



LC-MS/MS-basierte Proteomanalyse der Auswirkungen pathogener HRAS-Varianten auf humane Keratinozyten

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat)

Vorgelegt von:

Thomas Mair

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie

Universität Hamburg

An der Universität Hamburg eingereichte Dissertation

Hamburg, April 2025

Gutachter:

- 1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Schlüter
- 2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. habil. Markus Perbandt

Prüfungskommission:

Vorsitz: Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Schlüter
Stellv. Vorsitz: Prof. Dr. rer. nat. Manfred Jücker
Dr. Marina Creydt

Datum der Disputation: 27.06.2025

Druckfreigabe:

02.07.2025

Diese Dissertation wurde im Zeitraum von Mai 2022 bis April 2025 in der Sektion für Massenspektrometrie und Proteomanalyse am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt

I. Publikationsliste

Publikationen

2025

Targeting the AKT/mTOR pathway attenuates the metastatic potential of colorectal carcinoma circulating tumor cells in a murine xenotransplantation model

Smit D, Pereira-Veiga T, Brauer H, Horn M, Nissen P, Mair T, Siebels B, Voß H, Zhuang R, Haider M, Loreth D, Iskhakova M, Lindemann B, Kött J, Cayrefourcq L, Wellbrock J, Schlüter H, Pantel K, Alix-Panabières C, Jücker M

MOL ONCOL. 2025

2024

Linking metabolism and histone acetylation dynamics by integrated metabolic flux analysis of Acetyl-CoA and histone acetylation sites.

Egger AS, Rauch E, Sharma S, Kipura T, Hotze M, Mair T, Hohenegg A, Kobler P, Heiland I, Kwiatkowski M

Mol Metab. 2024 Dec;90:102032.

Multiomic profiling of medulloblastoma reveals subtype-specific targetable alterations at the proteome and N-glycan level

Godbole S, Voß H, Gocke A, Schlumbohm S, Schumann Y, Peng B, Mynarek M, Rutkowski S, Dottermusch M, Dorostkar M, Korshunov A, Mair T, Pfister S, Kwiatkowski M, Hotze M, Neumann P, Hartmann C, Weis J, Liesche-Starnecker F, Guan Y, Moritz M, Siebels B, Struve N, Schlüter H, Schüller U, Krisp C, Neumann J

NAT COMMUN. 2024;15(1):6237.

The Histogenetic Origin of Malignant Cells Predicts Their Susceptibility towards Synthetic Lethality Utilizing the TK.007 System

Pallasch F, Freytag V, Kriegs M, Gatzemeier D, Mair T, Voss H, Riecken K, Dawood M, Fehse B, Efferth T, Schlüter H, Schumacher U CANCERS. 2024;16(12):.

2023

Rhizochalinin Exhibits Anticancer Activity and Synergizes with EGFR Inhibitors in Glioblastoma In Vitro Models

Dyshlovoy S, Hauschild J, Venz S, Krisp C, Kolbe K, Zapf S, Heinemann S, Fita K, Shubina L, Makarieva T, Guzii A, Rohlfing T, Kaune M, Busenbender T, Mair T, Moritz M, Poverennaya E, Schlüter H, Serdyuk V, Stonik V, Dierlamm J, Bokemeyer C, Mohme M, Westphal M, Lamszus K, von Amsberg G, Maire C

MOL PHARMACEUT. 2023;20(10):4994-5005.

PKA mediates modality-specific modulation of the mechanically gated ion channel PIEZO2 Schaefer I, Verkest C, Vespermann L, Mair T, Voß H, Zeitzschel N, Lechner S J BIOL CHEM. 2023;299(6):104782.

Wissenschaftliche Vorträge

2025 Talk: Investigation of immortalized human keratinocytes expressing pathogenic HRAS-variants using LC-MS/MS-based proteomics / Sino-German Mobility Program / Shanghai, China

2025 Talk: Thoracic Aortic Diseases: Identification of Diagnostic Biomarkers Using Proteomics Analysis / DGMS 2025 / Göttingen, Deutschland

2024 Talk: Thoracic Aortic Diseases: Identification of Diagnostic Biomarkers Using Proteomics Analysis / Sino-German Mobility Program / Hamburg, Deutschland

2024 Poster: Thoracic Aortic Diseases: Identification of Diagnostic Biomarkers Using Bottom-Up Proteome Analysis of Extracellular Vesicles and Parallel Reaction Monitoring of Plasma Samples / GSEV 2024 / Hamburg, Deutschland

2024 Talk: Thoracic Aortic Diseases: Identification of Diagnostic Biomarkers Using Proteomics Analysis / APMRS-CEEPC – 2024 / Wien, Österreich

2024 Poster: Investigating cancer cell line responses to the Herpes-simplex-virus thymidine kinase (HSV-TK)/ganciclovir (GCV) system using Bottom-Up Proteomics / UCCH Retreat 2024 / Reinstorf, Deutschland

2024 Poster: Exploring the impact of the expression of different HRAS variants on the proteome and phosphoproteome of human keratinocytes / DGMS – 2024 / Freising, Deutschland

2023 Talk: The impact of the expression of different HRAS variants on the proteome profile of human keratinocytes / APMRS – 2023 / Innsbruck, Österreich

2023 Poster: The impact of the expression of different HRAS variants on the proteome profile of human keratinocytes / DGMS – 2023 / Dortmund, Deutschland

2022 Poster: Improving the Quantification of Heavy Isotope-Labelled Histone Species / IMSC – 2022 / Maastricht, Niederlande

II. Inhaltsverzeichnis

١.	Publikationsliste			4	
	Pu	ıblika	atione	en	4
	W	issen	nscha	ftliche Vorträge	5
II.		Inha	ltsve	rzeichnis	6
III	•	Ał	bkürz	ungsverzeichnis	8
1.		Zusa	imme	enfassung	10
2.		Abst	ract.		12
3.		Einleitung			13
	3.:	3.1 RAS		Proteine und ihre Effektoren	13
	3.2	2	RAS-	assoziierte Pathologien	15
	3.3	3	HRA	S und die Epidermis	19
	3.4	4	LC-N	AS/MS-basierte Proteomik in der klinischen Forschung	20
4.		Ziels	etzur	ng	22
5.		Erge	bniss	ie	23
	5.	1	Verif	fizierung der Aminosäuresequenzen der HRAS-Varianten	23
	5.2	2	Initia	ale Investigation der HRAS-Varianten	27
	5.3	5.3 Cha		rakterisierung von HRAS ^{Gly13Arg} -exprimierenden Keratinozyten	29
		5.3.1	1	Überblick über Änderungen im Interaktom, im Proteom, und im Phosphoproteom	29
	5.3		2	Auswirkungen von HRAS ^{Gly13Arg} auf das Interaktom	31
		5.3.3	3	Auswirkungen von HRAS ^{Gly13Arg} auf das Proteom	36
		5.3.4	1	Auswirkungen von HRAS ^{Gly13Arg} auf das Phosphoproteom	40
	5.4	4	Char	rakterisierung von HRAS ^{Gly12Ser} -exprimierenden Keratinozyten	44
		5.4.1	1	Überblick über Änderungen im Interaktom, im Proteom, und im Phosphoproteom	44
		5.4.2	2	Auswirkungen von HRAS ^{Gly12Ser} auf das Interaktom	46
		5.4.3	3	Auswirkungen von HRAS ^{Gly12Ser} auf das Proteom	50
		5.4.4	1	Auswirkungen von HRAS ^{Gly12Ser} auf das Phosphoproteom	53
	5.!	5	Char	rakterisierung von HRAS ^{Gly12Val} -exprimierenden Keratinozyten	57
		5.5.1	1	Überblick über Änderungen im Interaktom, im Proteom, und im Phosphoproteom	57
		5.5.2	2	Auswirkungen von HRAS ^{Gly12Val} auf das Interaktom	59
		5.5.3	3	Auswirkungen von HRAS ^{Gly12Val} auf das Proteom	63
		5.5.4	1	Auswirkungen von HRAS ^{Gly12Val} auf das Phosphoproteom	67
	5.0	6	Verg	leich zwischen den HRAS-Varianten-exprimierenden Keratinozyten	71
		5.6.1	1	Interaktom	71
		5.6.2	2	Proteom	73

	5.6.3	3	Phosphoproteom	74
	5.6.4		Vergleich der Signalweganalysen	75
6.	Diskussion			77
6	.1	1 Die Auswirkungen von HRAS ^{Gly13Arg} auf humane Keratinozyten		
6	.2	Die Auswirkungen von HRAS ^{Gly12Ser} auf humane Keratinozyten		84
6.3		Die Auswirkungen von HRAS ^{Gly12Val} auf humane Keratinozyten		87
6.4 Vei		Verg	gleich der Varianten und Schlussfolgerung	90
7.	Ausblick			93
8.	8. Material und Methoden			94
8	3.1 M		hoden	94
	8.1.2	1	Zellkultur	94
	8.1.2	2	Erzeugung stabiler Zelllinien	94
	8.1.3	.1.3 (Ko-)Immunpräzipitation		95
	8.1.4	4	Tryptischer Verdau der Proben für die Proteom- und Phosphoproteomanalysen	95
	8.1.5	5	In-Gel-Verdau der Proben für die Interaktomanalyse	96
	8.1.6 8.1.7 8.1.8 8.1.9		Phosphopeptidanreicherung	96
			Flüssigchromatographie (LC) aller Proben	97
			Massenspetrometrische (MS) Messungen der Proteomproben	97
			MS-Messungen der Interaktom- und Phosphoproteomproben	98
	8.1.2	10	Datenprozessierung und -analyse	98
8	.2	Mat	erial	100
	8.2.2	1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	100
8.2.2		8.2.2 Chemikalien		101
	8.2.3	3	Software und Datenbanken	102
9.	Literaturliste			103
10.	10. Anhang			111
1	.0.1 Aufl		istung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS	111
1	0.2	Ergä	inzende Tabellen	112
10.3 Ergänzende Abbildungen				114
11.	Danksagung1			
12.	Eidesstattliche Versicherung12			122

III. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
3D	dreidimensional
ACN	Acetonitril
AGC	Automatische Verstärkungskontrolle (engl. Automatic Gain Control)
AmBiCa	Ammoniumbicarbonat
ANOVA	Varianzanalyse (engl. Analysis of Variance)
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
СоА	Koenzym A (engl. Coenzyme A)
CS	Costello-Syndrom
DDA	Datenabhängige Akquisition (engl. Data-Dependent Acquisition)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBS	Epidermolysis Bullosa Simplex
ECM	Extrazelluläre Matrix
EIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FA	Ameisensäure (engl. Formic Acid)
FACS	Durchflusszytometrie (engl. Fluorescence-Assisted Cell Sorting)
FDR	Falsch-Positiv-Rate (engl. False Discovery Rate)
GABA	Gamma-Aminobuttersäure (engl. Gamma-Aminobutyric Acid)
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-Diphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (engl. Guanine Nucleotide Exchange Factors)
GTP	Guanosin-Triphosphat
HAT	Histon-Acetylase
H-Brücke	Wasserstoffbrückenbindung
HCD	Kollisionsdissoziation höherer Energie (engl. Higher Energy Collisional Dissociation)
HRAS	Harvey Rat Sarcoma Virus
HSD	Echter signifikanter Unterschied (engl. Honest Significant Difference)
IAA	Iodoacetamid
IMAC	Metallaffinitäts-Ionenchromatographie
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
Ko-IP	Ko-Immunopräzipitation
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Virus
LC	Flüssigchromatographie (engl. Liquid Chromatography)
LEF	Lymphoid-verstärkender Faktor (engl. Lymphoid Enhancing Factor)
МАРК	Mitogen-aktivierte Protein Kinase (engl. Mitogen Activated Protein Kinase)
MeOH	Methanol
MOAC	Metalloxid-Affinitätschromatographie
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. Messenger Ribonucleic Acid)
MS	Massenspektrometrie

MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MuSK	Muskelspezifische Tyrosinkinase
NAD+	Nicotinamidadenindinukleotid
NET	Neutrophile Extrazelluläre Traps
NIRL	Nanosekunden-Infrarot-Laser
NRAS	Neuroblastoma Rat Sarcoma Virus
РАК	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. Principal Component Analysis)
РІЗК	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
PTM	Post-translationale Modifikation
RAP	RAS-verwandtes Protein
RAS	Rat Sarcoma Virus
RHO	RAS-Homolog
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (engl. Reverse Phase)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDC	Natriumdesoxycholat (engl. Sodium Desoxycholate)
SP3	Single-Pot, Solid-Phase Enhanced Sample Preparation
SRP	Signalerkennungspartikel (engl. Signal Recognition Particle)
TCF	T-Zellfaktor (engl. T-Cell Factor)
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TR	Schilddrüsenhormonrezeptor (engl. Thyroid Hormone Receptor)
UHPLC	Ultra High-Performance Flüssigchromatographie
UV	Ultraviolett
VSN	Varianzstabilisierende Normalisierung (engl. Variance Stabilizing Normalization)
WT	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Die kleine GTPase HRAS ist ein wichtiges Signalprotein, das an der epidermalen Homöostase beteiligt ist. Mutationen in HRAS führen zu Aminosäuresubstitutionen, welche weitreichende Auswirkungen haben und zum Beispiel zu Hauterkrankungen führen. Pathogene Keimbahnvarianten verursachen die nicht-mosaische RASopathie Costello-Syndrom (CS), eine seltene Entwicklungsstörung, die auch die Haut betrifft und bei >80 % der CS-Patienten mit der Variante HRAS^{Gly12Ser} assoziiert ist. Postzygotische Mutationen führen zu sogenannten mosaischen RASopathien, wie dem Nävus-Sebaceus-Syndrom, bei dem >85 % der Patienten die Variante HRAS^{Gly13Arg} aufweisen. Zudem findet sich die onkogene Variante HRAS^{Gly12Val} häufig in dermatologischen und anderen malignen Erkrankungen.

Alle HRAS-Varianten führen zu einer konstitutiven Aktivierung, jedoch bewirken sie jeweils unterschiedliche epidermale Phänotypen mit spezifischen molekularen Veränderungen. Um diese Effekte zu untersuchen, wurde die permanente humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT herangezogen, welche wichtige epidermale Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Differenzierung beibehält. HaCaT-Zellen, die stabil verschiedene HRAS-Varianten exprimieren, wurden mittels LC-MS/MS-basierter Bottom-Up-Proteomik analysiert. Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) in Kombination mit LC-MS/MS diente zur Untersuchung von Protein-Interaktionspartnern, gefolgt von Analysen des Gesamtzell-Proteoms und des Phosphoproteoms zur Bestimmung der Änderungen von Proteinabundanzen und Phosphorylierungsmustern.

Signifikante Unterschiede wurden auf allen Ebenen festgestellt: im Interaktom, im Proteom und im Phosphoproteom. Alle Varianten führten zu einer verstärkten Interaktion zwischen HRAS und bekannten RAS-Effektorproteinen wie RAF1, RIN1 und MLLT4/AFDN, was einige Veränderungen im bewirkte. Insgesamt verursachte HRAS^{Gly13Arg} (Phospho-)Proteom die ausgeprägtesten Verschiebungen im Interaktom, wobei mehrere hundert Proteine signifikante Veränderungen in ihrer Abundanz zeigten. Auch deutliche Veränderungen im Proteom und im Phosphoproteom wurden beobachtet, darunter die Aktivierung der Zytoskelett-Reorganisation, des Vesikel-mediierten Transports, des Immunsystems sowie der Apoptose. Die Variante HRAS^{Gly12Ser} bewirkte eine weniger ausgeprägte Veränderung des Interaktoms und zeigte entsprechend geringere Auswirkungen auf das (Phospho-)Proteom. RAS-RAF-MAPK-Signaling und Apoptose wurden verstärkt, während Zytoskelett-Signaling beeinträchtigt war. HRAS^{Gly12Val} führte zu einer erhöhten Reorganisation des Zytoskeletts, verstärktem RAS-RAF-MAPK-Signaling und vermehrten Zelloberflächeninteraktionen, während intrazelluläres Signaling herunterreguliert wurde.

Alle Varianten hatten Gemeinsamkeiten, wie Änderungen der zellulären Architektur und Dynamik, aber auch eine Beeinträchtigung der Genexpression und Transkription sowie Störungen der epidermalen Homöostase. Nichtsdestotrotz führten alle HRAS-Varianten zu einem individuellen Proteomprofil, was die Bedeutung der Investigation jeder einzelnen Varianten-assoziierten Pathologie unterstreicht.

Insgesamt liefert diese Studie wertvolle Einblicke in die durch HRAS-Mutationen verursachten Veränderungen im Proteom und hebt hervor, welche Verschiebungen in Signalwegen und zellulären Prozessen den Krankheiten zugrunde liegen.

