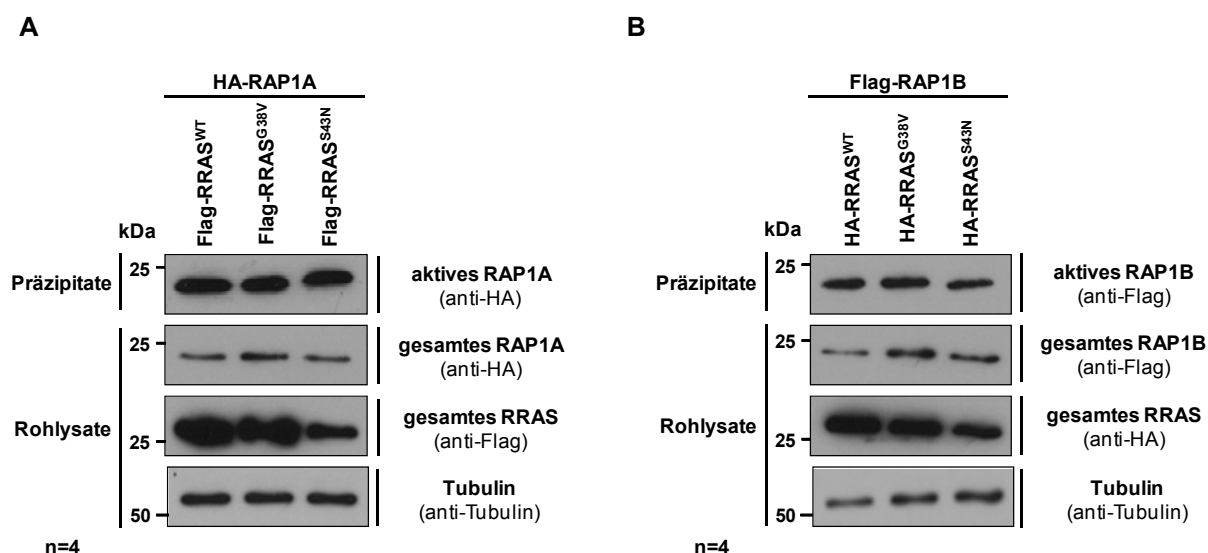


Abb. 5.18: Bestimmung der Menge an aktivem RAP1A und RAP1B nach ektopischer Expression von RRAS-Proteinvarianten in COS7-Zellen. COS7-Zellen wurden mit den folgenden Expressionskonstrukten transient kotransfiziert: *FLAG-RRAS^{WT}*, *FLAG-RRAS^{G38V}* oder *FLAG-RRAS^{S43N}* zusammen mit *HA-RAP1A* (A) bzw. mit *HA-RRAS^{WT}*, *HA-RRAS^{G38V}* oder *HA-RRAS^{S43N}* zusammen mit *FLAG-RAP1B* (B). Nach der Zellyse wurde aktives RAP1A bzw. RAP1B mit Hilfe des

GST-RAL[RBD]-Fusionsproteins präzipitiert. Präzipitate und Rohlysate wurden nach Western-Blotting durch Immundetektion mit den jeweils neben den Blots angegebenen Antikörpern (anti-HA- bzw. anti-FLAG) analysiert: Die RAP1A- bzw. RAP1B-Gesamtmenge wird in den Rohlysaten ersichtlich, die Menge an aktivem RAP1A bzw. RAP1B in den Präzipitaten. Die Expression der RRAS-Proteinvarianten wurde ebenfalls in den Rohlysaten ermittelt. Zur Ladekontrolle wurde die Menge an Tubulin festgestellt. Auf der linken Seite der Blots sind die Molekulargewichte des mitgeführten Massenstandards in kDa aufgeführt. Es ist jeweils ein repräsentativer Blot von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt (n=4).

6 Diskussion

6.1 Aberrantes EGFR-*trafficking* – ein neuer Pathomechanismus für RASopathien

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte durch detaillierte Analysen gezeigt werden, dass die RASopathie-assoziierten Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q in der CBL-RING-Domäne (i) die durch CBL vermittelte Ubiquitylierung des EGFR reduzieren, (ii) die EGFR-Degradierung vermindern, (iii) die zelluläre Verteilung des EGFR verändern und (iv) zu einer Hyperstimulation der RAS-MAPK-Signalkaskade führen. Damit wurde erstmals ein verändertes EGFR-*trafficking* als zugrunde liegender Pathomechanismus für eine RASopathie beschrieben.

CBL ubiquityliert als E3-Ubiquitin-Ligase den EGFR (Schmidt und Dikic 2005). Mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen wurde in CBL-Mutanten-exprimierenden COS7-Zellen nach EGF-Stimulation eine statistisch signifikante Reduktion der EGFR-Ubiquitylierung nachgewiesen. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen, konnte kürzlich auch in einer anderen Studie gezeigt werden, dass die krankheits-assoziierten CBL-Aminosäuresubstitutionen p.D390Y und p.R420Q eine verminderte EGFR-Ubiquitylierung nach EGF-Stimulation verursachen (Martinelli et al. 2010). Zusammen weisen diese Daten darauf hin, dass die RASopathie-assoziierten CBL-Mutationen zu einem Funktionsverlust der Ubiquitin-Ligase-Kapazität von CBL führen. Die Menge an ubiquityliertem EGFR in *mock*-transfizierten Zellen, nämlich weniger als in CBL^{WT}- jedoch mehr als in CBL^{K382E}-, CBL^{D390Y}- oder CBL^{R420Q}-exprimierenden Zellen, könnte auf einen dominant-negativen Effekt der CBL-Mutationen auf die EGFR-Ubiquitylierung hinweisen, der zusätzlich zu einem Funktionsverlust von CBL wirken könnte.

Die Ubiquitylierung dient u. a. als Markierung für eine lysosomale Degradierung des EGFR (Haglund und Dikic 2012). Dementsprechend konnte in dieser Arbeit nach ektopischer Expression von CBL^{WT} ein schneller und effizienter EGFR-Abbau beobachtet werden, jedoch nicht nach Expression der RASopathie-assoziierten CBL-