2. Abstract

The small GTPase HRAS is a crucial signaling protein which is involved in epidermal homeostasis. Mutations in HRAS lead to amino acid substitutions that can have a wide range of implications, e.g., in skin disorders. Pathogenic germline variants cause the non-mosaic RASopathy Costello Syndrome (CS), a rare developmental disorder affecting the skin, with >80% of CS patients carrying the HRAS^{Gly12Ser} variant. Post-zygotic variants result in so called mosaic RASopathies, such as the Nevus Sebaceous syndrome, in which >85% of patients exhibit the HRAS^{Gly13Arg} variant. Lastly, the oncogenic variant HRAS^{Gly12Val} is frequently found in dermatological and other malignancies.

All HRAS variants lead to constitutive activation, but each variant causes a different epidermal phenotype with unique underlying shifts on a molecular level. These effects were explored using the permanent human keratinocyte cell line HaCaT, which preserves crucial epidermal traits, such as the ability to differentiate. HaCaT cells stably expressing HRAS variants were analysed using LC-MS/MS-based bottom-up proteomics. Co-Immunoprecipitation in combination with LC-MS/MS identified shifts in protein interaction partners, followed by whole cell proteome and phosphoproteome analyses to determine alterations in protein abundances and in phosphorylation patterns.

Significant differences were observed at all levels: interactome, proteome, and phosphoproteome. All variants caused increased interaction between HRAS and well-studied RAS-effectors such as RAF1, RIN1, and MLLT4/AFDN, which could be linked to some of the subsequent changes in the (phospho-)proteome downstream. Overall, HRAS^{Giy13Arg} caused the most pronounced shift in the interactome, with several hundred proteins showing significant abundance changes. Notable shifts in the proteome and phosphoproteome were observed as well, including activation of cytoskeleton reorganisation, vesicle-mediated transport, the immune system, but also apoptosis. HRAS^{Giy12Ser} caused a less extensive shift in the interactome, with fewer changes in the (phospho-)proteome. RAS-RAF-MAPK-signaling and apoptosis were activated, while cytoskeleton signaling was impaired. HRAS^{Giy12Val} increased cytoskeletal rearrangement, RAS-RAF-MAPK-signaling, and cell surface interactions, while intracellular signaling was reduced.

All variants exhibited similarities, such as changes in cellular architecture and dynamic, but also impaired gene expression and transcription as well as disruptions to epidermal homeostasis. Nevertheless, each HRAS variant showed a distinct proteomic profile, highlighting the importance of investigating these pathologies individually. All in all, this work gives a valuable insight into changes caused by HRAS mutations, highlighting distinct changes in signaling pathways and cellular processes that contribute to disease pathogenesis.

3. Einleitung

3.1 RAS-Proteine und ihre Effektoren

Rat Sarcoma Virus (RAS)-Proteine sind kleine Guanosin-Triphosphat-(GTP)asen, die eine zentrale Rolle bei der Regulation diverser zellulärer Signalwege im Menschen spielen. Dabei agieren sie als binäre molekulare *Switches*, die entweder im aktiven, GTP-bindenden, oder im inaktiven, Guanosin-Diphosphat-(GDP-)bindenden Zustand vorliegen. Die Konvertierung zur aktiven Form wird über Guanin-Nukleotid-*Exchange*-Faktoren (GEFs) gesteuert. Die Rückkonvertierung zum inaktiven Zustand wird hingegen von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) stimuliert, welche die Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse erhöhen (siehe Abbildung 1).^[1,2] Eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung und Inaktivierung der RAS-Proteine spielt die Translokation: GEFs und GAPs werden zur Plasmamembran rekrutiert und in der Nähe von RAS-Proteinen platziert, um sie zu aktivieren oder zu inhibieren, ohne dabei direkt an das RAS-Protein zu binden.^[2] Auch einige Effektoren, welche von RAS aktiviert werden, werden lediglich in die unmittelbare Nähe von RAS transloziert.^[3] Allerdings kann auch die direkte Bindung mit RAS-Proteinen, sowie die lokale Lipidzusammensetzung in der Membran einen Effekt auf die Aktivierung von Effektoren haben.^[4]

Die Familie der RAS-Proteine umfasst die kanonischen Mitglieder *Harvey-RAS* (HRAS), *Kirsten-RAS* (KRAS) und *Neuroblastoma-RAS* (NRAS). Sie bilden den Ursprung der RAS-Superfamilie, die heute über 150 kleine GTPasen umfasst.^[5,6]



Abbildung 1: Ausgewählte RAS-Effektor-Signalwege und ihre Funktionen

RAS-Proteine spielen eine wichtige Rolle in zahlreichen Signalwegen, die beispielsweise Proliferation, Differenzierung, Migration, Endozytose, Überleben und den Zelltod betreffen (siehe Abbildung 1).^[7] Besonders bekannt sind RAS-Proteine aber für ihre Rolle in der Onkogenese, da RAS-Mutationen in ca. 30% aller humanen Krebsarten auftreten.^[8] Gut erforscht ist in diesem Zusammenhang der RAS-RAF-MAPK-Signalweg, der in rund einem Drittel aller humanen Krebsarten fehlerhaft aktiviert vorliegt.^[9,10] In Abwesenheit onkogener Mutationen steuert die Signalkaskade etwa die Proliferation, reguliert aber auch das Überleben und den Zellzyklus.^[11] Das geschieht über die Aktivierung einer RAS-GTPase, welche im Folgenden die Kinase RAF aktiviert.^[12] Anschließend phosphoryliert RAF die Kinase MEK, welche wiederum die Kinase ERK aktiviert. ERK transloziert schließlich in den Nukleus, wo es etwa Transkriptionsfaktoren und andere Substrate aktiviert.^[13]

Ein weiteres sehr bekanntes Beispiel für einen RAS-Effektor-Signalweg der ist Phosphoinositid-3-Kinase-(PI3K-)Signalweg. PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP₃), welches das Protein AKT aktiviert. Dadurch wird eine Vielzahl an Proteinen phosphoryliert, welche beispielsweise in das Zellwachstum, den Eintritt in den Zellzyklus und das Überleben der Zelle involviert sind. Auch RAC wird von PI3K aktiviert, ein Protein, welches an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt ist.^[14]

Neben den beiden genannten sehr gut erforschten RAS-Effektoren gibt es noch zahlreiche weitere Proteine, welche mit RAS interagieren. Dazu zählen etwa RAL-GEF-Proteine, die über Proteine wie RGL, RGL2, und RGL3 die kleinen GTPasen RALA und RALB aktivieren.^[15] RALs spielen allgemein eine Rolle bei vesikulärem Transport (sowohl bei der Endozytose als auch bei der Exozytose) und stehen auch in Verbindung mit zahlreichen Krebsarten.^[16,17] AFDN (auch MLLT4) besitzt ebenfalls eine RAS-bindende Domäne und spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung von *Adherens Junctions*, welche benachbarte Zellen miteinander verbinden.^[18,19] Es gibt beispielsweise Hinweise, dass AFDN mit dem Protein SCRIB einen Komplex ausbildet, der bei RAS-Aktivierung eine Rolle bei der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten und der Polarität spielt. Der AFDN-SCRIB-Komplex ist etwa bei der Anwesenheit von konstitutiv aktiviertem KRAS (KRAS^{G12V}) vermehrt vorzufinden.^[20] Auch RIN1 ist ein Interaktionspartner von HRAS. *HRAS-RIN1-Signaling* kann in RAB5-mediierte Endozytose oder in die direkte Aktivierung der ABL-Tyrosinkinase-Aktivität münden.^[21,22] ABL-Proteine regulieren den Umbau des Aktin-Zytoskeletts.^[23]

Andere bekannte Effektoren sind etwa PLCε, TIAM1, oder MEKK1. Während die Liste laufend länger wird, bleiben die physiologischen Rollen vieler Effektoren bislang aber ungeklärt.^[24]

3.2 RAS-assoziierte Pathologien

RAS-assoziierte Erkrankungen umfassen eine diverse Gruppe an Pathologien, die durch Keimbahn-, somatische, oder postzygotische Mutationen in RAS-Genen oder deren Signalwegkomponenten ausgelöst werden. Dazu gehören RASopathien, welche auf Mutationen am RAS-RAF-MAPK-Signalweg zurückzuführen sind, sowie zahlreiche maligne Tumore.^[25]

Die molekulare Grundlage dieser Erkrankungen liegt in der Struktur und Funktion der RAS-Proteine: Diese bestehen aus einem zentralen β -Faltblatt und fünf α -Helices, sowie zehn Loops. Von besonderer Bedeutung sind zwei Regionen, *Switch I* (Aminosäuren 32-40) und *Switch II* (Aminosäuren 60-72). Diese sind entscheidend für die Wechselwirkungen mit GAPs und GEFs, welche für Aktivierung bzw. Deaktivierung des Proteins verantwortlich sind. Einige Punktmutationen führen zum Austausch einzelner Aminosäuren in diesen Regionen, was die Tertiärstruktur beeinflusst und besonders in humanen Krebsarten eine wichtige Rolle spielt. Glycin-12 ist beispielsweise die am häufigsten mutierte Stelle in humanen Tumoren.^[6,26] Neben onkogenen Varianten gibt es auch weitere Mutationen, die etwa in bestimmten Hautkrankheiten wie dem Costello-Syndrom (CS) oder Nävus Sebaceus eine Rolle spielen.^[27,28]

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Auswirkungen dreier HRAS-Varianten auf das Proteom untersucht. Als Folge von Mutationen wurde Glycin-13 durch Arginin substituiert (Variante HRAS^{Gly13Arg}), Glycin-12 durch Serin (HRAS^{Gly12Ser}), und Glycin-12 durch Valin (HRAS^{Gly12Val}). Im Folgenden werden die Strukturen dieser Varianten sowie die jeweils assoziierten Pathologien näher erläutert.



Abbildung 2: (A) Proteinstruktur von HRAS^{WT}, exportiert aus AlphaFold. Die Aminosäuren, welche in den Varianten HRAS^{Gly12Ser}, HRAS^{Gly12Val} und HRAS^{Gly13Arg} ausgetauscht wurden (Glycin-12 und Glycin-13), sind hervorgehoben. **(B)-(E)** Strukturformeln der Aminosäuren **(B)** Glycin, **(C)** Arginin, **(D)** Serin, und **(E)** Valin

Um mögliche Auswirkungen der Aminosäure-Substitutionen zu verdeutlichen, wurde eine 3D-Struktur des Proteins HRAS^{WT} in *AlphaFold* angefertigt (siehe Abbildung 2A). Aus Abbildung 2 geht hervor, dass sich die Glycine, welche in den untersuchten Varianten substituiert wurden (Glycin-12 und Glycin-13), in einem Loop zwischen einer α -Helix und einem β -Faltblatt befinden.

Glycin-12 und Glycin-13 sind Teil der GTP-bindenden Domäne in HRAS, zusammen etwa mit Tyrosin-32 und Glutamin-61, welche auch Teil der zuvor genannten Switch I- und Switch II-Regionen sind. In **HRAS^{W™}** sind verschiedene Konformationen zwischen Tyrosin-32 und dem nächsten y-Phosphat-Sauerstoff von GTP möglich: Es kann eine direkte Wasserstoffbrückenbindung (H-Brücke) vorliegen, eine wasser-mediierte H-Brücke, oder keine H-Brücke. Dabei gilt die wasser-mediierte H-Brücke als katalytisch kompetent (die Hydrolyse von GTP findet also statt), während die direkte H-Brücke als katalytisch inkompetent gilt (die Hydrolyse von GTP ist nahezu unmöglich).^[29] In HRAS^{Gly12Val} liegt etwa, im Gegensatz zu HRAS^{WT}, eine eindeutige Präferenz zur direkten H-Brücke vor. Der Austausch von Glycin zu Valin ist also wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass die GAP-mediierte Hydrolyse von GTP zu GDP nicht mehr stattfinden kann.^[29,30] HRASGly12Val liegt also konstitutiv aktiviert vor und kann nicht mehr inaktiviert werden. Auch die anderen beiden Varianten, HRAS^{Gly13Arg} and HRAS^{Gly12Ser} sind konstitutiv aktiviert, über die genaueren Einflüsse auf die Proteinstruktur ist allerdings weniger bekannt.^[27,28]

Die chemischen Eigenschaften und Strukturformeln von Serin und Arginin lassen allerdings vermuten, dass der Einbau dieser Aminosäuren die Struktur noch stärker verändern könnte als Valin. Valin (siehe Abbildung 2E) ist eine kleine, apolare, aliphatische Aminosäure.^[31] Serin (siehe Abbildung 2D) ist dagegen eine polare Aminosäure, welche mit ihrer Hydroxygruppe auch H-Brückenbindungen eingehen kann.^[32] Arginin (siehe Abbildung 2C) ist die basischste aller Aminosäuren und ist bei einem physiologischen pH-Wert positiv geladen. Dadurch kann sie neben H-Brücken auch elektrostatische Interaktionen eingehen. Zudem hat Arginin eine deutlich längere Seitenkette als Valin und Serin.^[31]

Jedenfalls ist bekannt, dass alle beschriebenen HRAS-Varianten, HRAS^{Gly13Arg}, HRAS^{Gly13Arg}, und HRAS^{Gly12Val} unterschiedliche Phänotypen bzw. Pathologien hervorrufen. Die Variante HRAS^{Gly13Arg} ist mit der mosaischen RASopathie Nävus Sebaceus assoziiert, welche auf post-zygotische Mutationen zurückzuführen ist. Es handelt sich dabei um eine gutartige Hautläsion, die vorrangig die Kopfhaut und das Gesicht betrifft. Die Erscheinung ist durch unbehaarte, gelb-orangene Plaques gekennzeichnet (siehe Abbildung 3). Nävus Sebaceus ist ein Hamartom mit epidermalen, sebaceösen und apokrinen Elementen.^[28,33] Kommt es neben den genannten Symptomen zu zerebralen, okularen oder skeletalen Defekten, spricht man vom Schimmelpenning-Feuerstein-Mims-Syndrom.^[34] In einer von *Groesser et al.* durchgeführten Studie wurde festgestellt, dass von 65 Sebaceus Nävi 91% eine Substitution von Glycin-13 durch Arginin in HRAS aufwiesen (HRAS^{Gly13Arg}). Andere Fälle waren beispielsweise auch auf HRAS^{Gly12Ser} (5%) zurückzuführen, und in 5% der Fälle war KRAS anstelle von HRAS mutiert. Auch mehrfache Mutationen an den beiden Proteinen wurden nachgewiesen.^[28]



Abbildung 3: Kopf einer Person mit Nävus Sebaceus.[35]

Costello-Syndrom (CS) ist eine RASopathie, die auf eine aktivierende Keimbahnmutation zurückzuführen ist. Mehr als 95% der CS-bewirkenden HRAS-Genmutationen finden an den Glycinen 12 und 13 statt. Zu 80% kommt es zur Mutation p.G12S (HRAS^{Giy12Ser}), weshalb diese mit dem klassischen CS-Phänotyp assoziiert ist. Dabei handelt es sich um eine seltene Entwicklungsstörung, welche eine Vielzahl von Symptomen bedingt, darunter kraniofaziale Merkmale, kardiale Anomalien und Wachstums- und Entwicklungsstörungen. Hinzu kommen okulare, orthopädische, neurologische und dermatologische Probleme. Letztere zeigen sich etwa an loser, weicher Haut an Hals, Händen und Füßen, Hyperpigmentierung und allgemein frühzeitig alternder Haut. Mit zunehmendem Alter entwickeln sich zudem palmoplantare Keratose und Papillome im Gesicht. Weitere Merkmale von CS sind schütteres, krauses Haar, brüchige Finger- und Fußnägel sowie spachtelartige Fingerballen (siehe Abbildung 4).^[27] Neben p.G12S führen auch andere HRAS-Punktmutationen zum CS, darunter auch p.G12V (HRAS^{Giy2Val}). Diese Variante ist jedoch mit schwerer Kardiomyopathie und Tachykardie sowie Atemnot verbunden und führt zu einem frühen Tod.^[36]



Abbildung 4: Hände einer Person mit CS.[37]

Onkogene HRAS-Varianten kommen in 7% aller dermatologischen und sonstigen Tumoren vor. Besonders HRAS^{Gly12Val} besitzt eine hohe Transformationsfähigkeit und macht einen großen Anteil davon aus. Ursprünglich entdeckt wurde HRAS^{Gly12Val} im Zusammenhang mit Blasenkrebszelllinien.^[38,39] Allerdings ist heute bekannt, dass die Variante auch mit zahlreichen weiteren Krebsarten assoziiert ist, die etwa den oberen Verdauungstrakt, die Schilddrüse, oder die Haut betreffen. Letzteres zeigt sich etwa über Plattenepithelkarzinome, welches exemplarisch in Abbildung 5 abgebildet ist.^[40]