Proteinvarianten bzw. nach *mock*-Transfektion der COS7-Zellen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die stimulierende Wirkung von CBL auf die EGFR-Degradierung durch die krankheits-assoziierten Mutationen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q eingeschränkt wird, also ein Funktionsverlust vorliegt. Der nach 60-minütiger EGF-Stimulation festgestellte Unterschied zwischen CBL-Mutanten- und CBL^{WT}-exprimierenden Zellen, relativiert sich nach 240 Minuten EGF-Stimulation; an diesem Zeitpunkt konnte in allen Zellen eine ähnliche EGFR-Gesamtmenge detektiert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass der EGFR-Abbau durch die RASopathie-assoziierten Mutationen verzögert abläuft. EGFR-Degradierung und -Ubiquitylierung hängen eng zusammen: die Ubiquitylierung von EGFR dient als Signal für die ESCRT-abhängige Sortierung der Rezeptoren in intraluminale Vesikel (ILVs) der multivesikulären Körperchen (MVBs), von wo sie schließlich zum lysosomalen Abbau weitertransportiert werden (Hurley 2008). Bei einer verminderten Ubiquitylierung, könnte die Sortierung durch den ESCRT fehlschlagen, sodass die Rezeptoren nicht in die ILVs der MVBs eingeschlossen werden und folglich nicht lysosomal degradiert werden. Interessanterweise führte die zur Kontrolle mit analysierte CBL^{C381A}-Mutante im Gegensatz zu den anderen CBL-Varianten nicht nur zu einer Verzögerung, sondern zur teilweisen Blockierung des EGFR-Abbaus. Dieses Ergebnis lässt einen zusätzlichen negativen Effekt der p.C381A-Mutation auf die Degradierung bzw. auf das *trafficking* des EGFR vermuten. Die Aminosäure Cystein 381 ist entscheidend für die Bindung von Zink, einem wichtigen Kofaktor zur Stabilisierung der RING-Domäne; die Mutation an der Position 381 betrifft die sogenannten *zinc chelating loops* im CBL-Protein und könnte so eine Bindung mit E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen beeinträchtigen (Zheng et al. 2000). Da jedoch sowohl die p.C381A-Mutation als auch die RASopathie-assoziierten Mutationen Aminosäuren betreffen, welche die Bindungsstelle für E2-Ubiquitin-konjugierende Enzyme konstituieren (Zheng et al. 2000; Martinelli et al. 2010), kann zum jetzigen Zeitpunkt keine fundierte mechanistische Erklärung für die unterschiedlichen funktionellen Auswirkungen gegeben werden.

Es ist bekannt, dass eine intakte CBL-*linker*-RING-Domäne für eine EGF- bzw. EGFR-Internalisierung unerlässlich ist (Waterman et al. 1999; Thien et al. 2001;

Jiang und Sorkin 2003) und vorhandene Daten deuten darauf hin, dass eine Ubiquitylierung des EGFR zu dessen Internalisierung notwendig ist (Sigismund et al. 2013). Tatsächlich konnte in dieser Arbeit anhand von Biotinylierungsexperimenten gezeigt werden, dass eine Expression der Noonan-Syndrom-assoziierten CBL-Proteinvarianten in COS7-Zellen die Menge an EGFR an der Zelloberfläche erhöht und die intrazelluläre EGFR-Menge signifikant reduziert. Im Einklang damit wurde mittels immunzytochemischen Analysen in CBL-Mutanten-exprimierenden Zellen eine verminderte Rezeptor-vermittelte Aufnahme von EGF detektiert. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q in CBL die relative zelluläre Verteilung des EGFR zwischen Zelloberfläche und Zellinnerem verändern, was auf eine ineffektive EGFR-Internalisierung zurückzuführen sein und somit als *trafficking*-Defekt beschrieben werden kann. In *mock*-transfizierten Zellen lag der relative intrazelluläre EGFR-Anteil mengenmäßig zwischen den in CBL^{WT}- und CBL-Mutanten-exprimierenden Zellen; dieselbe Beobachtung wurde bereits bei den Untersuchungen zur EGFR-Ubiquitylierung gemacht. Dies lässt vermuten, dass die CBL-Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q neben einem Funktionsverlust noch einen zusätzlichen dominant-negativen Effekt hinsichtlich der EGFR-Ubiquitylierung und -Internalisierung haben. Damit übereinstimmend wurden dominant-negative Effekte von mit myeloischer Neoplasie assoziierten CBL-Mutationen (p.Q367P, p.Y371S und p.R420Q) auf die CBL-Ligase-Aktivität und die Internalisierung von Rezeptoren gezeigt (Sargin et al. 2007; Sanada et al. 2009). Solche dominant-negativen Konsequenzen der CBL-Mutationen auf die Funktion des Proteins, könnten über eine kompetitive Bindung von Mutanten- und Wildtyp-CBL-Proteinen an phosphotyrosinhaltige Motive des aktivierten EGFR erklärt werden; die mutierten CBL-Moleküle sind aufgrund der veränderten RING-Domäne nicht mehr in der Lage E2-Ubiquitin-konjugierende Enzyme zu rekrutieren und können somit kein Ubiquitin auf den EGFR übertragen.

Die Hyperstimulation der RAS-MAPK-Signalkaskade wird zur Zeit als der wichtigste Pathomechanismus für das Noonan-Syndrom und andere RASopathien gehalten (Schubbert et al. 2007). Über die Regulation des *upstream* des RAS-MAPK-

Signalwegs wirkenden EGFR, gilt CBL als negativer Regulator dieses Signalwegs (Swaminathan und Tsygankov 2006). Tatsächlich konnte in CBL^{K382E-}, CBL^{D390Y-} oder CBL^{R420Q-}-exprimierenden sowie in *mock*-transfizierten COS7-Zellen nach 60-minütiger EGF-Stimulation, im Vergleich zu CBL^{WT}, eine signifikant erhöhte Menge an phosphoryliertem ERK detektiert werden. Das deutet darauf hin, dass die Aminosäuresubstitutionen in CBL die Funktion des Proteins als negativer Regulator der RAS-MAPK-Signalkaskade beeinträchtigen; der durch RASopathie-assoziierte CBL-Mutationen verursachte Funktionsverlust hinsichtlich EGFR-Ubiquitylierung, -Degradierung und -Internalisierung wird also transformiert in einen Funktionsgewinn hinsichtlich der RAS-MAPK-Signalweiterleitung. Solche Zusammenhänge sind bereits aus der Pathogenese von malignen Tumoren bekannt: Eine erhöhte RAS-MAPK-Signalweiterleitung ist typisch für die Entstehung von Krebs und aktivierende, somatische Mutationen wurden bereits in mehreren Genen gefunden, die für Proteine innerhalb dieses Signalwegs kodieren (Dhillon et al. 2007); des Weiteren sind ebenfalls somatische, mit Malignomen assoziierte Mutationen in Genen bekannt, die für Proteine mit Funktion bei der Rezeptor-*downregulation upstream* des RAS-MAPK-Signalwegs (z. B. CBL, HIP1 und TSG101) kodieren (Bache et al. 2004). Eine Fehlfunktion der *trafficking*-Maschinerie betrifft entweder die frühe Phase der Rezeptor-Internalisierung oder den Transport von internalisierten Rezeptor-Komplexen zur Degradierung, wobei beide Defekte die Entstehung von Krebs begünstigen (Dikic und Schmidt 2007).

In der Zusammenschau lassen sich die im ersten Teil dieser Arbeit gewonnenen Daten folgendermaßen zusammenfassen: RASopathie-assoziierte Aminosäuresubstitutionen in CBL beeinträchtigen wahrscheinlich die Bindung des Proteins an E2-Ubiquitin-konjugierende Enzyme, was zu einem Verlust der CBL-Ubiquitylierungskapazität und in Folge zu einem defekten EGFR-*trafficking* (und möglicherweise anderer CBL-regulierter Zelloberflächen-Rezeptoren) führt; diese Defizite verlängern die Verfügbarkeit von Zellmembran-assoziierten Rezeptoren (z. B. EGFR) in der Zelle, was schließlich in einer Hyperstimulation der RAS-MAPK-Signaltransduktionskaskade resultiert.