Abbildung 5: Person mit einem Plattenepithelkarzinom.[41]

3.3 HRAS und die Epidermis

Die HRAS-Varianten HRAS^{Gly13Arg}, HRAS^{Gly12Ser} und HRAS^{Gly12Val} weisen also alle einen epidermalen Phänotyp auf. Die Epidermis, also das äußere Epithel der Haut, schützt den Körper vor Umwelteinflüssen und besteht aus vier übereinanderliegenden Schichten von Keratinozyten, die sich konstant erneuern. Die Zellerneuerung beginnt in der basalen Schicht (*Stratum basale*), wo Keratinozyten proliferieren und mit der darunterliegenden Basalmembran verbunden bleiben. Einige Tochterzellen verlassen den Zellzyklus, wachsen und wandern ins *Stratum spinosum*, wo sie ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte ausbilden. Im *Stratum granulosum* werden die Keratinozyten flacher und bilden eine wasserundurchlässige Schicht aus. In der äußersten Schicht, im *Stratum corneum* (der Hornhaut), verlieren die Zellen ihre Organellen und vernetzen sich stark miteinander, wodurch sich die kutane Barriere ausbildet (siehe Abbildung 6). Zusammengefasst wird diese konstante Erneuerung bzw. Aufrechterhaltung der epidermalen Schichten als epidermale Homöostase bezeichnet.^[42]



Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Epidermis^[43]

Die kleine GTPase HRAS spielt eine zentrale Rolle in der epidermalen Homöostase, da sie über ihre Effektoren sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung der Keratinozyten reguliert.^[44] Eine Überexpression von HRAS führt in Hautmodellen zu einer Reihe pathologischer Veränderungen, darunter eine verstärkte Zellteilung, verminderte Apoptose und eine Desorganisation des Epithels.^[45] Auch konstitutiv aktiviertes HRAS (wie z.B. HRAS^{Gly13Arg}, HRAS^{Gly12Ser} und HRAS^{Gly12Val}) bringt die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung aus dem Gleichgewicht, was zum Verlust der Gewebshomöostase führt und schließlich in Pathologien resultiert.^[46]

Um *in-vitro*-Untersuchungen zu ermöglichen, wird häufig die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT verwendet. Diese ist eine spontan immortalisierte und nicht-tumorigene Zelllinie, die wesentliche Eigenschaften differenzierender Keratinozyten beibehält und sich daher gut zur Modellierung epidermaler Prozesse eignet. Auch in HaCaT-Zellen führt eine konstitutive Aktivierung von HRAS zu einer gestörten Balance zwischen Proliferation und Differenzierung.^[47]

3.4 LC-MS/MS-basierte Proteomik in der klinischen Forschung

In dieser Arbeit wurden Auswirkungen von HRAS-Varianten auf das Proteom humaner Keratinozyten untersucht. Das Proteom umfasst die Gesamtheit aller Proteine in einem Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt. Da nahezu alle zellulären Prozesse von Proteinen gesteuert werden, ermöglicht die Proteomanalyse, oder Proteomik, einen tiefen Einblick in die molekularen Grundlagen eines Organismus.^[48]

Eine sensitive, spezifische Methode, die die systematische Analyse tausender Proteine in einem Experiment ermöglicht, ist Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-basierte *Bottom-Up*-Proteomik. Dabei werden beispielsweise Zellen aus Zellkulturen lysiert und die erhaltenen Proteine mit Trypsin zu Peptiden verdaut, welche dann in einem LC-MS/MS-System gemessen werden. Anschließend werden die Peptide mit einer Datenbanksuche identifiziert und relativ quantifiziert, und wieder ihren Proteinen zugeordnet. Statistische Analysen ermöglichen es, relative Änderungen der Proteinabundanzen zwischen verschiedenen Phänotypen zu ermitteln. Diese Informationen können genutzt werden, um potentielle Biomarker, biologische Prozesse und Krankheitsmechanismen zu untersuchen.^[48,49]

Neben der globalen Analyse des zellulären Proteoms ist es auch möglich, gezielt einzelne Proteine und ihre Interaktionspartner zu beleuchten. Eine der robustesten Methoden ist hierfür die Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP) kombiniert mit LC-MS/MS. Dabei wird ein Zielprotein mit einem spezifischen Antikörper oder mittels *Epitope-Tags* selektiv aus dem Zelllysat herausgefiltert (präzipitiert), wobei gleichzeitig stabil gebundene Interaktionspartner mitisoliert werden. So wird es möglich, Protein-Protein-Interaktionen selektiv und mit hoher Sensitivität zu untersuchen. Diese Interaktionen spielen in zahlreichen zellulären Prozessen eine Rolle, beispielsweise in der Signaltransduktion, der Regulierung der Genexpression, dem vesikulären Transport, nuklearem Import und Export, sowie der Zellmigration.^[50,51]

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von LC-MS/MS-basierter Proteomik ist die Analyse von post-translationalen Modifikationen (PTMs), wie zum Beispiel Phosphorylierungen. Phosphorylierungen sind reversible PTMs, die sich meist an den Aminosäuren Serin, Threonin, oder Tyrosin wiederfinden.^[52] Mit MS-basierten Methoden können tausende Phosphorylierungsstellen in einzelnen Proben unvoreingenommen identifiziert und relativ quantifiziert werden.^[53] Allerdings gibt es dabei auch Herausforderungen. So handelt es sich bei Phosphorylierungen um dynamische Modifikationen, die sich innerhalb von Sekunden verändern können. Außerdem machen Phosphoproteine nur etwa 0,1% des Proteoms aus, und z.B. Tyrosin-Phosphorylierungen nur 0,1-1% aller Phosphorylierungen. Da gleichzeitig hochabundante Proteine einen großen Anteil des Phosphoproteoms darstellen, muss ein weitreichender dynamischer Bereich abgedeckt werden.^[54] Um die Analyse von niedrigabundanten Phosphopeptiden dennoch zu ermöglichen, wird nach dem üblichen Verdau mit Trypsin meist eine Phosphopeptid-Anreicherung durchgeführt. Diese kann beispielsweise mittels immobilisierter Metallaffinitäts-Ionenchromatographie (IMAC) oder Metalloxid-Affinitätschromatographie (MOAC) vollzogen werden. Dabei werden die negativ geladenen Phosphatgruppen an positive Metallionen, respektive Fe³⁺ oder Ti⁴⁺, gebunden.^[55]

Trotz aller Herausforderungen ist LC-MS/MS-basierte Phosphoproteomik eine leistungsstarke Methode, um die vielseitigen Auswirkungen von Proteinphosphorylierungen zu ergründen.^[56] Phosphorylierungen beeinflussen nicht nur die Stabilität, Aktivität, subzelluläre Lokalisierung von Proteinen, sondern auch deren Interaktionen mit anderen Molekülen. Die meisten zellulären Prozesse, darunter Proliferation, Migration, Apoptose, aber auch die Weitergabe von Informationen aus der Zellumgebung werden über die Phosphorylierungsschritte gesteuert.^[57]

4. Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit ist es, die Auswirkungen der Expression der pathogenen HRAS-Varianten HRAS^{Gly13Arg}, HRAS^{Gly12Ser}, und HRAS^{Gly12Val} auf die Epidermis bzw. auf humane Keratinozyten zu untersuchen und somit die molekularen Grundlagen der Pathologien Nävus Sebaceus, CS und von HRAS^{Gly12Val}-assoziierten Krebsarten besser zu verstehen.

Um *in-vitro*-Untersuchungen zu ermöglichen, wird die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT verwendet, da sie wesentliche Eigenschaften differenzierender Keratinozyten beibehält und sich gut zur Modellierung epidermaler Prozesse eignet.^[47] Als Methode wird LC-MS/MS-basierte *Bottom-Up*-Proteomik gewählt, welche die systematische und umfassende Analyse tausender Proteine ermöglicht.^[48]

Die Kombination verschiedener Varianten der LC-MS/MS-basierten Proteomik sollen es erlauben, diverse Aspekte der Zellbiologie abzudecken. Zunächst wird mittel Ko-IP-LC-MS/MS ermittelt, wie sich die Aminosäuresubstitutionen der HRAS-Varianten auf direkte Interaktionspartner, bzw. auf HRAS-Effektoren auswirkt. Der Austausch einzelner Aminosäuren in HRAS ändert die Tertiärstruktur des Proteins und kann subsequent Protein-Protein-Interaktionen mutmaßlich maßgeblich beeinflussen. HRAS geht als bedeutendes Signalprotein zahlreiche Wechselwirkungen mit anderen Proteinen ein, wobei die Interaktion mit bestimmten Effektoren weitreichende Einflüsse auf Signalkaskaden hat.^[51,58]

Wie sich Änderungen dieser Signalwege auf die Gesamtheit der Keratinozyten auswirken, soll mittels (Gesamtzell-)Proteomik ermittelt werden.^[48] Mittels Phosphoproteomik sollen zudem Änderungen an Phosphorylierungsmustern aufgedeckt werden. Phosphorylierungen sind entscheidend für die Regulation aller Signalwege, die von HRAS gesteuert werden.^[1,57] Dysregulierung von Proteinphosphorylierungen und Signalwegen konnte mit einer Vielzahl von Pathologien in Verbindung gebracht werden, darunter viele in Zusammenhang mit Krebs, aber auch beispielsweise mit neurodegenerativen Erkrankungen oder Entwicklungsstörungen, wie dem Noonan-Syndrom, welches mit dem CS verwandt ist.^[59]

Insgesamt soll durch die Kombination von Interaktomik, Proteomik, und Phosphoproteomik ein tiefer Einblick gewonnen werden, wie sich die drei Varianten HRAS^{Gly13Arg}, HRAS^{Gly12Ser} und HRAS^{Gly12Val} auf die HRAS-Signaltransduktion und in Folge auf die Krankheitsentstehung auswirken.

5. Ergebnisse

5.1 Verifizierung der Aminosäuresequenzen der HRAS-Varianten

In einem ersten Schritt wurde verifiziert, dass die HRAS-Varianten HRAS^{Gly12Ser}, HRAS^{Gly12Val} und HRAS^{Gly13Arg} tatsächlich als solche vorlagen, indem die ausgetauschten Aminosäuren (Glycin-13→Arginin-13, Glycin-12→Serin-12, Glycin-12→Valin-12) mittels LC-MS/MS nachgewiesen wurden. Abbildung 7 zeigt, dass alle Varianten insgesamt mit hoher Sequenzabdeckung identifiziert werden konnten. In den Varianten HRAS^{Gly12Ser} und HRAS^{Gly12Val} konnten die ausgetauschten Aminosäuren Serin-12 und Valin-12 direkt nachgewiesen werden; zudem wurden die ursprünglichen Aminosäuren Glycin-12 und Glycin-13 im Wildtyp (WT) identifiziert. Für Arginin-13 in der Variante HRAS^{Gly13Arg} war lediglich ein indirekter Nachweis möglich. Durch die Insertion von Arginin war nämlich eine neue Schnittstelle für Trypsin entstanden und das Peptid, welches Arginin-13 enthalten sollte (KLVVVGAR), konnte nicht identifiziert werden. Jedoch wurde das Folgepeptid beginnend mit der Aminosäure Valin-14 identifiziert. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass sich an Position 13 eine basische Aminosäure befinden muss, also Lysin oder Arginin. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei um Arginin, da zu keinem Zeitpunkt Lysin eingesetzt wurde.



Abbildung 7: Aminosäuresequenzen von HRAS^{WT}, HRAS^{Gly12Ser}, HRAS^{Gly12Val} und HRAS^{Gly13Arg}. Die ausgetauschten Aminosäuren sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Identifizierte Aminosäuren sind grün markiert (=Sequenzabdeckung). Mit "O" annotierte Aminosäuren waren oxidiert, während mit "C" annotierte Aminosäuren carbamidomethyliert vorlagen.

Um die in Abbildung 7 gezeigten Ergebnisse weiter zu validieren, wird im Folgenden noch näher auf die Peptididentifizierung eingegangen. Als Beispiel wurde dafür das Peptid LVVVGASGVGK herangezogen, welches den Teil des Proteins HRAS^{Giy125er} enthielt, in dem die ausgetauschte Aminosäure Serin-12 vorlag. In Abbildung 8A sind die übereinandergelegten, extrahierten Ionenchromatogramme der höchst-abundanten y- und b-Ionen des eben genannten Peptids zu sehen. Aus der Abbildung gehen die Intensitäten der Fragmentionen sowie die Retentionszeit hervor, die 38,39 min betrug. Abbildung 8B zeigt den Ausschnitt des MS1-Spektrums zu dieser Retentionszeit, der das Zielpeptid abdeckt. Das grün gekennzeichnete Signal (monoisotopischer Peak, m/z 493,30544) wurde zusammen mit dem gelb hinterlegten m/z-Bereich zur Fragmentierung ausgewählt, welcher auch einige Isotopen des Peptids enthielt. Das Fragmentspektrum des Peptids ist in Abbildung 8C zu sehen. Dabei wird sichtbar, dass die y-Ionenserie nahezu vollständig abgedeckt vorlag ($y_1^+ - y_9^+$), während nur zwei b-Ionen identifiziert wurden (b_2^+ und b_3^+). Zudem wurde auch ein zweifach geladenes y-Ion (y_8^{2+}) identifiziert. Unter anderem ist das Fragmention y_5^+ hervorzuheben, welches mit der ausgetauschten Aminosäure Serin-12 beginnt.

Über das Fragmention y_5^+ und die folgenden y-lonen ($y_5^+ - y_9^+$) wurde nachgewiesen, dass die Aminosäure Glycin-12 erfolgreich gegen Serin-12 ausgetauscht wurde und die Variante HRAS^{Gly12Ser} tatsächlich vorlag. Tabelle 1 zeigt die berechneten m/z-Werte aller möglichen y-lonen und b-lonen in einfach und zweifach geladener Form. Die identifizierten Ionen sind farblich hervorgehoben, die y-lonen, welche Serin-12 nachweisen, sind rot umrahmt.



Abbildung 8: Chromatogramm und Fragmentspektrum des Peptids LVVVGASGVGK des Proteins HRAS^{Gly12Ser} aus der Interaktom-Probe TN_5_S1 (A) Ausschnitt des Chromatogramms der Probe TN_5_S1 von 35,39 - 41,42 min. Der Peak, welcher das Zielpeptid enthielt, ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Die relative Ionenintensität wird auf der y-Achse gezeigt, die Retentionszeit in Minuten auf der x-Achse. (B) MS1-Spektrum mit der monoisotopischen Masse des Peptids (grün hinterlegt) sowie den zugehörigen M+1, M+2, und M+3-Peaks. Die Intensitäten sind auf der y-Achse angegeben, m/z auf der x-Achse. Das Isolationsfenster für die Fragmentierung ist in Gelb gekennzeichnet. (C) Fragmentspektrum des Peptides. Die Intensitäten sind auf der y-Achse angegeben, m/z auf der x-Achse. y-Ionen sind blau gekennzeichnet, b-Ionen rot, und nicht zugeordnete Peaks sind in grau gehalten. Das Ion y_5^+ , welches mit der ausgetauschten Aminosäure Serin-12 beginnt, ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Tabelle 1: Fragmentionen des Peptids LVVVGASGVGK. Identifizierte b-Ionen sind rot gekennzeichnet, identifizierte y-Ionen blau. Alle Fragmentionen, welche zur Identifizierung von Serin-12 beitrugen, sind rot umrahmt.

#1	b+	b ²⁺	Seq.	У*	y ²⁺	#2
1	114,09134	57,54931	L			11
2	213,15975	107,08352	V	872,51999	436,76363	10
3	312,22817	156,61772	V	773,45158	387,22943	9
4	411,29658	206,15193	V	674,38317	337,69522	8
5	468,31805	234,66266	G	575,31475	288,16101	7
6	539,35516	270,18122	А	518,29329	259,65028	6
7	626,38719	313,69723	S	447,25617	224,13173	5
8	683,40865	342,20796	G	360,22415	180,61571	4
9	782,47707	391,74217	V	303,20268	152,10498	3
10	839,49853	420,25290	G	204,13427	102,57077	2
11			К	147,11280	74,06004	1

5.2 Initiale Investigation der HRAS-Varianten

Um eine solide statistische Grundlage für alle folgenden Datenanalysen zu schaffen, wurden von jedem Phänotyp, also HRAS^{Gly13Arg}-, HRAS^{Gly12Ser}- und HRAS^{Gly12Val}- sowie HRAS^{WT}-exprimierenden Keratinozyten für die Analyse des Interaktoms je vier biologische Replikate gemessen und für die Proteom- und Phosphoproteomanalysen je sechs biologische Replikate. Hier ist anzumerken, dass im Proteom zwei Proben aufgrund mangelnder Rohdatenqualität entfernt wurden: eine WT- und eine HRAS^{Gly12Ser}-Probe. Insgesamt wurden 1.776 Proteine im Interaktom, 4.203 Proteine im Proteom, und 2.973 Phosphopeptide im Phosphoproteom quantifiziert.