A

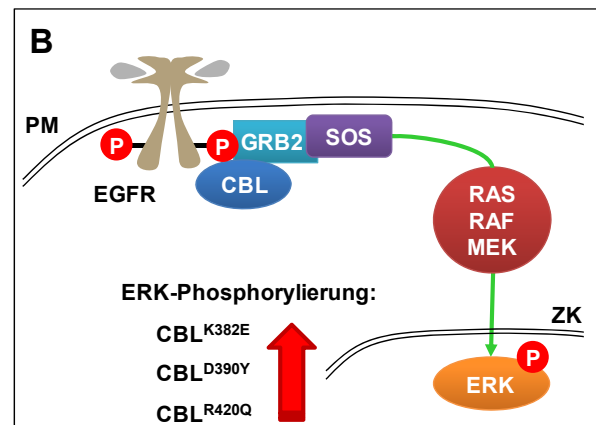
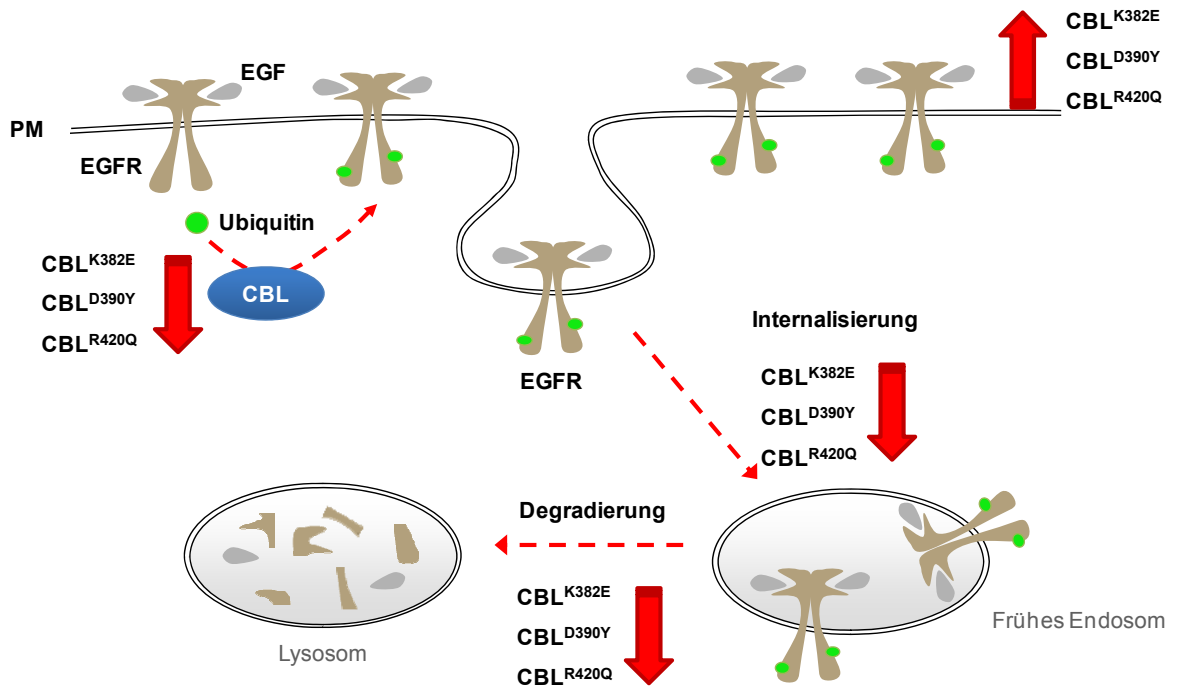


Abb. 6.1: Modell für die Auswirkungen der RASopathie-assoziierten CBL-Aminosäuresubstitutionen auf die EGFR-Ubiquitylierung, das EGFR-*trafficking* und die zelluläre Signalweiterleitung. Die RASopathie-assoziierten Mutationen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q in der CBL-RING-Domäne verursachen eine verminderte CBL-vermittelte EGFR-Ubiquitylierung nach EGF-Stimulation. Der Funktionsverlust der Ubiquitin-Ligase-Kapazität von CBL führt zu einer ineffektiven EGFR-Internalisierung, was in einer erhöhten EGFR-Menge an der Plasmamembran und einer reduzierten intrazellulären EGFR-Menge resultiert. Darüber hinaus werden die EGFR aufgrund der verminderten Ubiquitylierung nicht mehr effizient in die Lysosomen transportiert und abgebaut. **(B)** Das durch die CBL-Mutationen veränderte EGFR-*trafficking* verlängert die Verfügbarkeit von aktivierten EGFR in der Zelle. Dies resultiert schlussendlich in einem erhöhten RAS-MAPK-Signalfluss, wie z. B. einer verstärkten Aktivierung (Phosphorylierung; P) der ERK-Kinasen. PM, Plasmamembran; ZK, Zellkern.

Das Noonan-Syndrom und ähnliche Erkrankungen gehen mit einem auffällig variablen Phänotyp einher (Allanson et al. 2010; Roberts et al. 2013); diese Beobachtung wurde auch bei Patienten mit *CBL*-Keimbahnmutationen gemacht (Martinelli et al. 2010; Niemeyer et al. 2010; Pérez et al. 2010). Diese Unterschiede in der Krankheitsausprägung könnten durch sogenannte *modifier*-Gene erklärt werden (Nadeau 2001; Slavotinek und Biesecker 2003; Génin et al. 2008). Da alle Krankheitsgene für das Noonan-Syndrom für Proteine kodieren, die für den EGFR-RAS-MAPK-Signalweg wichtig sind, könnten in diesem *signaling* Netzwerk involvierte Gene zu den kritischen *modifiern* zählen. Auffällig ist, dass das Noonan-Syndrom und ähnliche Erkrankungen durch Mutationen in Genen verursacht werden, die für weiter *upstream* liegende Komponenten des RAS-MAPK-Signalwegs kodieren (z. B. *PTPN11* und *SOS1*). Andere RASopathien, wie das Kardio-fazio-kutane Syndrom und das Costello-Syndrom hingegen, werden durch Mutationen in weiter *downstream* liegenden Komponenten der RAS-MAPK-Signalkaskade verursacht (Aoki et al. 2008). Aufgrund der ausgeprägten phänotypischen Variabilität beim Noonan-Syndrom wurde vorgeschlagen, dass zusätzlich zum RAS-MAPK-Signalweg noch andere *downstream* Signalwege betroffen sein könnten (Roberts et al. 2007). *CBL* liegt im Vergleich zu anderen RASopathie-assoziierten Regulatoren des RAS-MAPK-Signalwegs am weitesten *upstream*; diese funktionelle Position von *CBL* und die Vielzahl der nachgeschalteten Signalwege könnte als Erklärung für die starke klinische Variabilität von Patienten mit *CBL*-Keimbahnmutationen dienen.