Um auf einen Blick Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen HRAS^{Gly13Arg}-, HRAS^{Gly12Ser}-, HRAS^{Gly12Val}- sowie HRAS^{WT}-exprimierenden Keratinozyten im Interaktom, Proteom, und Phosphoproteom ermitteln zu können, wurde zunächst ein ANOVA-Test zwischen allen vorliegenden Phänotypen durchgeführt. Insgesamt waren im Interaktom 1.015 Proteine ANOVA-signifikant, im Proteom 1.025 Proteine, und im Phosphoproteom 990 Phosphopeptide (je p-Wert < 0,05).

Zur Datenreduktion wurden anschließend Hauptkomponentenanalysen (*Principal Component Analysis*, PCA) mit den ANOVA-signifikanten Proteinen bzw. Phosphopeptiden durchgeführt. Dafür mussten alle Fehlwerte aus den Datenmatrices entfernt werden, womit sich die Anzahl der Proteine im Proteom auf 782 reduzierte. Da die Interaktom- und Phosphoproteomdaten imputiert worden waren, blieb die Anzahl der Proteine bzw. Phosphopeptide gleich (1.025 bzw. 990). Die Resultate der Hauptkomponentenanalysen wurden in *Scatter Plots* (siehe Abbildung 9) veranschaulich. Dabei stellt jeder Punkt eine gemessene Probe dar. Je näher die Punkte zusammen liegen, desto ähnlicher sind sich die Proben; je weiter sie auseinanderliegen, desto größer sind die Unterschiede. Über die Farbkodierung der Punkte lässt sich somit feststellen, wie gut sich die Phänotypen in den drei Datensätzen differenzieren lassen.

Es wird ersichtlich, dass sich die HRAS-Varianten-Zellen auf Proteom-, Interaktom-, und Phosphoproteomebene tendenziell untereinander und auch von WT-Zellen unterschieden, wenn auch in unterschiedlichen Ausmaßen. Besonders im Proteom trennten sich Proben der HRAS^{Gly13Arg}-exprimierenden Zellen deutlich von den anderen Phänotypen ab, in abgeschwächter Form war das auch im Interaktom und im Phosphoproteom zu beobachten. Die HRAS^{Gly12Ser}- und HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Keratinozyten clusterten dagegen im Proteom und im Phosphoproteom mehr mit WT-Zellen bzw. untereinander zusammen. Im Interaktom gab es eine klare Abgrenzung zwischen WT- und HRAS^{Gly12Ser}- bzw. HRAS^{Gly12Val}-Keratinozyten, die beiden Varianten-exprimierenden Zelllinien waren sich aber untereinander sehr ähnlich.



Abbildung 9: (A) – (C) Punktdiagramme der beiden Hauptkomponenten einer Hauptkomponentenanalyse (PCA), (A) der Interaktom-Daten, basierend auf 782 ANOVA-signifikanten Proteinen; (B) der Proteom-Daten, basierend auf 1025 ANOVA-signifikanten Proteinen, und (C) der Phosphoproteom-Daten, basierend auf 990 ANOVA-signifikanten Phosphopeptiden. (D) Legende für die Farbkodierung.

5.3 Charakterisierung von HRAS^{Gly13Arg}-exprimierenden Keratinozyten

Die post-zygotische Mutation, welche zum Entstehen der Variante HRAS^{Gly13Arg} führt, ist in Keratinozyten vor allem mit dem Phänotyp Nävus Sebaceus assoziiert.^[28,33] Um im Detail zu ermitteln, wie sich die klinischen Unterschiede zwischen HRAS^{Gly13Arg}-exprimierenden Keratinozyten und WT-Zellen auch auf molekularer Ebene widerspiegeln, wurden im Folgenden Analysen auf Interaktom-, Proteom-, und Phosphoproteom-Ebene durchgeführt.

5.3.1 Überblick über Änderungen im Interaktom, im Proteom, und im Phosphoproteom



Abbildung 10: Venn-Diagramme, die alle Proteine umfassen, welche im Vergleich zwischen HRAS^{Gly13Arg}-exprimierenden und WT-Keratinozyten im Proteom, Interaktom, und Phosphoproteom (A) in ihrer Abundanz allgemein signifikant verändert waren (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5 oder > 1,5), (B) signifikant höhere Abundanzen in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen aufwiesen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5), (C) signifikant niedrigere Abundanzen in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen hatten (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5).

Zunächst wurden die in ihrer Abundanz veränderten Proteine und Phosphopeptide aus den Interaktom-, Proteom-, und Phosphoproteomanalysen zwischen HRAS^{Giy13Arg} -Keratinozyten und den WT-Zellen untereinander in Venn-Diagrammen verglichen, um allgemeine Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Datensätzen zu erkennen (siehe Abbildung 10). Als Grundlage dienten Proteine und Phosphopeptide, welche in *Student's t-Tests* einen p-Wert < 0,05 sowie einen *Fold Change* > 1,5 oder < 1,5 hatten. Um die Datensätze vergleichbar zu machen, wurden im Phosphoproteom alle Phosphopeptide ihren jeweiligen Proteinen zugeordnet. Dabei waren bei manchen Phosphoproteinen einige Phosphopeptide signifikant höher abundant in HRAS^{Giy13Arg}, andere aber in WT-Zellen. Diese Phosphoproteine wurden doppelt, also sowohl als höher, als auch als niedriger abundant in HRAS^{Giy13Arg} gezählt.

Zunächst war festzustellen, dass sich ein bedeutender Anteil der Proteine mit signifikant veränderten Abundanzen in die eine oder die andere Richtung (p-Wert < 0,05, *Fold Change* < 1,5 oder > 1,5, siehe Abbildung 10A) nur in jeweils einem der drei Datensätze wiederfand (491 Proteine im Proteom, 667 im Interaktom, und 411 im Phosphoproteom). Insgesamt waren lediglich die Abundanzen von 20 Proteinen gleichzeitig in allen drei Datensätzen signifikant verändert. Eine Liste mit diesen Proteinen, zusammen mit den p-Werten und *Fold Changes* jedes Datensatzes, sowie ggf. den Phosphorylierungsstellen, befindet sich im Anhang (siehe Tabelle A1). 55 Proteine waren sowohl im Interaktom als auch im Proteom signifikant in ihrer Abundanz verändert; 81 im Interaktom und im Phosphoproteom; und 48 im Proteom und im Phosphoproteom.

Im nächsten Schritt wurden nur Proteine mit signifikant erhöhten Abundanzen in HRAS^{Gly13Arg}-exprimierenden Keratinozyten betrachtet (p-Wert < 0,05, *Fold Change* > 1,5, siehe Abbildung 10B). Insgesamt waren die Abundanzen von vier Proteinen in allen drei Datensätzen signifikant erhöht (siehe Tabelle A1), wobei alle vier Proteine (IFI16, MKI67, NUMA1, und SFN) eine Rolle im Zellzyklus spielen: So reguliert *Gamma-interferon-inducible protein 16* (IFI16) etwa Zellzyklus-regulierende Faktoren wie p53/TP53, und auch *14-3-3 protein sigma* (SFN) agiert unter anderem als p53/TP53-regulierter Inhibitor der G2/M-Progression.^[60] *Proliferation marker protein Ki-67* (MKI67) und *Nuclear mitotic apparatus protein 1* (NUMA1) dienen beide dazu, mitotische Chromosomen nach dem Abbau des Nukleus im Zytoplasma getrennt zu halten.^[61]

Des Weiteren waren 46 Proteine im Proteom und im Interaktom signifikant höher abundant, 37 im Interaktom und im Phosphoproteom, und 14 im Proteom und im Phosphoproteom. 247 Proteine waren ausschließlich im Proteom signifikant höher abundant, 731 nur im Interaktom, und 195 lediglich im Phosphoproteom.

Ein anderes Bild zeigte sich bei den Proteinen, die in allen drei Datensätzen signifikant niedrigere Abundanzen in HRAS^{Gly13Arg} aufwiesen (p-Wert < 0,05, *Fold Change* < 1,5, siehe Abbildung 10C). 23 Proteine waren sowohl im Proteom als auch im Phosphoproteom signifikant niedriger abundant; nur ein Protein im Interaktom und im Phosphoproteom. Wiederum war der überwiegende Anteil ausschließlich in einem Datensatz zu finden (280 Proteine im Proteom, 5 im Interaktom, und 342 im Phosphoproteom). Kein einziges Protein war in allen Datensätzen signifikant niedriger abundant.

Aus den Venn-Diagrammen ließ sich zudem ableiten, dass im Interaktom die stärkste Veränderung zwischen HRAS^{Gly13Arg} und WT-Zellen stattfand. 823 Proteine waren in diesem Datensatz insgesamt signifikant verändert, mehr als im Proteom (614 Proteine) bzw. im Phosphoproteom (560 Proteine). Zudem waren beinahe alle diese Proteine höher abundant in HRAS^{Gly13Arg} exprimierenden Zellen (818 Proteine höher vs. 5 Proteine niedriger abundant). Währenddessen war das Verhältnis zwischen signifikant höher und niedriger abundanten Proteinen im Proteom relativ ausgeglichen (311 Proteine höher vs. 292 Proteine niedriger abundant). Im Phosphoproteom war dagegen ein Überhang an Proteinen mit signifikant niedrigeren Abundanzen zu erkennen (250 Proteine höher vs. 366 Proteine niedriger abundant).



5.3.2 Auswirkungen von HRAS^{Gly13Arg} auf das Interaktom

Abbildung 11: Der Volcano-Plot zeigt Veränderungen der Proteinabundanzen zwischen HRAS^{Gly13Arg}-exprimierenden und WT-Keratinozyten im Interaktom. Proteine mit signifikant höheren Abundanzen in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5) sind rot gefärbt, Proteine mit signifikant niedrigeren Abundanzen (p-value < 0,05, Fold Change < 1,5) sind blau. FDR-signifikante Proteine sind in dunkleren Farben hervorgehoben. Proteine, für die mit dem OmixLitMiner mit den Keywords "Nevus", "Sebaceus" oder "Mosaic" relevante Publikationen gefunden wurden, sind golden gefärbt. HRAS-Effektoren sind in grün gehalten.

Für die weiterführende Untersuchung des Interaktoms wurde mit *Student's t-Tests* ermittelt, welche Proteine sich in den jeweiligen Datensätzen signifikant zwischen den beiden Phänotypen unterscheiden. Die Ergebnisse wurden in einem *Volcano-Plot* dargestellt und besonders stark ausgelenkte Kandidaten investigiert (siehe Abbildung 11). Zudem wurden mithilfe des *Text-Mining-Tools OmixLitMiner* Proteine mit Bezug zum HRAS^{Gly13Arg}-assoziierten Nävus Sebaceus (und verwandten Phänotypen) ermittelt (golden gekennzeichnet). Auch bekannte HRAS-Effektoren wurden näher beleuchtet (grün markiert).

Zunächst zeigte sich, dass im Interaktom insgesamt 826 Proteine signifikant unterschiedliche Abundanzen aufwiesen (p-Wert < 0,05; *Fold Change* > 1,5 oder < 1,5). Davon wiesen 493 Proteine FDR-Signifikanz auf (q-Wert < 0,05). Die überwiegende Anzahl dieser Proteine wies signifikant erhöhte Abundanzen in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen auf (489). Nur vier Proteine waren signifikant niedriger abundant.

Das Protein mit dem höchsten *Fold Change* war *Slit homolog 2 Protein* (SLIT2). Es ist Teil der Slit-Familie, welche Liganden der Robo-Familie der Immunoglobulin-Rezeptoren sind. Slit-Proteine sind vor allem in die neuronale Migration und axonale Navigation involviert, könnten aber auch bei anderen zellmigratorischen Prozessen eine Rolle spielen.^[62] Darauf folgte *Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats* (UACA), ein Protein, welches am RHO-GTPase-Zyklus sowie am intrinsischen Signalweg für Apoptose beteiligt ist.^[63,64] Auch *Myosin Heavy Chain 10* (MYH10), Teil der Myosin-Superfamilie, wies eine hohe Änderung seiner Abundanz Richtung HRAS^{Giy13Arg} auf. MYH10 spielt eine Rolle in der Regulation der Zytokinese, der Zellform und beim *Cell Spreading* - insbesondere bei der Reorganisierung des Zytoskeletts.^[65,66]

Mit dem *OmixLitMiner* ließ sich feststellen, dass *Perpilin-2* (PLIN2), auch bekannt als *Adipophilin*, in Talgdrüsenläsionen (*=Sebaceous Lesions*) signifikant höher abundant vorlag als in Basalzellkarzinomen.^[67] Das *Text-Mining-Tool* enthüllte auch, dass Mutationen im *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), zusammen mit Mutationen in HRAS und KRAS, eine Rolle bei der Pathogenese bei sporadischer Talgdrüsenhyperplasie spielen. Dabei handelt es sich um eine gutartige Hautläsion, welche histologische Ähnlichkeiten mit Nävus Sebaceus aufweist.^[68]

Einige bekannte HRAS-Effektoren waren ebenfalls signifikant höher abundant in HRAS^{Gly13Arg}. Darunter war etwa *Ras and Rab interactor 1* (RIN1), welches kompetitiv an die aktive, GTP-bindende Form von HRAS bindet. Das führt in weiterer Folge zum Umbau des Zytoskeletts oder zu verstärkter Endozytose. Zweiteres läuft über *RAB5-Signaling*, und auch *Ras-related protein Rab-5C* (RAB5C) wies eine signifikant erhöhte Abundanz auf.^[69] Ein weiterer HRAS-Effektor, *Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha* (PIK3R1), aktiviert AKT. AKT phosphoryliert eine Vielzahl an Proteinen, welche

beispielsweise in das Zellwachstum, den Eintritt in den Zellzyklus und das Überleben der Zelle involviert sind.^[14] Auch *Afadin* (MLLT4) besitzt eine aktive RAS-Bindungsdomäne. MLLT4 spielt dadurch eine Rolle bei der Aktinfilament-Bindung sowie der Zelladhäsion.^[70] *RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase* (RAF1), ein weiteres Effektor-Protein, war ebenso signifikant höher abundant im Interaktom. RAF1 führt in weiterer Folge zu *RAF-MAPK-Signaling*, welches etwa Proliferation, aber auch das Überleben und den Zellzyklus reguliert.^[11] *Serine/threonine-protein kinase A-Raf* (ARAF) ist mit RAF1 verwandt, weißt jedoch deutlich geringere Kinaseaktivität auf.^[71] Zuletzt sollte *Neurofibrin* (NF1) Erwähnung finden, welches als GAP agiert und somit die Hydrolyse von GTP zu GDP (bzw. die Inaktivierung von G-Proteinen wie HRAS) bewirkt.^[72]

Unter den Proteinen mit negativen *Fold Changes* war *GTPase KRAS* (KRAS) das Protein mit der am stärksten reduzierten Abundanz in HRAS^{Gly13Arg}. KRAS ist ein RAS-Protein und agiert als binärer molekularer *Switch*, wie auch HRAS.^[73] Das Protein spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation.^[74] Zudem ist bereits bekannt, dass postzygotische KRAS-Mutationen Nävus Sebaceus auslösen. In einer Studie, welche durch den *OmixLitMiner* identifiziert wurde, lagen bei insgesamt 65 Sebaceus Nävi zu 95% Mutationen am HRAS-Gen und zu 5% am KRAS-Gen vor.^[28] Neben KRAS wiesen nur vier weitere Proteine ebenfalls reduzierte Abundanzen auf. Drei davon waren FDR-signifikant: *acyl-CoA synthetase long chain family member 5* (ACSL5) ist an der Lipid-Biosynthese und der Fettsäuredegradierung beteiligt, *Semaphorin 3B* (SEMA3B) hat tumorunterdrückende Eigenschaften, und *Serine/threonine-protein kinase ATR* (ATR) ist ein Sensor für Beschädigungen an der DNA durch genotoxischen Stress.^[75]



Abbildung 12: Der Bubble-Volcano-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege (p-Wert < 0,05, Fisher's Exact-Test), sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in HRAS^{Gly13Arg}-Keratinozyten im Interaktom. Nur eindeutig aktivierte oder inhibierte Signalwege (absoluter z-Score > 0,1) werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr zum jeweiligen Signalweg gehörende Proteine wurden im Datensatz gefunden. Aktivierte Signalwege in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen (z-Score > 0) sind in Rot dargestellt, während inhibierte Signalwege (z-Score < 0) blau gefärbt sind.

Um die biologischen Auswirkungen von HRAS^{Giy13Arg} auf das Interaktom zu ermitteln, wurden Signalweganalysen mit dem *Tool Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) durchgeführt. Dafür wurden alle signifikant veränderten Proteine (p-Wert < 0,05, absoluter *Fold Change* > 1,5) unter Berücksichtigung ihrer p-Werte und *Fold Changes* herangezogen. Die Signalwege, welche signifikant angereichert und aktiviert bzw. inhibiert vorlagen (p-Wert < 0,05, *z-Score* > 0 bzw. *z-Score* < 0) wurden mithilfe eines *Bubble-Volcano-Plots* dargestellt (Abbildung 12). Dabei wurden im Datensatz angereicherte Signalwege nach dem gleichen Prinzip angeordnet, wie die Proteine in einem *Volcano-Plot*.

Im Interaktom waren insgesamt 165 Signalwege in HRAS^{Gly13Arg}-Keratinozyten signifikant angereichert. Davon lagen 157 aktiviert vor und acht waren inhibiert (siehe Abbildung 12). Das Verhältnis zwischen aktivierten und inhibierten Signalwegen spiegelte damit auch die Verteilung der Proteine im *Volcano-Plot* (siehe Abbildung 11) wider. Zahlreiche Signalwege wiesen niedrige p-Werte (also hohe -log(p-Werte) in Abbildung 12) auf und waren in HRAS^{Giy13Arg}-Zellen aktiviert. Besonders traf das auf den *Major Pathway of rRNA Processing in the Nucleolus and Cytosol* zu, welcher mit dem RNA-Metabolismus in Verbindung steht. Unter die gleiche Kategorie fielen weitere stark aktivierte Entitäten, darunter *Nonsense-Mediated Decay* und *Processing of Capped-Intron Containing Pre-mRNA* (Für die Einordnung der Signalwege in Kategorien siehe Abbildung A1 im Anhang). Neben dem RNA-Metabolismus war auch der Protein-Metabolismus sehr stark aktiviert (siehe Abbildung A1), was sich z.B. durch die Entitäten *Eukaryotic Translation Termination, Elongation, und Initiation* und *SRP-dependent Co-Translational Protein Targeting to Membrane* widerspiegelte. *Selenoamino Acid Metabolism* ist allgemein der Kategorie Metabolismus zuzuordnen (siehe Abbildung A1) und wies ebenfalls einen niedrigen p-Wert auf. Die starke Aktivierung der metabolischen Prozesse ließ sich vor allem auf die große Anzahl an ribosomalen Proteinen mit signifikant erhöhten Abundanzen in HRAS^{Giy13Arg}-Zellen zurückführen.

Neben metabolischen Prozessen war auch die Zellantwort auf Stimuli aktiviert (siehe Abbildung A1), vertreten durch die Entität *Response of EIF2AK4 (GCN2) to Amino Acid Deficiency*. Außerdem war die Kategorie zellulärer Stress und Schädigung (siehe Abbildung A1) mit den Entitäten *Ribosomal Quality Control Signaling Pathway* und *EIF2 Signaling* stark aktiviert.

Unter den am stärksten inhibierten Signalwegen (mit den niedrigsten *z-Scores*) befanden sich etwa der *Coronavirus Pathogenesis Pathway* und das *RHOGDI Signaling*, welches die negative Regulation der RHO-Familie-GTPasen beschreibt.^[76]

5.3.3 Auswirkungen von HRAS^{Gly13Arg} auf das Proteom



Abbildung 13: Der Volcano-Plot zeigt Veränderungen der Proteinabundanzen zwischen HRAS^{Gly13Arg}und WT-exprimierenden Keratinozyten im Proteom. Proteine mit signifikant höheren Abundanzen in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5) sind rot gefärbt, Proteine mit signifikant niedrigeren Abundanzen (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5) sind blau. FDR-signifikante Proteine sind in dunkleren Farben hervorgehoben. Proteine, für die mit dem OmixLitMiner mit den Keywords "Nevus", "Sebaceus" oder "Mosaic" relevante Publikationen gefunden wurden, sind golden gefärbt.

Für die weiterführende Untersuchung des Proteoms wurde nach dem gleichen Schema vorgegangen, wie für das Interaktom: Proteine mit besonders signifikanten *Student's t-Tests*-Ergebnissen wurden näher beleuchtet. Zudem wurden mit dem *OmixLitMiner* Proteine mit Bezug zu Nävus Sebaceus und verwandten Konditionen identifiziert. In der Proteomanalyse war das Verhältnis zwischen Proteinen mit signifikant höheren bzw. niedrigeren Abundanzen im Vergleich HRAS^{Gly13Arg}- vs. WT-Keratinozyten ungefähr ausgeglichen (siehe Abbildung 13). Insgesamt waren 407 Proteine FDR-signifikant (q-Wert < 0,05). Davon waren 215 Proteine höher abundant in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen (p-Wert < 0,05; *Fold Change* > 1,5) und 192 niedriger abundant (p-Wert < 0,05; *Fold Change* < 1,5).
Unter allen Proteinen war BTB/POZ domain-containing protein (KCTD12) das Protein mit der am stärksten erhöhten Abundanz in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen. KCTD12 ist eine Hilfsuntereinheit der GABA-B-Rezeptoren, die die Pharmakologie und Kinetik der Rezeptorreaktion bestimmt. Dabei erhöht KCTD12 die Agonisten-Potenz und hat dadurch einen deutlichen Einfluss auf G-Protein-Signaling, wobei bisher allerdings kein direkter Zusammenhang mit dem G-Protein HRAS bekannt ist.^[77] Unter Proteinen mit den höchsten Fold Changes waren außerdem PDZ and LIM domain protein 4 (PDLIM4), Dihydropyrimidinase-related protein 3 (DPYSL3) und Filaggrin (FLG) zu finden, welche alle im Zusammenhang mit dem Zytoskelett stehen. So spielt etwa PDLIM4 eine Rolle bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und ist, sowie DPYSL3, Teil des Aktinfilaments. FLG ist hingegen mit dem Intermediärfilament assoziiert.^[78–80] FLG steht außerdem im Zusammenhang mit Nävus Comedonicus, was mit dem OmixLitMiner festgestellt wurde.^[81] Auch Pleckstrin homology-like domain family A (PHLDA1, Synonym: TDAG51) konnte mit dem OmixLitMiner in Zusammenhang mit Nävus Sebaceus gebracht werden. Das Protein konnte als Marker für Trichoblastome (inklusive Nävus Sebaceus) im Vergleich zu Basalzellkarzinomzellen identifiziert werden.^[82] Integrin alpha-6 (ITGA6) spielt eine essenzielle Rolle bei der Bindung der Epithelien mit den darunter liegenden Basalmembranen. Mäuse, denen ITGA6 fehlt, sterben bei der Geburt.^[83]

Das Protein mit dem niedrigsten *Fold Change*, und damit der höchsten Auslenkung in Richtung WT-Zellen, war *Anterior gradient protein 2* (AGR2). AGR2 spielt eine Rolle in Zellmigration, Zelltransformation, sowie bei der Bindung des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor. Außerdem fördert es die Zelladhäsion.^[84] *Involucrin* (IVL), ebenso ein Protein mit stark reduzierter Abundanz in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen, ist eine Komponente der vernetzten Hülle von Keratinozyten.^[85] Bei drei Proteinen mit signifikant niedrigeren Abundanzen konnten mit dem *OmixLitMiner* Publikationen im Zusammenhang mit Nävus Sebaceus bzw. verwandten Konditionen identifiziert werden. So werden etwa Mutationen bei *Keratin, Typ II Cytoskeletal 4* (KRT4) zusammen mit dem verwandten KRT13 in differenzierten Schichten der Schleimhaut- und Speiseröhrenepithelien exprimiert und sind mit *White-Sponge-Nävus* assoziiert.^[86] *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase* (PTEN) konnte mit *Linear-Cowden-Nävus*, auch bekannt als linearer *PTEN-Nävus* in Verbindung gebracht werden. Dabei handelt es sich um einen epidermalen Nävus, welcher in Patienten mit *PTEN-Hamartom-Tumorsyndrom* beobachtet wird. Es handelt sich dabei um eine Typ2-Art von segmentalem Mosaik.^[87] *Cathepsin D-*(CTSD-)Überexpression ist mit der Progression von Melanomen assoziiert und ist signifikant höher abundant in *Nävus Pigmentosus*.^[88]



Abbildung 14: Der Bubble-Volcano-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege (p-Wert < 0,05, Fisher's Exact-Test), sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in HRAS^{Gly13Arg}-Keratinozyten im Proteom. Nur eindeutig aktivierte oder inhibierte Signalwege (absoluter z-Score > 0,1) werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr zum jeweiligen Signalweg gehörende Proteine wurden im Datensatz gefunden. Aktivierte Signalwege in HRAS^{Gly12Arg}-Zellen (z-Score > 0) sind in Rot dargestellt, während inhibierte Signalwege (z-Score < 0) blau gefärbt sind.

Die biologischen Auswirkungen von HRAS^{Gly13Arg} auf das Proteom wurden analog zum Interaktom mithilfe von IPA ermittelt. Insgesamt waren 111 Signalwege signifikant angereichert (p-Wert < 0,05). Davon lagen 62 Signalwege in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen aktiviert vor (*z-Score* > 0) und 49 waren inhibiert (*z-Score* < 0; siehe Abbildung 14).

Neutrophil Degranulation war der Signalweg mit der insgesamt signifikantesten Anreicherung und eine von vier mit dem Immunsystem in Zusammenhang stehenden Entitäten, die alle aktiviert vorlagen (Zuordnung zu Kategorien siehe Abbildung A2 im Anhang). Neutrophile sind Leukozyten, die etwa bei Infektionen vom Immunsystem aktiviert werden. Granulen enthalten Substanzen, die etwa antimikrobiell oder proteolytisch wirken, und bei der Degranulation ausgestoßen werden.^[89,90] Neben dem Immunsystem waren auch Signalwege unter dem Überbegriff Vesikel-mediierter Transport stark aktiviert (siehe Abbildung A2), zum Beispiel *Intra-Golgi and Retrograde Golgi-to-ER Traffic* und

Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the Plasma Membrane. Dabei werden etwa Proteine innerhalb der Zelle oder auch mittels Endozytose in die Zelle transportiert.^[91]

Integrin Signaling war ebenfalls einer der am stärksten aktivierten Signalwege. Integrine befinden sich an der Zelloberfläche und sind maßgeblich an Zell-Zell-Interaktionen sowie Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt. Diese Interaktionen sind die Grundlage etwa für Zellmigration, -wachstum, und -differenzierung. Integrine aktivieren auch MAPK-Signalwege. So kann etwa die Integrin-aktivierte Kinase FAK den RAS-MAPK-Signalweg aktivieren, was zu Zellproliferation führt.^[92]

RHO-Familie-GTPasen waren ebenso aktiviert. So liegt beispielsweise *RHO GTPases Activate Formins* ebenfalls unter den Entitäten mit den höchsten *z-Scores* und fällt unter die Kategorie Signaltransduktion (siehe Abbildung A2). Formine haben eine Reihe von Funktionen, sind aber vor allem an der Regulation vom Aktin-Zytoskelett bzw. dem Aufbau von Aktin-Filamenten beteiligt.^[93] Verwandte Prozesse, wie *RHO GTPase Cycle*, waren ebenfalls signifikant angereichert und lagen im aktivierten Zustand vor. *RHOGDI Signaling* beschreibt hingegen die negative Regulation der RHO-Familie-GTPasen und lag daher erwartungsgemäß im inhibierten Zustand vor.^[76]

Signalwege, welche für den Schutz und die Reparatur der DNA zuständig sind, waren unter den am stärksten inhibierten Signalwegen. Das trifft beispielsweise auf *Telomere Maintenance* zu. Telomere sind Protein-DNA-Komplexe, die das Ende von linearen Chromosomen schützen. Bei jeder Zellteilung verkürzen sich Telomere, was durch das Enzym Telomerase ausgeglichen wird. Werden die Telomere aber zu kurz, kann die Zelle in einen Zustand replikativer Seneszenz eintreten und sich nicht mehr weiter teilen.^[94] Ebenso ist *Cohesin Chromatin Regulation Pathway* inhibiert, und Kohäsine spielen bei der Reparatur von DNA-Schäden eine entscheidende Rolle. Zudem ist eine wichtige Funktion der Kohäsine die Sicherstellung der korrekten Trennung der Chromatide während der Mitose.^[95] Auch der *Sirtuin Signaling Pathway* wies eine hohe Anreicherung und Inhibition auf. Sirtuine sind NAD+-abhängige Enzyme, die zum Beispiel im Metabolismus, bei der DNA-Reparatur und bei der Zellantwort auf Stress eine Rolle spielen.^[96] *Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling* war auch inhibiert und spielt eine Rolle bei der Reaktion der Zelle auf halogenierte und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.^[97]

5.3.4 Auswirkungen von HRAS^{Gly13Arg} auf das Phosphoproteom



Abbildung 15: Der Volcano-Plot zeigt Veränderungen der Phosphopeptidabundanzen zwischen HRAS^{Gly13Arg}-exprimierenden und WT-Keratinozyten im Phosphoproteom. Die jeweiligen Phosphorylierungsstellen sind hinter den Proteinnamen angegeben. Phosphopeptide mit signifikant höheren Abundanzen in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5) sind rot gefärbt, Phosphopeptide mit signifikant niedrigeren Abundanzen (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5) sind blau. FDR-signifikante Phosphopeptide sind in dunkleren Farben hervorgehoben. Phosphopeptide, für deren zugehörige Proteine mit dem OmixLitMiner mit den Keywords "Nevus", "Sebaceus" oder "Mosaic" relevante Publikationen gefunden wurden, sind golden gefärbt.

Für eine eingehende Analyse des Phosphoproteoms wurden signifikant veränderte Phosphopeptide mittels *Student's t-Test* ermittelt und in einem *Volcano-Plot* dargestellt. Besonders stark ausgelenkte Phosphopeptide wurden mit *PhosphositePlus* investigiert.^[98] Wenn für die Phosphopeptide keine Informationen vorlagen, wurden die zugehörigen Proteine charakterisiert. Im Phosphoproteom waren im Gegensatz zum Interaktom und zum Proteom mehr Phosphopeptide höher abundant in WT- als in HRAS^{Gly13Arg}-Keratinozyten (p-Wert < 0,05, *Fold Change* > 1,5 bzw. < 1,5; siehe Abbildung 15). Von den FDR-signifikanten Phosphopeptiden (q-Wert < 0,05) waren 160 höher abundant in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen, 289 waren niedriger abundant.

Das Phosphopeptid mit dem höchsten Fold Change war Teil des mitochondrial transcription factor A mit der Phosphorylierungsstelle an S195 (TFAM S195). Das Protein ist unter anderem in die Replikation und Reparatur mitochondrialer DNA involviert.^[99] B-Cell lymphoma 3 protein (BCL3), welches die transkriptionelle Aktivierung von NF-kappa-B Target-Genen reguliert und damit zur Regulierung der Zellproliferation beiträgt, wies ebenfalls ein Phosphopeptid mit hohen Fold Change an der Stelle S41 auf.^[100] Für die Ausübung transkriptioneller Aktivität wird in BCL3 unter anderem die hier identifizierte Aminosäure S41 von AKT1 phosphoryliert, was mit *PhosphoSitePlus* ermittelt wurde.^[98,101] Ein weiteres Phosphopeptid mit hoher Auslenkung Richtung HRAS^{Giy13Arg} war Teil des *Myc proto-oncogene protein* (MYC S344). MYC spielt eine Rolle bei der Zellzyklus-Progression, Apoptose und zellulärer Transformation. Zusammen mit dem verwandten Transkriptionsfaktor MAX reguliert MYC die Transkription bestimmter Gene. Zudem findet sich die Amplifikation des Gens in diversen humanen Krebsarten wieder.^[102] Auch von Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependant kinase substrate 1 wurde ein Phosphopeptid mit zwei Phosphorylierungsstellen identifiziert (NUCKS1 S204 S214). Das Protein spielt eine Rolle im Zellzyklus, da es während der Mitose durch CDK1 phosphoryliert wird. Das Protein enthält außerdem mehrere Phosphorylierungsstellen für die Casein Kinase II sowie Zyklin-abhängige Kinasen. Mit PhosphoSitePlus wurde die Phosphorylierungsstelle S214 identifiziert, welche von PRP4 phosphoryliert wird.^[98,103] FLG war im Phosphoproteom signifikant höher abundant in HRAS^{Gly13Arg}, wie auch im Proteom. Wie bereits erwähnt ist FLG mit dem Intermediärfilament assoziiert und steht im Zusammenhang mit Nävus Comedonicus.^[81,104] Über die Phosphorylierungsstelle FLG S3749 ist allerdings nichts bekannt. Mit dem OmixLitMiner wurde ermittelt, dass sowohl Mutationen in Keratin, type II cytoskeletal 5 (KRT5 S582), als auch in Keratin, type I cytoskeletal 14 (KRT14 S435) mit Epidermolysis Bullosa Simplex (EBS) assoziiert sind. Dabei handelt es sich um eine vererbliche, blasenbildende Hauterkrankung, die durch die Degeneration basaler Keratinozyten gekennzeichnet ist.^[105]

Das Phosphopeptid mit dem negativsten *Fold Change* war *Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus* (ACIN1) mit den Phosphoylierungsstellen S208 und S216. ACIN1 ist Bestandteil des ASAP-Komplexes, der die RNA Prozessierung inhibieren kann und die Apoptose fördert.^[106] Unter anderem induziert es apoptotische Chromatinkondensation nach der Aktivierung durch CASP3 und reguliert die Expression von *Cyclin A1*.^[107,108] Auch *U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1* (SART1 S448) spielt eine Rolle im *mRNA-Splicing* als Komponente von *U4/U6-U5 tri-snRNP*, eine Untereinheit des Spliceosoms.^[109] Ein weiteres Phosphopeptid mit reduzierter Abundanz in HRAS^{Gly13Arg} mit einer ähnliche Funktion war Teil von *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3* (HNRNPA3 S358), welches eine Rolle im zytoplasmischen *RNA-Trafficking* spielt und in *pre-mRNA Splicing* involviert sein könnte.^[110]

41

Protein kinase C-binding protein 1 (ZMYND8 S406) könnte ein transkriptioneller Regulator sein.^[111] Im Gegensatz dazu ist die Funktion von *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10* (USP10 S547), Ubiquitin von Ubiquitin-konjugierten Proteinsubstraten zu lösen, womit unter anderem die Stabilität von p53/TP53 reguliert wird.^[112] Die Phosphoylierungsstelle S547 ist mit Melanomen assoziiert, wie mit *PhosphoSitePlus* ermittelt wurde.^[98,113]



Abbildung 16: Der Bubble-Volcano-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege (p-Wert < 0,05, Fisher's Exact-Test), sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in HRAS^{Gly13Arg}-Keratinozyten im Phosphoproteom. Nur eindeutig aktivierte oder inhibierte Signalwege (absoluter z-Score > 0,1) werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr zum jeweiligen Signalweg gehörende Proteine wurden im Datensatz gefunden. Aktivierte Signalwege in HRAS^{Gly12Arg}-Zellen (z-Score > 0) sind in Rot dargestellt, während inhibierte Signalwege (z-Score < 0) blau gefärbt sind.