Mit der Beschreibung einer weiteren regulatorischen Stufe im RASopathie-Proteinnetzwerk, dem *trafficking* von Wachstumsfaktor-Rezeptoren *upstream* des RAS-MAPK-Signalwegs, konnte im Rahmen dieser Arbeit eine wachsende funktionelle Variabilität von RASopathie-assoziierten Proteinveränderungen untermauert werden. Die hier beschriebene funktionelle Charakterisierung der das Noonan-Syndrom verursachenden *CBL*-Mutationen liefert damit neue und wichtige Aspekte für ein besseres Verständnis der Pathophysiologie von RASopathien. Die hier präsentierten Ergebnisse weisen auf ein noch breiteres Spektrum der genetischen Ursachen für RASopathien hin: Auch Genen, die für Proteine mit Funktion bei der Regulation des EGFR-*trafficking* (und evtl. anderer Rezeptoren) *upstream* des RAS-MAPK-Signalwegs kodieren, sind potentielle Krankheitsgene.

6.2 RRAS als Signalmodul für die Regulierung von Integrinen

Das zentrale Ziel im zweiten Teil dieser Arbeit war die Aufklärung der molekularen Mechanismen bei der RRAS-abhängigen Regulation von Integrinen und fokalen Adhäsionen. Dabei wurden drei Arbeitshypothesen verfolgt: (i) RRAS als „*triggering adapter*“ von Talin, (ii) RRAS als Rekrutor für RIAM, einem Talin Bindepartner und (iii) RRAS als Aktivator von RAP1, einem *signaling*-Protein *upstream* von Talin. Es konnte gezeigt werden, dass RRAS nicht als Aktivator von RAP1, jedoch möglicherweise als direkter „*triggering adapter*“ von Talin fungiert. RIAM könnte dabei als Rekrutor von RRAS benötigt werden.

RRAS ist einerseits in der Lage Integrine zu aktivieren und die Komposition bzw. Dynamik von fokalen Adhäsionen zu regulieren, was einem *inside-out-signaling* entspricht (Kinbara et al. 2003; Furuholm und Peränen 2003; Zhang et al. 1996); andererseits kann RRAS nach Integrin-Liganden Bindung im Sinne eines *outside-in-signaling* aktiviert werden, wozu es allerdings erst wenige Studien gibt (Sandri et al. 2012). Daher sollte in dieser Arbeit die bereits postulierte Integrin-vermittelte Aktivierung von RRAS überprüft werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der Integrine mit dem EZM-Protein Fibronectin zu einer 2,7-fachen Erhöhung der RRAS-Aktivierung in stabil RRAS^{WT}-exprimierenden COS7-Zellen führt. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde beschrieben, dass EZM-gebundene, aktivierte Integrine eine GEF-vermittelte Aktivierung von RRAS stimulieren. Allerdings ist noch unklar, welche GEFs dabei die Aktivierung von RRAS vermitteln (Sandri et al. 2012). Zusammen weisen diese und unsere Daten darauf hin, dass RRAS durch Stimulation der Integrine aktiviert wird; was somit auf eine Integrin-vermittelte RRAS-Aktivierung im Sinne eines *outside-in-signaling* schließen lässt.

RRAS-abhängige Signalwege führen zur Integrin-Aktivierung, allerdings scheint RRAS diese nicht über eine direkte Interaktion mit den Integrinen zu stimulieren (Kinbara et al. 2003; Sethi et al. 1999; Zhang et al. 1996), was zu der Hypothese führte, dass RRAS die Regulation von Integrinen und fokalen Adhäsionen über alternative molekulare Mechanismen und weitere, zwischengeschaltete Proteine

reguliert. Durch eine ungerichtete Suche nach potentiellen RRAS Protein-Protein-Bindepartnern, mittels Koimmunpräzipitationen (KoIPs) und Massenspektrometrie, konnten allerdings keine neuen RRAS-Bindepartner identifiziert werden. Sodann wurde mit einer gerichteten Suche nach RRAS-Bindepartnern begonnen. Es liegen Hinweise vor, dass RAS-GTPasen an der Talin-vermittelten Integrin-Aktivierung beteiligt sind (Kinbara et al. 2003). Mit Hilfe von KoIPs konnte nach Expression von RRAS^{G38V}, aber nicht nach Expression von RRAS^{WT}, eine Interaktion mit Talin1 nachgewiesen werden. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass in Talin-defizienten Zellen RRAS nicht mehr in der Lage ist Integrine zu aktivieren (Tadokoro et al. 2003). Strukturdaten aus der Literatur lassen vermuten, dass RRAS an die F0-Domäne von Talin1-*head* bindet (Huang et al. 1998; Goult et al. 2010), jedoch konnte in dieser Arbeit durch KoIPs weder eine Bindung von RRAS^{WT}, noch von konstitutiv aktivem RRAS^{G38V} an den Talin1-*head* nachgewiesen werden.

Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass RRAS im aktivierten Zustand gemeinsam mit Talin1 in einem Proteinkomplex auftritt. Allerdings bleibt noch zu klären, ob RRAS direkt oder über andere Proteine indirekt mit Talin1 interagiert und welche Proteinmotive diese Bindungen ermöglichen. Um dieser Fragestellung nachzugehen und die vorläufigen Ergebnisse hinsichtlich einer Talin::RRAS-Interaktion zu überprüfen, wird derzeit im Rahmen einer Kollaboration mit dem Strukturbiologen und ausgewiesenen Talin-Experten Dr. Igor Barsukov (*Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Großbritannien*) die Interaktion zwischen RRAS und Talin mittels NMR (*nuclear magnetic resonance*) überprüft. RRAS unterscheidet sich zu anderen RAS-GTPasen (HRAS, NRAS, KRAS) durch einen einzigartigen NH₂-Terminus, bestehend aus 26 zusätzlichen Aminosäuren (AS) mit völlig unbekannter Funktion (Lowe und Goeddel 1987). Diese 26 zusätzlichen NH₂-terminalen AS könnten die Spezifität der Interaktion zwischen RRAS und Talin vermitteln und daher wurden im Rahmen dieser Arbeit RRAS-Expressionskonstrukte für RRAS ohne die 26 zusätzlichen NH₂-terminalen AS und für RRAS inkl. der 26 AS generiert, welche derzeit von Dr. Barsukov für die NMR-Untersuchungen genutzt werden.

Wie für RRAS, wurde für die kleine GTPase RAP1 eine Funktion bei der Aktivierung von Integrinen beschrieben (Zhang et al. 1996; Bos 2005; Kooistra et al. 2007). RAP1 vermittelt dabei über eine Interaktion mit dessen Effektor- und Adapterprotein RIAM (Lafuente et al. 2004) die Rekrutierung von Talin an die fokalen Adhäsionen. Aufgrund der ähnlichen strukturellen Gegebenheiten von RRAS und RAP1 (siehe Einleitung), wäre auch eine Interaktion von RRAS mit RIAM und so eine Rekrutierung von Talin1 denkbar. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von KoIPs eine Interaktion von RRAS^{WT}, RRAS^{G38V} bzw. RRAS^{S43N} mit RIAM in COS7-Zellen nachgewiesen werden. Da sowohl konstitutiv aktives RRAS (RRAS^{G38V}), als auch inaktives RRAS (RRAS^{S43N}) mit RIAM kopräzipitiert, scheint diese Interaktion unabhängig vom RRAS-Aktivitätszustand zu sein. Eine solche, vom Aktivitätszustand unabhängige, Interaktion von RRAS wurde bereits für das Adapterprotein Nck (*non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1*) beschrieben. Nck kann sowohl an aktives, als auch an inaktives RRAS binden, was so interpretiert wird, dass Nck eher als Adapter, und nicht als Effektor *downstream* von RRAS fungiert (Wang et al. 2000). Ob RAP1 nur im GTP-gebundenen Zustand mit RIAM einen Integrin-Aktivierungskomplex initiieren kann wird bisher noch kontrovers diskutiert: In einer dieser Studien wurde gezeigt, dass der RAP1-RIAM-Komplex, unabhängig vom RAP1-Aktivitätszustand, Talin an die Plasmamembran rekrutieren kann, um dort eine Integrin-Aktivierung zu initiieren (Lee et al. 2009), während in den anderen Berichten RAP1 nur im aktiven Zustand mit RIAM interagieren kann (Han et al. 2006; Lafuente et al. 2004). Die Arbeitshypothese, dass RRAS an der Plasmamembran *upstream* von RAP1 dessen Aktivierung initiiert, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, denn die Expression von konstitutiv aktivem RRAS^{G38V} in COS7-Zellen führte zu keiner erhöhten RAP1A- bzw. RAP1B-Aktivierung.