Um die biologischen Auswirkungen zwischen HRAS^{Gly13Arg}-exprimierenden im Vergleich zu WT-Keratinozyten im Phosphoproteom zu ermitteln, wurden Signalweganalysen durchgeführt. Dafür wurden alle signifikant veränderten Phosphopeptide (p-Wert < 0,05, absoluter *Fold Change* > 1,5) unter Berücksichtigung ihrer p-Werte und *Fold Changes* herangezogen. Die Signalwege, welche aktiviert bzw. inhibiert vorlagen, wurden mithilfe von *Bubble-Volcano-Plots* dargestellt (siehe Abbildung 16). In der Phosphoproteomanalyse lagen rund doppelt so viele Signalwege in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen inhibiert (45), als aktiviert (24) vor (p-Wert < 0,05; *z-Score* < 0 bzw. > 0; siehe Abbildung 16). Insgesamt waren also 69 Entitäten im Datensatz signifikant angereichert.

Unter den am stärksten aktivierten Signalwegen befand sich *Regulation of TP53 Expression and Degradation*. Eine erhöhte Phosphorylierung von TP53 weist auf genotoxischen Stress hin. Die betreffenden Phosphorylierungsstellen (S15 und S20) konnten allerdings in dieser Analyse nicht direkt nachgewiesen werden.^[114] Ebenso war *Keratinization* eine der am stärksten aktivierten Entitäten, wobei Keratinisierung die Ausbildung von epithelialen Keratinstrukturen beinhaltet. Diese sind für die mechanische Stabilität einzelner Zellen und des Epithelgewebes verantwortlich.^[115] Zwei apoptotische Signalwege waren ebenso aktiviert (siehe Abbildung A3 im Anhang), darunter *Death Receptor Signaling*, welcher über die Bindung bestimmter Todesliganden initiiert werden kann.^[116]

Unter den inhibierten Signalwegen hatten viele Bezug zu RNA-Metabolismus (siehe Abbildung A3). Darunter fiel etwa *Processing of capped intron-containing pre-mRNA*, welche zugleich die Entität mit dem niedrigsten p-Wert war. Eng verwandt war die Entität *Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol*, welche die stärkste Inhibition aufwies. Ebenso traf das auf *RNA-Polymerase II Transcription*, also den Prozess, der für die Initiierung der RNA-Transkription benötigt wird, zu.^[117] Der Eindruck, dass die Transkription insgesamt inhibiert vorlag, verstärkt sich weiter durch die Inhibition des *Histone Modification Signaling Pathway*. Denn dieser bezieht sich auf die Regulierung bestimmter Histon-Modifikationen, wie beispielsweise Acetylierungen und Methylierungen. Diese erleichtern die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren, welche wiederum für die Initiierung der Transkription entscheidend sind.^[118] Insgesamt waren sieben Entitäten unter der Kategorie Genexpression (Transkription) inhibiert (siehe Abbildung A3), allen voran *RNA-Polymerase II Transcription*. Es ist allerdings anzumerken, dass auch *Regulation of TP53 Expression and Degradation* in diese Kategorie eingeordnet wurde und wie bereits erwähnt im aktivierten Zustand vorlag.

5.4 Charakterisierung von HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden Keratinozyten

Der RASopathie Costello-Syndrom (CS) liegt zu rund 80% die HRAS-Variante HRAS^{Gly12Ser} zugrunde, welche auf eine aktivierende Keimbahnmutation zurückzuführen ist.^[27] Um die molekulare Grundlage von CS besser zu verstehen, wurden Unterschiede zwischen HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden und WT-Keratinozyten nach dem gleichen Schema ermittelt, welches für die HRAS^{Gly13Arg}-Zellen angewandt wurde. Dafür wurden auf Interaktom-, Proteom-, und Phosphoproteom-Ebene Datenanalysen durchgeführt.

5.4.1 Überblick über Änderungen im Interaktom, im Proteom, und im Phosphoproteom



Abbildung 17: Venn-Diagramme, die alle Proteine umfassen, welche im Vergleich zwischen HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden und WT-Keratinozyten im Proteom, Interaktom, und Phosphoproteom (A) in ihrer Abundanz allgemein signifikant verändert waren (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5 oder > 1,5), (B) signifikant höhere Abundanzen in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen aufwiesen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5), (C) signifikant niedrigere Abundanzen in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen hatten (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5).

Die in Abbildung 17 dargestellten Venn-Diagramme verdeutlichen allgemeine Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Interaktom, Proteom und Phosphoproteom zwischen HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden und WT-Keratinozyten. Als Grundlage dienten Proteine bzw. Phosphopeptide, die laut *Student's t-Test* einen p-Wert < 0,05 und einen Fold Change > 1,5 bzw. < 1,5 aufwiesen. Zur Vergleichbarkeit der Datensätze wurden im Phosphoproteom alle Phosphopeptide ihren entsprechenden Proteinen zugeordnet, ein Vorgehen, das ebenso für die HRAS^{Gly13Arg}-Zellen angewendet wurde.

In Abbildung 17A wurde ersichtlich, dass insgesamt nur wenige Proteine in mehr als einem Datensatz gleichzeitig signifikant veränderte Abundanzen aufwiesen (p-Wert < 0,05, *Fold Change* > 1,5 oder < -1,5). Zwei Proteine waren in allen Datensätzen signifikant verändert, RIN1 und MSH6. RIN1 ist ein bekannter Effektor von HRAS und MSH6 ist ein Mitglied der DNA Mismatch-Repair Familie MutS und dient der Erkennung von Nukleotiden mit Mismatches vor ihrer Reparatur.^[69,119] Des Weiteren waren neun Proteine sowohl im Interaktom als auch im Phosphoproteom signifikant verändert, und acht Proteine im Proteom und im Phosphoproteom. Im Kontrast dazu waren 119 Proteine ausschließlich im Proteom, 103 Proteine nur im Interaktom, und 490 Proteine lediglich im Phosphoproteom signifikant verändert, also der überwiegende Anteil.

Erwartungsgemäß war die Überlappung zwischen den Datensätzen auch gering, wenn man nur Proteine mit signifikant höheren Abundanzen in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen (p-Wert < 0,05, *Fold Change* > 1,5) betrachtete (siehe Abbildung 17B). Nur drei Proteine waren sowohl im Interaktom als auch im Phosphoproteom signifikant höher abundant. Mit dem Proteom gab es keine Überlappungen zu den anderen beiden Datensätzen. 47 Proteine waren ausschließlich im Proteom signifikant höher abundant, 34 nur im Interaktom, und 245 lediglich im Phosphoproteom.

Bei Proteinen mit signifikant niedrigeren Abundanzen in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen (p-Wert < 0,05, *Fold Change* < -1,5, siehe Abbildung 17C) gab es ebenfalls nur wenige Überschneidungen zwischen den Datensätzen. Ein Protein war im Interaktom und im Phosphoproteom signifikant niedriger abundant, drei Proteine im Interaktom und im Phosphoproteom, sowie drei Proteine im Proteom und im Phosphoproteom. 78 Proteine wiesen nur im Proteom, 73 lediglich im Interaktom, und 314 ausschließlich im Phosphoproteom signifikant niedrigere Abundanzen in HRAS^{Gly12Ser}-Keratinozyten auf.

Es wurde auch deutlich, dass sich im Phosphoproteom insgesamt die größten Veränderungen abspielten. Es waren in diesem Datensatz insgesamt fast fünf Mal so viele Proteine signifikant verändert (507) als im Proteom (127) bzw. im Interaktom (112). In allen drei Datensätzen waren deutlich mehr Proteine signifikant niedriger abundant in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen als umgekehrt. Das Verhältnis lag im Proteom bei 47 zu 81 (signifikant höher vs. niedriger abundant), im Interaktom bei 37 zu 77, und im Phosphoproteom bei 243 zu 310.

45

5.4.2 Auswirkungen von HRAS^{Gly12Ser} auf das Interaktom



Abbildung 18: Der Volcano-Plot zeigt Veränderungen der Proteinabundanzen zwischen HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden und WT-Keratinozyten im Interaktom. Proteine mit signifikant höheren Abundanzen in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5) sind rot gefärbt, während Proteine mit signifikant niedrigeren Abundanzen (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5) in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen blau sind. FDR-signifikante Proteine sind in dunkleren Farben hervorgehoben. Proteine, für die mit OmixLitMiner mit dem Keyword "Costello Syndrome" relevante Publikationen gefunden wurden, sind golden gefärbt. HRAS-Effektoren sind grün gekennzeichnet.

Die weiterführende Untersuchung des Interaktoms wurde analog zur Interaktomanalyse von HRAS^{Gly13Arg} basierend auf einem *Student's t-Test* durchgeführt, dessen Ergebnisse in einem *Volcano-Plot* dargestellt wurden. *OmixLitMiner*-Suchen wurden mit dem *Keyword "Costello Syndrome"* durchgeführt. Im Interaktom waren insgesamt 114 Proteine p-Wert-signifikant (p-Wert < 0,05). Davon waren 37 Proteine höher abundant in HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden Zellen (*Fold Change* > 1,5) und 77 Proteine niedriger abundant (*Fold Change* < 1,5), wie aus Abbildung 18 ersichtlich wird. Nur zwei Proteine waren zusätzlich FDR-signifikant (q-Wert < 0,05): RAP1B und KRAS.

Ras-related protein Rap-1b (RAP1B) hatte den höchsten *Fold Change*, und war insgesamt das Protein mit der höchsten p-Wert-Signifikanz. RAP1B ist ein kleines, GTP-bindendes Protein und spielt etwa eine Rolle bei *Integrin-Signaling*.^[120] HRAS und RAP1B haben eine hohe Sequenzhomologie, weshalb sie sich auch viele Bindungspartner bzw. Effektoren teilen.^[121] Ein weiteres Protein mit hohem *Fold Change* war *Sodium-dependent phosphate transporter 1* (SLC20A1), ein Natrium-Phosphat-Transporter der eine Rolle in der extrazellulären Matrix und der Knorpelverkalkung spielen könnte.^[122]

Viele der weiteren Proteine mit signifikant erhöhten Abundanzen in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen waren bekannte HRAS-Effektoren. Darunter waren RIN1, RAB5C, MLLT4, NF1, RAF1 und ARAF – alle wurden bereits im Rahmen der Interaktomanalyse der HRAS^{Gly13Arg}-Zellen beschrieben. Mit dem *OmixLitMiner* wurde zudem festgestellt, dass weitreichende NF1-Deletionen und RAF1-Varianten im Zusammenhang mit dem *Noonan-Syndrom* identifiziert wurden.^[123] CS ist aufgrund ähnlicher klinischer und molekularer Features mit dem *Noonan-Syndrom* verwandt.^[124]

Ein RAS-Effektor mit signifikant niedrigerer Abundanz in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen ist *Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 2* (RGL2). RGL2 aktiviert RAL-GTPasen, welche allgemein eine Rolle bei vesikulärem Transport spielen.^[15,15]

Unter den Proteinen mit signifikant reduzierten Abundanzen war KRAS vertreten, wie auch schon in der Interaktomanalyse der HRAS^{Gly13Arg}-Zellen. Wie bereits erwähnt ist KRAS ist ein RAS-Protein und agiert als binärer molekularer *Switch*, wie auch HRAS.^[73] In Verbindung mit CS ist zudem ist bekannt, dass Keimzellenmutationen in KRAS mit dem Syndrom in Verbindung stehen, ähnlich wie bei HRAS.^[125] Weitere Proteine mit signifikant reduzierten Abundanzen in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen umfassten etwa *Ribosomal Protein L37* (RPL37), welches Teil der großen ribosomalen Untereinheit ist, oder *mutS homolog 6* (MSH6), welches als Mitglied der DNA-Mismatch-Repair Familie MutS der Erkennung von Nukleotiden mit Mismatches vor ihrer Reparatur dient.^[119,126] Auch *Exportin 5* (XPO5) wies einen negativen *Fold Change* auf. Es wird für den Transport kleiner RNAs sowie RNA-bindender Proteine aus dem Nukleus ins Zytoplasma benötigt.^[127]



Abbildung 19: Der Bubble-Volcano-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege (p-Wert < 0,05, Fisher's Exact-Test) sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in HRAS^{Gly12Ser}-Keratinozyten im Interaktom. Nur eindeutig aktivierte oder inhibierte Signalwege (absoluter z-Score > 0,1) werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr zum jeweiligen Signalweg gehörende Proteine wurden im Datensatz gefunden. Aktivierte Signalwege in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen (z-Score > 0) sind in Rot dargestellt, während inhibierte Signalwege (z-Score < 0) blau gefärbt sind.

Die biologischen Auswirkungen von HRAS^{Gly12Ser} auf das Interaktom wurden analog zu HRAS^{Gly13Arg} mit IPA ermittelt. Als Resultat der Interaktomanalyse waren 50 Signalwege aktiviert und 20 inhibiert (p-Wert < 0,05; *z-Score* > 0 bzw. < 0). Diese sind in Abbildung 19 dargestellt.

Unter den aktivierten Signalwegen befanden sich eine Reihe von Krebs-bezogenen Signalwegen, darunter *Cancer Drug Resistance by Drug Efflux* oder *HER-2 Signaling in Breast Cancer* (Einordnung der Signalwege in Kategorien siehe Abbildung A4 im Anhang). Weitere signifikant angereicherte, aktivierte Entitäten inkludieren etwa *UVC-Induced MAPK Signaling*. UV-Strahlung, darunter auch UVC-Strahlung, kann unter anderem die DNA schädigen und karzinogen wirken. Diverse Stresssignale und Reaktionen werden über die MAPK-Signalkaskade übertragen.^[128] Ein weiterer aktivierter Signalweg war der *Ferroptosis Signaling Pathway*. Dabei kommt es durch reaktive Eisenspezies zur Akkumulation von *Lipid-Reactive-Oxygen-Spezies*, welche schließlich zum Zelltod führen.^[129] Unter den am stärksten inhibierten Signalwegen waren jene mit Bezug zum Immunsystem stark vertreten (siehe Abbildung A4). Darunter fiel etwa die Entität Antimicrobial peptides, welche Bezug auf Proteine mit niedrigem Molekulargewicht nimmt, die ein breites Spektrum an antimikrobiotischer Aktivität gegen Bakterien, Viren und Pilze aufweisen.^[130] Die verwandte Entität Neutrophil Degranulation war ebenso inhibiert. Wie bereits in einem früheren Kapitel erwähnt, sind Neurophile Leukozyten, die bei Infektionen aktiviert werden. Bei der Degranulation werden antimikrobiell oder proteolytisch wirkende Substanzen freigesetzt.^[89,90] Auch der Signalweg Neutrophil Extracellular Trap Signaling Pathway, der ebenfalls inhibiert war, nimmt Bezug auf Neutrophile. Als Reaktion auf bestimmte Stimuli können Neutrophile Chromatinstrukturen, genannt Neutrophile Extrazelluläre Traps (NETs), freigesetzt werden. Je nach Beschaffung des NETs können diese antibakteriell, antifungal oder antiviral wirken.^[131] Cell surface interactions at the vascular wall war ebenfalls inhibiert und bezieht sich auf die Leukozyten-Extravasation, bei dem weißen Blutkörperchen zu entzündetem Gewebe geleitet werden.^[132] Auch Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors lag inhibiert vor und fällt unter die Kategorie Vesikel-mediierter Transport (siehe Abbildung A4). Allgemein handelt es sich dabei um den ersten Schritt zur Beseitigung extrazellulärer Liganden aus dem Körper durch die Bindung an Scavenger-Rezeptoren.[133]

5.4.3 Auswirkungen von HRAS^{Gly12Ser} auf das Proteom



Abbildung 20: Der Volcano-Plot zeigt Veränderungen der Proteinabundanzen zwischen HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden und WT-Keratinozyten im Proteom. Proteine mit signifikant höheren Abundanzen in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5) sind rot gefärbt, während Proteine mit signifikant niedrigeren Abundanzen (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5) in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen blau sind. Proteine, für die mit OmixLitMiner mit dem Keyword "Costello Syndrome" relevante Publikationen gefunden wurden, sind golden gefärbt.

Die weiterführende Untersuchung des Proteoms wurde analog zu vorhergehenden Analysen durchgeführt. Im Proteom gab es keine FDR-signifikanten Proteine (q-Wert < 0,05) im Vergleich zwischen HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden und WT-Keratinozyten. Von den p-Wert-signifikanten Proteinen (p-Wert < 0,05) waren 47 höher abundant in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen (*Fold Change* > 1,5) und 82 niedriger abundant (*Fold Change* < 1,5; siehe Abbildung 20).

Betrachtet man zunächst die Proteine, die im Proteom höhere Abundanzen in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen aufwiesen, war *Plastin-2* (LCP1) das Protein mit dem größten *Fold Change*. LCP1 ist ein Aktin-bindendes Protein, welches auch in der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle spielt.^[134,135] Das folgende Protein, *Dynein light chain 2, cytoplasmic* (DYNLL2), ist als Teil des Dyneins für den Transport von Fracht durch die Zelle zuständig.^[136] *Protein NDRG1* (NDRG1), das Protein mit dem dritthöchsten *Fold Change*, ist Teil der von N-myc-herunterregulierten Familie und in diverse Funktionen involviert, darunter Zellwachstum, Differenzierung und Antwort auf Stress und Hormone. Außerdem wird das Protein NDRG1 für p53-mediierte Caspase-Aktivierung und Apoptose benötigt.^[137–139] Baculoviral IAP repeat-containing protein 7 (BIRC7) spielt ebenfalls eine Rolle in der Regulation der Apoptose und kann dabei sowohl pro- als auch anti-apoptotische Aktivitäten aufweisen.^[140] Das Protein mit dem fünfthöchsten Fold Change, Glycogen synthase kinase-3 alpha (GSK3A), ist eine multifunktionale Proteinkinase. GSK3A spielt eine Rolle in den WNT- und PI3K-Signalwegen, sowie in der Kontrolle einiger regulatorischer Proteine, wie Glycogen-Synthase und Transkriptionsfaktoren.^[141]

Das Protein mit der stärksten Änderung der Abundanz Richtung WT-Zellen war *Cystatin-S* (CST4). CST4 ist ein S-artiges Cystatin, welches eigentlich vor allem im Speichel vorkommt. Bei CST4 handelt es sich um einen Cystein-Peptidase-Inhibitor.^[142] Es folgte die *Sulfotransferase 1A4* (SULT1A4), ein zytosolisches Enzym, welches als Sulfotransferase die Sulfatkonjugation vieler Hormone, Neurotransmitter, und xenobiotischer Verbindungen katalysiert.^[143] *Protein NDRG2* (NDRG2), ebenfalls unter den Proteinen mit der stärksten Abundanzänderung Richtung WT-Zellen, ist ein Teil der N-myc-herunterregulierten Genfamilie und inhibiert etwa Glioblastom-Zellproliferation.^[144] Das verwandte Protein NDGR1 wurde bereits unter den Proteinen mit Auslenkung Richtung HRAS^{Gly12Ser-}Zellen erwähnt. RIN1, welches im Interaktom signifikant höher abundant war, war im Proteom signifikant niedriger abundant.



Abbildung 21: Der Bubble-Volcano-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege (p-Wert < 0,05, Fisher's Exact-Test), sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen im Proteom. Nur eindeutig aktivierte oder inhibierte Signalwege (absoluter z-Score > 0,1) werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr zum jeweiligen Signalweg gehörende Proteine wurden im Datensatz gefunden. Aktivierte Signalwege in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen (z-Score > 0) sind in Rot dargestellt, während inhibierte Signalwege (z-Score < 0) blau gefärbt sind.

Die biologischen Auswirkungen von HRAS^{Gly12Ser} auf das Proteom wurden analog zu vorhergehenden Analysen mit IPA ermittelt. Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, waren in der Proteomanalyse nur wenige Signalwege signifikant angereichert (p-Wert < 0,05). Insgesamt waren drei Signalwege aktiviert (*z-Score* > 0) und zwei inhibiert (*z-Score* < 0).

Unter den aktivierten Entitäten waren *Glycolysis I* und *Glucose Metabolism*, welche sich auf die Glykolyse beziehen. Diese stellt einen zentralen Stoffwechselweg dar, der für die Energiegewinnung durch die Oxidation von Glukose essenziell ist und der Bereitstellung von Vorläufermetaboliten für die Biosynthese dient.^[145] *TR/RXR Activation* war ebenso aktiviert und nimmt Bezug auf das Schilddrüsenhormon Triiodthyronin (T3), welches Wachstum, Stoffwechsel und Entwicklung durch die Aktivierung nukleärer Rezeptoren (TR) reguliert. Der Signalweg beeinflusst die Genexpression und den PI3K-Signalweg.^[146,147]

Keratinization war die Entität mit der höchsten p-Wert-Signifikanz und in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen inhibiert. Keratine machen den Großteil vollständig differenzierter Keratinozyten aus, und sind vor allem für die mechanische Stabilität einzelner Zellen und epithelialer Gewebe zuständig.^[115] *Mitochondrial Translation*, der zweite inhibierte Signalweg, beschreibt die Translation der 13 Proteine, welche in den menschlichen Mitochondrien lokal translatiert werden.^[148]



5.4.4 Auswirkungen von HRAS^{Gly12Ser} auf das Phosphoproteom

Abbildung 22: Der Volcano-Plot zeigt Veränderungen der Phosphopeptidabundanzen zwischen HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden und WT-Keratinozyten im Phosphoproteom. Phosphopeptide mit signifikant höheren Abundanzen in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5) sind rot gefärbt, während Phosphopeptide mit signifikant niedrigeren Abundanzen (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5) in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen blau sind. FDR-signifikante Proteine sind in dunkleren Farben hervorgehoben. Phosphopeptide, für deren zugehörige Proteine mit dem OmixLitMiner mit dem Keyword "Costello Syndrome" relevante Publikationen gefunden wurden, sind golden gefärbt.

Die weiterführende Untersuchung des Phosphoproteoms wurde analog zur Phosphoproteomanalyse von HRAS^{Gly13Arg} durchgeführt. 292 Phosphopeptide waren signifikant höher abundant in HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden Zellen (p-Wert < 0,05; *Fold Change* > 1,5), wobei 90 davon FDR-signifikant waren (q-Wert < 0,05). Hingegen waren 409 Phosphopeptide niedriger abundant (p-Wert < 0,05; *Fold Change* < 1,5; p-Wert < 0,05; davon 161 FDR-signifikant). Sie werden in dem *Volcano-Plot* in Abbildung 22 gezeigt.

Die Phosphopeptide mit den höchsten *Fold Changes* waren NUCKS1 S204 S214 und BCL3 S41. Beide wurden bereits im Zusammenhang mit der Phosphoproteomanalyse von HRAS^{Gly13Arg} angesprochen, in der sie ebenfalls signifikant höher abundant waren. Das folgende Protein, *Protein SET* (SET) inhibiert die Acetylierung von Nukleosomen durch Histon-Acetylasen (HATs) und reduziert dadurch HAT-abhängige Transkription.^[149] Die Phosphorylierungsstelle S7 wird von CDK1 phosphoryliert, was zur Inhibition von Apoptose und verstärktem Zellwachstum führt.^[98,150] Auch ein Phosphopeptid von *Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus* (ACIN1) mit einer Phosphorylierungsstelle an S216 war in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen signifikant höher abundant. ACIN1 ist Bestandteil des ASAP-Komplexes, der die RNA-Prozessierung inhibieren kann und die Apoptose fördert.^[106] Auch der *Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3* (EIF4G3 S232) ist als Teil des Proteinkomplexes eIF4F unter anderem für die Rekrutierung der mRNA zum Ribosom zuständig.^[151]

Das Phosphopeptid RIN1 S333 S337 war auch höher abundant. Das Protein RIN1 wurde bereits im Interaktom und im Proteom charakterisiert, über die beiden Phosphorylierungsstellen ist allerdings wenig bekannt. Auch NF1 wurde bereits im Proteom beschrieben, und das Phosphopeptid mit der Phosphorylierungsstelle S2543 wies auch hier eine erhöhte Abundanz auf. Wiederum ist nur wenig über die Phosphorylierungsstelle bekannt.

Das Phosphopeptid mit dem niedrigsten Fold Change war Teil des Nuclear pore complex protein Nup214 (NUP214) mit den Phosphorylierungsstellen S433 und T437. Das Protein ist im Kernporenkomplex vertreten und spielt eine wichtige Rolle im kernzytoplasmatischen Transport.^[152] Auch ein Phosphopeptid von NAD-dependant protein deacetylase sirtuin-1 (SIRT1 S47) war signifikant niedriger abundant. Es ist eine NAD-abhängige Protein-Deacetylase, welche an der Koordinierung einer Vielzahl an Funktionen beteiligt ist, darunter Apoptose und Autophagie. Zudem verknüpft sie die Energetik.^[153] Transkriptionsregulierung direkt intrazellulären Über mit der die Phosphorylierungsstelle S47 ist bekannt, dass sie SIRT1 aktiviert und von CDK9 phosphoryliert wird.^[98,154] Ein Phosphopeptid von Extended synaptotagmin-1 (ESYT1 S1034) war ebenfalls signifikant niedriger abundant in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen. ESYT1 hilft, das endoplasmatische Retikulum an die Zellmembran zu binden.^[155] E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin (SYVN1 S613) transferiert Ubiquitin von endoplasmatischen Retikulum-assoziierter UBC7 E2 Ligase auf Substrate, die daraufhin degradiert werden.^[156]

54



Abbildung 23: Der Bubble-Volcano-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege (p-Wert < 0,05, Fisher's Exact-Test), sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in HRAS^{Gly12Ser}-Keratinozyten im Phosphoproteom. Nur eindeutig aktivierte oder inhibierte Signalwege (absoluter z-Score > 0,1) werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr zum jeweiligen Signalweg gehörende Proteine wurden im Datensatz gefunden. Aktivierte Signalwege in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen (z-Score > 0) sind in Rot dargestellt, während inhibierte Signalwege (z-Score < 0) blau gefärbt sind.

Die biologischen Auswirkungen von HRAS^{Gly12Ser} auf das Phosphoproteom wurden analog zur Phosphoproteomanalyse von HRAS^{Gly13Arg} mit IPA analysiert. Es waren 24 Signalwege aktiviert und 35 inhibiert (p-Wert < 0,05; *z-Score* > 0 bzw. < 0), wie aus Abbildung 23 hervorgeht.

Der am stärksten aktivierte Signalweg war der *Sumoylation Pathway*. Sumoylierung ist eine posttranslationale Modifikation, welche diverse Prozesse reguliert, wie die Transkription, Replikation, Chromosom-Segregation und DNA-Reparatur.^[157] *Apoptotic Execution Phase* war ebenfalls aktiviert. Dabei leiten Caspasen die Apoptose ein, wobei z.B. der Nukleus und andere Organellen zerstört und die DNA fragmentiert werden.^[158] *p53 Signaling* war ebenso aktiviert und spielt eine Rolle bei der Response auf Zellstress, zum Beispiel durch Beschädigung der DNA oder UV-Strahlung. p53 reguliert diverse Prozesse, etwa DNA-Reparatur und Apoptose.^[159]

Unter den inhibierten Signalwegen war *Processing of capped intron-containing pre-mRNA* die Entität mit dem niedrigsten p-Wert. Auch *Histone Modification Signaling Pathway* war inhibiert. Die Entität bezieht sich auf die Modifikation von Histonen.^[118] Bestimmte Modifikationen, wie Acetylierungen und Methylierungen erleichtern die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren, was die Genexpression aktiviert. *RHO GTPase Cycle* war ebenfalls eine Entität mit niedrigem p-Wert. RHO-GTPasen gelten als Hauptregulatoren des Aktin-Zytoskeletts und sind für Prozesse wie Zellmigration, Zelladhäsion, Zellteilung und Polarisierung verantwortlich.^[160] *Actin Cytoskeleton Signaling*, ebenfalls eine inhibierte Entität, hängt also eng mit den zuvor genannten RHO-GTPasen zusammen. Das Aktin-Zytoskelett spielt eine wichtige Rolle in dynamischen Prozessen, wie etwa Zellbewegung, Axonführung, Zellteilung und Phagozytose.^[161] Die Entität mit dem niedrigsten *z-Score* war *Cellular Response to Heat Shock*, die sich auf Mechanismen bezieht, welche die Zelle bei erhöhten Temperaturen schützen sollen.^[162]

5.5 Charakterisierung von HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Keratinozyten

Onkogene HRAS-Varianten, von denen HRAS^{Gly12Val} einen großen Anteil ausmacht, spielen in 7% der menschlichen Tumore eine Rolle.^[38] Um zu ermitteln, wie sich HRAS^{Gly12Val}-exprimierende Keratinozyten von WT-Zellen unterscheiden, wurden Analysen auf Interaktom-, Proteom-, und Phosphoproteom-Ebene durchgeführt.





Abbildung 24: Venn-Diagramme, die alle Proteine umfassen, welche im Vergleich zwischen HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden und WT-Keratinozyten im Proteom, Interaktom, und Phosphoproteom (A) in ihrer Abundanz allgemein signifikant verändert waren (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5 oder > 1,5), (B) signifikant höhere Abundanzen in HRAS^{Gly12Val}-Zellen aufwiesen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5), (C) signifikant niedrigere Abundanzen in HRAS^{Gly12Val}-Zellen hatten (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5).

In den in Abbildung 24 gezeigten Venn-Diagrammen zeigten sich allgemeine Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Interaktom, Proteom, und Phosphoproteom Vergleich zwischen im HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Keratinozyten und WT-Zellen. Um die Datensätze mittels Venn-Diagrammen vergleichbar zu machen, wurden im Phosphoproteom alle Phosphopeptide ihren jeweiligen Proteinen zugeordnet, ein Verfahren, das auch für die anderen beiden Varianten angewandt wurde.

Allgemein gab es die größten Unterschiede im Phosphoproteom (p-Wert < 0,05; *Fold Change* > 1,5 oder < 1,5). Hier lagen insgesamt 335 Proteine signifikant verändert vor, mehr als im Proteom (161 Proteine) und im Interaktom (157 Proteine). Es gab nur wenige Proteine, welche in mehr als einem Datensatz signifikant veränderte Abundanzen aufwiesen - auf kein Protein traf das in allen Datensätzen gleichzeitig zu. In Abbildung 24A wurde sichtbar, dass das nur auf 10 Proteine im Proteom und im Interaktom zutraf, 12 im Interaktom und im Phosphoproteom, und 9 im Phosphoproteom und im Proteom. Hingegen waren 142 Proteine im Proteom, 135 im Interaktom, und 314 im Phosphoproteom ausschließlich in ihrem jeweiligen Datensatz signifikant in ihren Abundanzen verändert.

Bei Betrachtung aller Proteine mit signifikant erhöhten Abundanzen (p-Wert < 0,05; *Fold Change* > 1,5, siehe Abbildung 24B) fanden sich sechs Proteine sowohl im Proteom als auch im Interaktom wieder, sechs im Interaktom und im Phosphoproteom, und vier im Proteom und im Phosphoproteom. Auch hier war der Großteil der Proteine nur in einem der drei Datensätze signifikant erhöht – 96 im Proteom, 85 im Interaktom, und 153 im Phosphoproteom.