Zusammengenommen weisen die bisherigen Ergebnisse aus dem zweiten Teil dieser Arbeit darauf hin, dass RRAS unabhängig vom Aktivitätszustand mit RIAM interagieren kann; eine schwache direkte oder indirekte Interaktion mit Talin1 konnte hingegen nur für die GTP-gebundene RRAS-Proteinvariante (RRAS^{G38V}) festgestellt werden.

Diese Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass RIAM nicht wie ursprünglich in der Arbeitshypothese angenommen von RRAS an die Plasmamembran rekrutiert wird, sondern dass RRAS sowohl im GDP- als auch im GTP-gebundenen Zustand von RIAM an die Plasmamembran rekrutiert und dort von derzeit noch unbeschriebenen Aktivatoren (GEF-Proteinen) aktiviert wird. Aktives RRAS könnte sodann Talin an die Plasmamembran rekrutieren, um dort schließlich die Integrin-Aktivierung zu initiieren. Der genaue Mechanismus bei diesem letzten Schritt der RRAS-abhängigen Aktivierung der Integrine bleibt noch zu klären.

Die hier präsentierten Daten geben erste Hinweise auf die Funktion von RRAS bei der Talin-vermittelten Integrin-Aktivierung. Zukünftige experimentelle Analysen werden ein detailliertes Bild der Rolle von RRAS bei der Steuerung der Integrinbiologie geben und so schlussendlich zu einem umfassenderen Verständnis der Pathophysiologie von RASopathien beitragen.

7 Literaturverzeichnis

Abram, Clare L.; Lowell, Clifford A. (2009): **The ins and outs of leukocyte integrin signaling**. In: *Annual review of immunology* 27, S. 339–362.

Ahearn, Ian M.; Haigis, Kevin; Bar-Sagi, Dafna; Philips, Mark R. (2012): **Regulating the regulator: post-translational modification of RAS**. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (1), S. 39–51.

Allanson, Judith E.; Bohring, Axel; Dörr, Helmuth-Guenther; Dufke, Andreas; Gillesen-Kaesbach, Gabrielle; Horn, Denise et al. (2010): **The face of Noonan syndrome: Does phenotype predict genotype**. In: *American journal of medical genetics. Part A* 152A (8), S. 1960–1966.

Anthis, Nicholas J.; Wegener, Kate L.; Ye, Feng; Kim, Chungo; Goult, Benjamin T.; Lowe, Edward D. et al. (2009): **The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction**. In: *EMBO J.* 28 (22), S. 3623–3632.

Aoki, Yoko; Niihori, Tetsuya; Banjo, Toshihiro; Okamoto, Nobuhiko; Mizuno, Seiji; Kurosawa, Kenji et al. (2013): **Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome**. In: *American journal of human genetics* 93 (1), S. 173–180.

Aoki, Yoko; Niihori, Tetsuya; Narumi, Yoko; Kure, Shigeo; Matsubara, Yoichi (2008): **The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders**. In: *Human mutation* 29 (8), S. 992–1006.

Bache, Kristi G.; Slagsvold, Thomas; Stenmark, Harald (2004): **Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer**. In: *The EMBO journal* 23 (14), S. 2707–2712.

Barbacid, M. (1990): **ras oncogenes: their role in neoplasia**. In: *European journal of clinical investigation* 20 (3), S. 225–235.

Binder, Gerhard (2009): **Noonan syndrome, the Ras-MAPK signalling pathway and short stature**. In: *Hormone research* 71 Suppl 2, S. 64–70.

- Bos, J. L. (1989): **ras oncogenes in human cancer: a review**. In: *Cancer research* 49 (17), S. 4682–4689.
- Bos, Johannes L. (2005): **Linking Rap to cell adhesion**. In: *Curr Opin Cell Biol* 17 (2), S. 123–128.
- Calderwood, D. A. (2004): **Talin controls integrin activation**. In: *Biochem Soc Trans* 32 (Pt3), S. 434–437.
- Calderwood, David A.; Yan, Boxu; Pereda, Jose M. de; Alvarez, Begoña García; Fujioka, Yosuke; Liddington, Robert C.; Ginsberg, Mark H. (2002): **The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins**. In: *J. Biol. Chem.* 277 (24), S. 21749–21758.
- Caligiuri, Michael A.; Briesewitz, Roger; Yu, Jianhua; Wang, Lisheng; Wei, Min; Arnoczky, Kristy J. et al. (2007): **Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia**. In: *Blood* 110 (3), S. 1022–1024.
- Conklin, Matthew W.; Ada-Nguema, Aude; Parsons, Maddy; Riching, Kristin M.; Keely, Patricia J. (2010): **R-Ras regulates beta1-integrin trafficking via effects on membrane ruffling and endocytosis**. In: *BMC cell biology* 11, S. 14.
- Cordeddu, Viviana; Di Schiavi, Elia; Pennacchio, Len A.; Ma'ayan, Avi; Sarkozy, Anna; Fodale, Valentina et al. (2009): **Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair**. In: *Nature genetics* 41 (9), S. 1022–1026.
- Critchley, David R. (2009): **Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin**. In: *Annual review of biophysics* 38, S. 235–254.
- Dhillon, A. S.; Hagan, S.; Rath, O.; Kolch, W. (2007): **MAP kinase signalling pathways in cancer**. In: *Oncogene* 26 (22), S. 3279–3290.
- Dikic, Ivan; Schmidt, Mirko H H (2007): **Malfunctions within the Cbl interactome uncouple receptor tyrosine kinases from destructive transport**. In: *European journal of cell biology* 86 (9), S. 505–512.

- Donovan, Shane; Shannon, Kevin M.; Bollag, Gideon (2002): **GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling**. In: *Biochimica et biophysica acta* 1602 (1), S. 23–45.
- Elliott, Paul R.; Goult, Benjamin T.; Kopp, Petra M.; Bate, Neil; Grossmann, J. Günter; Roberts, Gordon C K et al. (2010): **The Structure of the talin head reveals a novel extended conformation of the FERM domain**. In: *Structure (London, England : 1993)* 18 (10), S. 1289–1299.
- Fang, S.; Weissman, A. M. (2004): **A field guide to ubiquitylation**. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61 (13), S. 1546–1561.
- Flex, Elisabetta; Jaiswal, Mamta; Pantaleoni, Francesca; Martinelli, Simone; Strullu, Marion; Fansa, Eyad K. et al. (2014): **Activating mutations in RRAS underlie a phenotype within the RASopathy spectrum and contribute to leukaemogenesis**. In: *Human molecular genetics* 23 (16), S. 4315–4327.
- Furuhjelm, Johanna; Peränen, Johan (2003): **The C-terminal end of R-Ras contains a focal adhesion targeting signal**. In: *Journal of cell science* 116 (Pt 18), S. 3729–3738.
- Futter, C. E.; Pearse, A.; Hewlett, L. J.; Hopkins, C. R. (1996): **Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes**. In: *The Journal of cell biology* 132 (6), S. 1011–1023.
- García-Alvarez, Begoña; Pereda, José M. de; Calderwood, David A.; Ulmer, Tobias S.; Critchley, David; Campbell, Iain D. et al. (2003): **Structural determinants of integrin recognition by talin**. In: *Mol. Cell* 11 (1), S. 49–58.
- Geiger, Benjamin; Yamada, Kenneth M. (2011): **Molecular architecture and function of matrix adhesions**. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (5).
- Génin, Emmanuelle; Feingold, Josué; Clerget-Darpoux, Françoise (2008): **Identifying modifier genes of monogenic disease: strategies and difficulties**. In: *Human genetics* 124 (4), S. 357–368.
- Gluzman, Y. (1981): **SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants**. In: *Cell* 23 (1), S. 175–182.

- Gotoh, T.; Niino, Y.; Tokuda, M.; Hatase, O.; Nakamura, S.; Matsuda, M.; Hattori, S. (1997): **Activation of R-Ras by Ras-guanine nucleotide-releasing factor**. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (30), S. 18602–18607.
- Goult, Benjamin T.; Bouaouina, Mohamed; Elliott, Paul R.; Bate, Neil; Patel, Bipin; Gingras, Alexandre R. et al. (2010): **Structure of a double ubiquitin-like domain in the talin head: a role in integrin activation**. In: *The EMBO journal* 29 (6), S. 1069–1080.
- Haglund, Kaisa; Dikic, Ivan (2012): **The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting**. In: *Journal of cell science* 125 (Pt 2), S. 265–275.
- Hall, Amy B.; Jura, Natalia; DaSilva, John; Jang, Yeon Joo; Gong, Delquin; Bar-Sagi, Dafna (2003): **hSpry2 is targeted to the ubiquitin-dependent proteasome pathway by c-Cbl**. In: *Current biology : CB* 13 (4), S. 308–314.
- Han, Jaewon; Lim, Chinten James; Watanabe, Naohide; Soriani, Alessandra; Ratnikov, Boris; Calderwood, David A. et al. (2006): **Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin α 5 β 3**. In: *Current biology : CB* 16 (18), S. 1796–1806.
- Huang, L.; Hofer, F.; Martin, G. S.; Kim, S. H. (1998): **Structural basis for the interaction of Ras with RaIGDS**. In: *Nat Struct Biol* 5 (6), S. 422–426.
- Huff, S. Y.; Quilliam, L. A.; Cox, A. D.; Der, C. J. (1997): **R-Ras is regulated by activators and effectors distinct from those that control Ras function**. In: *Oncogene* 14 (2), S. 133–143.
- Hurley, James H. (2008): **ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies**. In: *Current opinion in cell biology* 20 (1), S. 4–11.
- Ito, W.; Ishiguro, H.; Kurosawa, Y. (1991): **A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction**. In: *Gene* 102 (1), S. 67–70.
- Jiang, Xuejun; Huang, Fangtian; Marusyk, Andriy; Sorkin, Alexander (2003): **Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits**. In: *Molecular biology of the cell* 14 (3), S. 858–870.

- Jiang, Xuejun; Sorkin, Alexander (2003): **Epidermal growth factor receptor internalization through clathrin-coated pits requires Cbl RING finger and proline-rich domains but not receptor polyubiquitylation.** In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 4 (8), S. 529–543.
- Karnoub, Antoine E.; Weinberg, Robert A. (2008): **Ras oncogenes: split personalities.** In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (7), S. 517–531.
- Kaufman, R. J.; Murtha, P.; Davies, M. V. (1987): **Translational efficiency of polycistronic mRNAs and their utilization to express heterologous genes in mammalian cells.** In: *The EMBO journal* 6 (1), S. 187–193.
- Kinbara, Kayoko; Goldfinger, Lawrence E.; Hansen, Malene; Chou, Fan-Li; Ginsberg, Mark H. (2003): **Ras GTPases: integrins' friends or foes?** In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 4 (10), S. 767–776.
- Kooistra, Matthijs R H; Dube, Nadia; Bos, Johannes L. (2007): **Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation.** In: *J Cell Sci* 120 (Pt 1), S. 17–22.
- Lafuente, Esther M.; van Puijenbroek, Andre A F L; Krause, Matthias; Carman, Christopher V.; Freeman, Gordon J.; Berezovskaya, Alla et al. (2004): **RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion.** In: *Dev Cell* 7 (4), S. 585–595.
- Lee, Ho-Sup; Lim, Chinten James; Puzon-McLaughlin, Wilma; Shattil, Sanford J.; Ginsberg, Mark H. (2009): **RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences.** In: *The Journal of biological chemistry* 284 (8), S. 5119–5127.
- Levkowitz, G.; Waterman, H.; Ettenberg, S. A.; Katz, M.; Tsygankov, A. Y.; Alroy, I. et al. (1999): **Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1.** In: *Molecular cell* 4 (6), S. 1029–1040.
- Levkowitz, G.; Waterman, H.; Zamir, E.; Kam, Z.; Oved, S.; Langdon, W. Y. et al. (1998): **c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor.** In: *Genes & development* 12 (23), S. 3663–3674.

Loh, Mignon L.; Sakai, Debbie S.; Flotho, Christian; Kang, Michelle; Fliegau, Manfred; Archambeault, Sophie et al. (2009): **Mutations in CBL occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia**. In: *Blood* 114 (9), S. 1859–1863.

Lowe, D. G.; Goeddel, D. V. (1987): **Heterologous expression and characterization of the human R-ras gene product**. In: *Molecular and cellular biology* 7 (8), S. 2845–2856.

Madshus, Inger Helene; Stang, Espen (2009): **Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking**. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 19), S. 3433–3439.

Makishima, Hideki; Cazzolli, Heather; Szpurka, Hadrian; Dunbar, Andrew; Tiu, Ramon; Huh, Jungwon et al. (2009): **Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies**. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (36), S. 6109–6116.

Margarit, S. Mariana; Sondermann, Holger; Hall, Brian E.; Nagar, Bhushan; Hoelz, Andre; Pirruccello, Michelle et al. (2003): **Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS**. In: *Cell* 112 (5), S. 685–695.

Marte, B. M.; Rodriguez-Viciana, P.; Wennström, S.; Warne, P. H.; Downward, J. (1997): **R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways**. In: *Current biology : CB* 7 (1), S. 63–70.

Martinelli, Simone; Luca, Alessandro de; Stellacci, Emilia; Rossi, Cesare; Checquolo, Saula; Lepri, Francesca et al. (2010): **Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype**. In: *American journal of human genetics* 87 (2), S. 250–257.

McHugh, Brian J.; Buttery, Robert; Lad, Yatish; Banks, Stephen; Haslett, Christopher; Sethi, Tariq (2010): **Integrin activation by Fam38A uses a novel mechanism of R-Ras targeting to the endoplasmic reticulum**. In: *Journal of cell science* 123 (Pt 1), S. 51–61.

Milburn, M. V.; Tong, L.; deVos, A. M.; Brünger, A.; Yamaizumi, Z.; Nishimura, S.; Kim, S. H. (1990): **Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins.** In: *Science (New York, N.Y.)* 247 (4945), S. 939–945.

Miranda, Manuel; Sorkin, Alexander (2007): **Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms.** In: *Molecular interventions* 7 (3), S. 157–167.

Muramatsu, Hideki; Makishima, Hideki; Jankowska, Anna M.; Cazzolli, Heather; O'Keefe, Christine; Yoshida, Nao et al. (2010): **Mutations of an E3 ubiquitin ligase c-Cbl but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia.** In: *Blood* 115 (10), S. 1969–1975.

Nadeau, J. H. (2001): **Modifier genes in mice and humans.** In: *Nature reviews. Genetics* 2 (3), S. 165–174.

Niemeyer, Charlotte M.; Kang, Michelle W.; Shin, Danielle H.; Furlan, Ingrid; Erlacher, Miriam; Bunin, Nancy J. et al. (2010): **Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia.** In: *Nature genetics* 42 (9), S. 794–800.

Pérez, B.; Mechinaud, F.; Galambrun, C.; Ben Romdhane, N.; Isidor, B.; Philip, N. et al. (2010): **Germline mutations of the CBL gene define a new genetic syndrome with predisposition to juvenile myelomonocytic leukaemia.** In: *Journal of medical genetics* 47 (10), S. 686–691.

Pickart, C. M.; VanDemark, A. P. (2000): **Opening doors into the proteasome.** In: *Nature structural biology* 7 (11), S. 999–1001.

Piper, Robert C.; Lehner, Paul J. (2011): **Endosomal transport via ubiquitination.** In: *Trends in cell biology* 21 (11), S. 647–655.

PUCK, T. T.; CIECIURA, S. J.; ROBINSON, A. (1958): **Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.** In: *The Journal of experimental medicine* 108 (6), S. 945–956.

Roberts, Amy E.; Allanson, Judith E.; Tartaglia, Marco; Gelb, Bruce D. (2013): **Noonan syndrome.** In: *Lancet* 381 (9863), S. 333–342.

- Roberts, Amy E.; Araki, Toshiyuki; Swanson, Kenneth D.; Montgomery, Kate T.; Schiripo, Taryn A.; Joshi, Victoria A. et al. (2007): **Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome**. In: *Nature genetics* 39 (1), S. 70–74.
- Roberts, Gordon C K; Critchley, David R. (2009): **Structural and biophysical properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin**. In: *Biophys Rev* 1 (2), S. 61–69.
- Rodriguez-Viciano, P.; Warne, P. H.; Dhand, R.; Vanhaesebroeck, B.; Gout, I.; Fry, M. J. et al. (1994): **Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras**. In: *Nature* 370 (6490), S. 527–532.
- Rodriguez-Viciano, Pablo; Oses-Prieto, Juan; Burlingame, Alma; Fried, Mike; McCormick, Frank (2006): **A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity**. In: *Molecular cell* 22 (2), S. 217–230.
- Rooij, J. de; Bos, J. L. (1997): **Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras**. In: *Oncogene* 14 (5), S. 623–625.
- Sanada, Masashi; Suzuki, Takahiro; Shih, Lee-Yung; Otsu, Makoto; Kato, Motohiro; Yamazaki, Satoshi et al. (2009): **Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms**. In: *Nature* 460 (7257), S. 904–908.
- Sandri, Chiara; Caccavari, Francesca; Valdembri, Donatella; Camillo, Chiara; Veltel, Stefan; Santambrogio, Martina et al. (2012): **The R-Ras/RIN2/Rab5 complex controls endothelial cell adhesion and morphogenesis via active integrin endocytosis and Rac signaling**. In: *Cell research* 22 (10), S. 1479–1501.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463–5467.
- Sargin, Bülent; Choudhary, Chunaram; Crosetto, Nicola; Schmidt, Mirko H H; Grundler, Rebekka; Rensinghoff, Marion et al. (2007): **Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML**. In: *Blood* 110 (3), S. 1004–1012.

- Scheffzek, K.; Ahmadian, M. R.; Kabsch, W.; Wiesmüller, L.; Lautwein, A.; Schmitz, F.; Wittinghofer, A. (1997): **The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants.** In: *Science (New York, N.Y.)* 277 (5324), S. 333–338.
- Schmidt, Mirko H.; Dikic, Ivan (2005): **The Cbl interactome and its functions.** In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (12), S. 907–918.
- Schubbert, Suzanne; Shannon, Kevin; Bollag, Gideon (2007): **Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer.** In: *Nature reviews. Cancer* 7 (4), S. 295–308.
- Self, A. J.; Caron, E.; Paterson, H. F.; Hall, A. (2001): **Analysis of R-Ras signalling pathways.** In: *Journal of cell science* 114 (Pt 7), S. 1357–1366.
- Sethi, T.; Ginsberg, M. H.; Downward, J.; Hughes, P. E. (1999): **The small GTP-binding protein R-Ras can influence integrin activation by antagonizing a Ras/Raf-initiated integrin suppression pathway.** In: *Molecular biology of the cell* 10 (6), S. 1799–1809.
- Shuman, S. (1991): **Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in Escherichia coli is sequence specific.** In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (22), S. 10104–10108.
- Sigismund, Sara; Algisi, Veronica; Nappo, Gilda; Conte, Alexia; Pascolutti, Roberta; Cuomo, Alessandro et al. (2013): **Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate.** In: *The EMBO journal* 32 (15), S. 2140–2157.
- Sigismund, Sara; Argenzio, Elisabetta; Tosoni, Daniela; Cavallaro, Elena; Polo, Simona; Di Fiore, Pier Paolo (2008): **Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation.** In: *Developmental cell* 15 (2), S. 209–219.
- Sigismund, Sara; Confalonieri, Stefano; Ciliberto, Andrea; Polo, Simona; Scita, Giorgio; Di Fiore, Pier Paolo (2012): **Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan.** In: *Physiological reviews* 92 (1), S. 273–366.

Sigismund, Sara; Woelk, Tanja; Puri, Claudia; Maspero, Elena; Tacchetti, Carlo; Transidico, Pietro et al. (2005): **Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos**. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (8), S. 2760–2765.

Slavotinek, Anne; Biesecker, Leslie G. (2003): **Genetic modifiers in human development and malformation syndromes, including chaperone proteins**. In: *Human molecular genetics* 12 Spec No 1, S. R45-50.

Sorkin, Alexander; Goh, Lai Kuan (2009): **Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs**. In: *Experimental cell research* 315 (4), S. 683–696.

Spaargaren, M.; Bischoff, J. R. (1994): **Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap**. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (26), S. 12609–12613.

Spaargaren, M.; Martin, G. A.; McCormick, F.; Fernandez-Sarabia, M. J.; Bischoff, J. R. (1994): **The Ras-related protein R-ras interacts directly with Raf-1 in a GTP-dependent manner**. In: *The Biochemical journal* 300 (Pt 2), S. 303–307.

Swaminathan, Gayathri; Tsygankov, Alexander Y. (2006): **The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling**. In: *J Cell Physiol* 209 (1), S. 21–43.

Tadokoro, Seiji; Shattil, Sanford J.; Eto, Koji; Tai, Vera; Liddington, Robert C.; de Pereda, Jose M et al. (2003): **Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation**. In: *Science* 302 (5642), S. 103–106.

Takaya, Akiyuki; Kamio, Takahiro; Masuda, Michitaka; Mochizuki, Naoki; Sawa, Hirofumi; Sato, Mami et al. (2007): **R-Ras regulates exocytosis by Rgl2/Rlf-mediated activation of RalA on endosomes**. In: *Molecular biology of the cell* 18 (5), S. 1850–1860.

Tartaglia, M.; Zampino, G.; Gelb, B. D. (2010): **Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis**. In: *Molecular syndromology* 1 (1), S. 2–26.

Tartaglia, Marco; Gelb, Bruce D.; Zenker, Martin (2011): **Noonan syndrome and clinically related disorders**. In: *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 25 (1), S. 161–179.

- Thien, C. B.; Walker, F.; Langdon, W. Y. (2001): **RING finger mutations that abolish c-Cbl-directed polyubiquitination and downregulation of the EGF receptor are insufficient for cell transformation.** In: *Molecular cell* 7 (2), S. 355–365.
- Thien, Christine B F; Langdon, Wallace Y. (2005): **c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses.** In: *The Biochemical journal* 391 (Pt 2), S. 153–166.
- Tidyman, William E.; Rauen, Katherine A. (2009): **The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation.** In: *Current opinion in genetics & development* 19 (3), S. 230–236.
- Urano, T.; Emkey, R.; Feig, L. A. (1996): **Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation.** In: *The EMBO journal* 15 (4), S. 810–816.
- Vetter, I. R.; Wittinghofer, A. (2001): **The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions.** In: *Science (New York, N.Y.)* 294 (5545), S. 1299–1304.
- Wang, B.; Zou, J. X.; Ek-Rylander, B.; Ruoslahti, E. (2000): **R-Ras contains a proline-rich site that binds to SH3 domains and is required for integrin activation by R-Ras.** In: *The Journal of biological chemistry* 275 (7), S. 5222–5227.
- Waterman, H.; Levkowitz, G.; Alroy, I.; Yarden, Y. (1999): **The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor.** In: *The Journal of biological chemistry* 274 (32), S. 22151–22154.
- Waterman, Hadassa; Katz, Menachem; Rubin, Chanan; Shtiegman, Keren; Lavi, Sara; Elson, Ari et al. (2002): **A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling.** In: *The EMBO journal* 21 (3), S. 303–313.
- Yoon, Seunghee; Seger, Rony (2006): **The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions.** In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 24 (1), S. 21–44.

Zaidel-Bar, R.; Cohen, M.; Addadi, L.; Geiger, B. (2004): **Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes**. In: *Biochemical Society transactions* 32 (Pt3), S. 416–420.

Zamir, E.; Geiger, B. (2001): **Components of cell-matrix adhesions**. In: *Journal of cell science* 114 (Pt 20), S. 3577–3579.

Zenker, Martin (2009): **Genetic and pathogenetic aspects of Noonan syndrome and related disorders**. In: *Hormone research* 72 Suppl 2, S. 57–63.

Zenker, Martin (2011): **Clinical manifestations of mutations in RAS and related intracellular signal transduction factors**. In: *Current opinion in pediatrics* 23 (4), S. 443–451.

Zhang, Z.; Vuori, K.; Wang, H.; Reed, J. C.; Ruoslahti, E. (1996): **Integrin activation by R-ras**. In: *Cell* 85 (1), S. 61–69.

Zheng, N.; Wang, P.; Jeffrey, P. D.; Pavletich, N. P. (2000): **Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases**. In: *Cell* 102 (4), S. 533–539.

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Brand K., Kentsch H., Glashoff C. & Rosenberger G. (2014). RASopathy-associated CBL germline mutations cause aberrant ubiquitylation and trafficking of EGFR. *Hum Mutat* 35 (11), S. 1372-81

Poster mit Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

Brand K., Kentsch H., Glashoff C. & Rosenberger G. (September 2014). Functional analysis of *CBL* germline mutations: aberrant EGFR trafficking underlies a Noonan syndrome-like phenotype. *3rd International Symposium on Protein Trafficking in Health and Disease, Hamburg.*

Brand K., Kentsch H. & Rosenberger G. (März 2014). Functional analysis of *CBL* germline mutations: aberrant EGFR trafficking underlies a Noonan syndrome-like phenotype. *26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Essen.*

Danksagung:

In erster Linie danke ich PD Dr. Georg Rosenberger für die Bereitstellung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge. Danke ganz besonders für die gewissenhafte und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Professor Dr. Kerstin Kutsche danke ich für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens und natürlich für die ständige Unterstützung, nicht nur bei der Durchsicht des Manuskripts.

Ich danke PD Dr. Hartwig Lüthen für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Flexibilität sich aufgrund besonderer „Umstände“ mit der Erstellung des Gutachtens zu beeilen.

Bei Vanessa van Rahden, Fanny Kortüm, Dennis Zorndt, Leona Trübe und Judith Koliwer möchte ich mich herzlich für die vielen hilfreichen Ratschläge, fruchtreichen Diskussionen in allen Labor- und Lebenslagen, euer offenes Ohr sowie für eure Freundschaft bedanken. Für die experimentelle Unterstützung möchte ich mich ganz besonders bei Verena Kolbe und Marika Pusch und den vielen lieben Praktikantinnen bedanken. Die Zusammenarbeit mit euch hat großen Spaß gemacht.

Ich danke auch allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Kutsche und AG Rosenberger für die tolle und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft. Ich habe mich von Anfang an sehr wohl bei euch gefühlt.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen Brüdern für die Unterstützung meines Studiums und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Ihr seid eine super tolle Familie. Am meisten möchte ich jedoch Nils und Eliah Flato dafür danken, dass sie mich in den letzten Monaten ertragen, mich ernährt und mir immer wieder ein Lächeln aufs Gesicht gezaubert haben. Und dann möchte ich noch Dir liebe/r Hope-Joy sagen: Ich freue mich auf Dich und entschuldige bitte, dass es die letzten Monate ziemlich turbulent war.

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegeben Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die verwendeten Literaturquellen sind im Literaturverzeichnis vollständig zitiert.

Hamburg, den 17.12.14



Kristina Brand