Die Überschneidung verringerte sich bei Proteinen mit signifikant niedrigeren Abundanzen (p-Wert < 0,05; *Fold Change* < 1,5; siehe Abbildung 24C) zwischen Proteom und Interaktom auf 3 Proteine, zwischen Proteom und Phosphoproteom auf 1 Protein, und zwischen Interaktom und Phosphoproteom gibt es keine Überlappungen mehr. Wiederum war der weitaus größte Anteil ausschließlich in einem Datensatz vorzufinden: 51 Proteine im Proteom, 57 im Interaktom, und 195 im Phosphoproteom.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass im Proteom und im Interaktom im Verhältnis mehr Proteine signifikant erhöhte Abundanzen in HRAS^{Gly12Val}-Zellen aufwiesen als im WT (106 vs. 55 im Proteom bzw. 97 vs. 60 im Interaktom). Im Phosphoproteom war das Gegenteil der Fall. Hier waren mit einem Verhältnis von 157 zu 193 mehr Proteine signifikant niedriger abundant als höher abundant.

58

5.5.2 Auswirkungen von HRAS^{Gly12Val} auf das Interaktom



Abbildung 25: Der Volcano-Plot zeigt Veränderungen der Proteinabundanzen zwischen HRAS^{Gly12Val}- und WT-Keratinozyten im Interaktom. Proteine mit signifikant höheren Abundanzen in HRAS^{Gly12Val}- exprimierenden Keratinozyten (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5) sind rot gefärbt, während Proteine mit signifikant niedrigeren Abundanzen (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5) in HRAS^{Gly12Val} Zellen blau sind. Proteine, für die mit OmixLitMiner mit den Keywords "Head, Neck, Cancer" oder "Squamous, Cell, Carcinoma" relevante Publikationen gefunden wurden, sind golden gefärbt. HRAS-Effektoren sind grün gekennzeichnet.

Die weitergehende Analyse des Interaktoms wurde analog zu den beiden anderen HRAS-Varianten durchgeführt. Im Interaktom waren von 157 p-Wert-signifikanten Proteinen (p-Wert < 0,05) 97 höher abundant in HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Zellen (*Fold Change* > 1,5) und 60 niedriger abundant (*Fold Change* < 1,5; siehe Abbildung 25). Lediglich ein Protein, KRAS, war auch FDR-signifikant (q-Wert < 0,05).

Unter den Proteinen mit der stärksten Auslenkung Richtung HRAS^{Gly12Val} befanden sich einige bekannte HRAS-Effektoren: RIN1, MLLT4, RAF1, ARAF, RAB5C, und NF1. Alle wurden bereits im Rahmen der Interaktomanalyse der HRAS^{Gly13Arg}-Zellen erläutert. Ein weiteres Protein mit starker Auslenkung Richtung HRAS^{Giy12Val}-Zellen war *Cytochrome P450 Family 1 Subfamily B Member 1* (CYP1B1). CYP1B1 ist eine Monooxygenase, welche vor allem Reaktionen im Zusammenhang mit den Arzneimittelstoffwechsel und der Synthese von Cholesterol, Steroiden und anderen Lipiden katalysiert.^[163] Unter anderem katalysiert es Prokarzinogene, wie etwa polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.^[164] Mit dem *OmixLitMiner* konnte festgestellt werden, dass genetische CYP1B1-Varianten mit erhöhtem Risiko für Kopf-Hals-Karzinome in Verbindung stehen.^[165] Der *OmixLitMiner* enthüllte zudem, dass verstärkte Expression des *Translocation protein SEC62* (SEC62) mit Plattenepithelkarzinomen und anderen Krebsarten zusammenhängt.^[166] Auch in der vorliegenden Analyse wies SEC62 eine erhöhte Abundanz auf.

KRAS war das Protein mit der signifikantesten Auslenkung Richtung WT-Zellen. Wie bereits beschrieben ist KRAS ist ein RAS-Protein und agiert als binärer molekularer *Switch*, wie auch HRAS, und spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation.^[73,74] Zudem wurden somatische KRAS-Mutationen in 30% aller humanen Krebsarten entdeckt, womit KRAS eines der am häufigsten von Mutationen betroffene Onkogen im Menschen ist, wie eine *OmixLitMiner*-Suche hervorbrachte.^[8] *Proteasome 20S subunit alpha 2* (PSMA2) war ebenfalls in seiner Abundanz reduziert und Teil des Proteasoms.^[167] RPL37 war, wie auch in der Variante HRAS^{Gly125er}, Richtung WT-Zellen ausgelenkt und ist, wie bereits erwähnt, Teil der großen 60S ribosomalen Untereinheit.^[126] *DEK proto-oncogene* (DEK) ist involviert in die Chromatin-Organisation^[168]. Zudem ist DEK-Überexpression mit oralem Plattenepithelkarzinomen assoziiert,^[169] wie auch *Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46* (DDX46)^[170] und *High mobility group protein B1* (HMGB1).^[171] Alle drei Proteine wurden mit dem *OmixLitMiner* identifiziert und liegen in der vorliegenden Analyse mit signifikant abgesenkten Abundanzen vor.



Abbildung 26: Der Bubble-Volcano-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege (p-Wert < 0,05, Fisher's Exact-Test) sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Keratinozyten im Interaktom. Nur eindeutig aktivierte oder inhibierte Signalwege (absoluter z-Score > 0,1) werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr zum jeweiligen Signalweg gehörende Proteine wurden im Datensatz gefunden. Aktivierte Signalwege in HRAS^{Gly12Val}-Zellen (z-Score > 0) sind in Rot dargestellt, während inhibierte Signalwege (z-Score < 0) blau gefärbt sind. Signalwege, welche in allen Datensätzen vorkommen, sind golden annotiert.

Die biologische Analyse des Interaktoms wurde mit IPA durchgeführt, nach dem gleichen Schema, welches für die beiden vorhergehenden Varianten angewandt wurde. Im Interaktom waren 21 Signalwege in HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Zellen aktiviert und 34 inhibiert (p-Wert < 0,05, *z-Score* > 0 bzw. *z-Score* < 0; siehe Abbildung 26).

Der am stärksten aktivierte Signalweg war *Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol,* welcher zusammen mit einem zweiten Signalweg auf eine Aktivierung des RNA-Metabolismus hindeutet (Zurodnung der Signalwege zu übergeordneten Kategorien siehe Abbildung A7 im Anhang). Ein weiterer hochaktivierter Signalweg war *Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures,* welcher sich auf die Zusammenstellung fibrillärer Kollagene im extrazellulären Raum bezieht.^[172] *Cell Junction Organization* war ebenfalls signifikant aktiviert und umfasst etwa alle Aspekte betreffend Zell-Zell-Verbindungsorganisation und Zell-Matrix-Interaktionen.^[173] Auch *RHO GTPase Cycle* war als Teil der Signaltransduktion aktiviert (siehe Abbildung A7). Wie bereits erwähnt, gelten

RHO-GTPasen als Hauptregulatoren des Aktin-Zytoskeletts und sind für Prozesse wie Zellmigration, Zelladhäsion, Zellteilung und Polarisierung von Bedeutung.^[63]

Unter den am stärksten inhibierten Signalwegen befand sich unter anderem Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors, ein Signalweg, welcher unter die Kategorie Vesikel-mediierter Transport fällt (siehe Abbildung A7). Allgemein handelt es sich dabei um den ersten Schritt zur Beseitigung extrazellulärer Liganden aus dem Körper durch die Bindung an Scavenger-Rezeptoren.^[133] Zusätzlich waren insgesamt sieben Entitäten, welche im Zusammenhang mit dem Immunsystem stehen, inhibiert (siehe Abbildung A7). Darunter fiel Neutrophil Degranulation, ein Prozess, welcher bereits in früheren Kapiteln angesprochen wurde. Neutrophile sind Leukozyten, die etwa bei Infektionen vom Immunsystem aktiviert werden. Granulen enthalten Substanzen, die etwa antimikrobiell oder proteolytisch wirken, und bei der Degranulation ausgestoßen werden.^[89] Zudem waren fünf Signalwege unter der Kategorie zelluläre Immunantwort inhibiert (siehe Abbildung A7), darunter auch Communication between Innate and Adaptive Immune Cells. Der Signalweg beschreibt zentrale Interaktionen zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem durch lösliche Faktoren wie Chemikalien und Zytokine und direkte Zellkommunikation. Während die angeborene Immunantwort schnell nach Antigenerkennung reagiert, entwickelt sich die adaptive Immunantwort verzögert, ist dafür aber hochspezifisch und resilient.^[174] Zum überwiegenden Anteil waren zudem Entitäten unter den Kategorien Organismal Growth and Development und Cancer inhibiert. Zudem war die Entität Keratinization inhibiert. Keratine machen den Großteil vollständig differenzierter Keratinozyten aus, und sind vor allem für die mechanische Stabilität einzelner Zellen und epithelialer Gewebe zuständig.^[175]

5.5.3 Auswirkungen von HRAS^{Gly12Val} auf das Proteom



Abbildung 27: Der Volcano-Plot zeigt Veränderungen der Proteinabundanzen zwischen HRAS^{Gly12Val}und WT-Keratinozyten im Proteom. Proteine mit signifikant höheren Abundanzen in HRAS^{Gly12Val}-Zellen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5) sind rot gefärbt, während Proteine mit signifikant niedrigeren Abundanzen (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5) in HRAS^{Gly12Val}-Zellen blau sind. FDR-signifikante Proteine sind in dunkleren Farben hervorgehoben. Proteine, für die mit OmixLitMiner mit den Keywords "Head, Neck, Cancer" oder "Squamous, Cell, Carcinoma" relevante Publikationen gefunden wurden, sind golden gefärbt.

Im Proteom waren von 161 p-Wert-signifikanten Proteinen (p-Wert < 0,05) 106 höher abundant (*Fold Change* > 1,5) und 55 niedriger abundant (*Fold Change* < 1,5) in HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Keratinozyten (siehe Abbildung 27). Sechs Proteine waren zudem FDR-signifikant (q-Wert < 0,05) - vier waren höher abundant in HRAS^{Gly12Val}-Zellen und zwei niedriger abundant.

Thymidine phosphorylase (TYMP), das FDR-signifikante Protein mit dem höchsten *Fold Change*, fördert die Angiogenese, also das Wachstum von Blutgefäßen.^[176] Zudem ist TYMP-Expression ein mutmaßlicher postoperativer Prognosemarker für Krebs, wie mit dem *OmixLitMiner* ermittelt wurde.^[177] Weitere FDR-signifikante Proteine waren *1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3* (PLCB3), ein Schlüsseltransduktor der G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Signalübertragung,^[178] ITGA6, welches essenziell für *NRG1-ERBB-Signaling* ist, sowie

Junctional adhesion molecule A (F11R), welches eine Rolle bei der Bildung von epithelialen *Tight Junctions* zu spielen scheint.^[179]

Desmoglein-3 (DSG3) war das Protein mit dem höchsten Fold Change, welches nur p-Wert-Signifikanz aufweisen konnte. Das Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Adhäsion und der Integrität des Gewebes.^[180] NDRG1 wurde bereits im Zusammenhang mit HRAS^{Gly12Ser} angesprochen, wo es ebenfalls höher abundant in den der Variante Variante-exprimierenden Zellen vorlag. Wie erwähnt, ist es Teil der von N-myc-herunterregulierten Familie und in diverse Funktionen involviert, darunter Zellwachstum, Differenzierung und Antwort auf Stress und Hormone. Außerdem wird das Protein NDRG1 für p53-mediierte Caspase-Aktivierung und Apoptose benötigt.^[137–139] Zudem ist die Überexpression des Proteins mit Kopf-Hals-Karzinomen assoziiert, wie der OmixLitMiner enthüllte.^[181] Das Text-Mining-Tool brachte ebenfalls hervor, dass Galectin-1 (LGALS1) in Verbindung mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit Kopf- und Halskrebs mit perineuraler Ausbreitung steht.^[182] Auch KRAS war im Proteom signifikant höher abundant in HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Zellen – im Gegensatz zum Interaktom, wo KRAS signifikant niedriger abundant vorlag.^[8]

Das FDR-signifikante Protein mit dem niedrigsten *Fold Change* war *Barrier-to-autointegration factor* (BANF1), ein vielseitiges, DNA-bindendes Protein, das eine zentrale Funktion bei der mitotischen Kernarchitektur, der Chromatinorganisation, der zellulären Antwort auf DNA-Schäden, der Regulation der Genexpression sowie der intrinsischen Immunabwehr gegen fremde DNA übernimmt.^[183] Das zweite FDR-signifikante Protein, *RRP15-like protein* (RRP15), ist ein ribosomales, RNA-prozessierendes Protein.^[184]

Das p-Wert-signifikante Protein mit dem niedrigsten *Fold Change* war CST4, wie auch bei der Variante HRAS^{Gly12Ser}. CST4 ist ein S-artiges Cystatin, welches eigentlich vor allem in Speichel vorkommt, und es handelt sich um einen Cystein Peptidase Inhibitor.^[142] *Nuclear pore glycoprotein p62* (NUP62) ist Teil des Kernporenkomplexes, welcher den Durchfluss von Makromolekülen zwischen Nukleus und Zytoplasma reguliert.^[185]

Der *OmixLitMiner* ergab zudem, dass *Nibrin* (NBN) und *Ras-related protein R-Ras2* (RRAS2) beide überexprimiert in Plattenepithelkarzinomen identifiziert wurden.^[186,187] In dem vorliegenden Datensatz waren die beiden Proteine jedoch signifikant niedriger abundant in der onkogenen Variante.

64



Abbildung 28: Der Bubble-Volcano-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege (p-Wert < 0,05, Fisher's Exact-Test) sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Keratinozyten im Proteom. Nur eindeutig aktivierte oder inhibierte Signalwege (absoluter z-Score > 0,1) werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr zum jeweiligen Signalweg gehörende Proteine wurden im Datensatz gefunden. Aktivierte Signalwege in HRAS^{Gly12Val}-Zellen (z-Score > 0) sind in rot dargestellt, während inhibierte Signalwege (z-Score < 0) blau gefärbt sind. Signalwege, welche in allen Datensätzen vorkommen, sind golden annotiert.

Die Signalweganalyse wurde analog zu den vorhergehenden Varianten mit IPA durchgeführt. Insgesamt waren im Proteom 24 Signalwege aktiviert und 15 inhibiert (p-Wert < 0,05; *z-Score* > 0 bzw. < 0), wie in Abbildung 28 gezeigt wird.

Die Entität mit dem höchsten z-Score, und somit der stärksten Aktivierung, war Keratinization, welche im Interaktom inhibiert vorlag. Signaling by MET hatte den niedrigsten p-Wert und lag ebenso aktiviert MET ist vor. eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, welche durch Bindung an den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) aktiviert wird. In weiterer Folge können dadurch zahlreiche Signalwege, etwa PI3K-AKT, RAS, STAT3 und andere aktiviert werden. MET-Signale fördern unter Anderem das Zellwachstum und Beweglichkeit, und sind für Geweberegeneration essenziell. Fehlfunktionen, etwa durch Überfunktionen über aktivierende Mutationen sind häufig im Krebs zu beobachten.^[188]

Nuclear Cyoskeleton Singaling Pathway lag ebenfalls aktiviert vor. Die Entität beschreibt LINC-Komplexe, welche das Nukleoskelett mit dem Zytoskelett verbinden. LINC-Komplexe spielen eine zentrale Rolle bei der Übertragung von mechanischer Information von der Zelloberfläche mit dem Nukleus. Diese Kräfte werden beispielsweise über Integrine, Cadherine und fokale Adhäsionskomplexe auf das Zytoskelett übertragen und führen zur Anpassung der Kernstruktur, Chromatinorganisation und Genexpression.^[189] *Cell surface interactions at the vascular wall* ist in dem Kontext ebenfalls erwähnenswert, da es von der Leukozyten-Extravasation handelt, ein Prozess, bei dem weiße Blutkörperchen zu Entzündungsstellen geführt werden. Insgesamt geht es bei dem Prozess um die Wechselwirkung zwischen Plättchen, Leukozyten, und Endothelzellen als Reaktion auf Gefäßverletzungen.^[132] Im Proteom war *RHO GTPase Cycle* aktiviert, wie auch im Interaktom.

Unter den am stärksten inhibierten Entitäten befinden sich mit Krebs in Zusammenhang stehende Signalwege (Zuordnung der Signalwege zu Kategorien siehe Abbildung A8 im Anhang), zum Beispiel *Hereditary Breast Cancer Signaling*. Ein weiteres Beispiel ist der *SPINK1 General Cancer Pathway*, der ebenfalls inhibiert ist. SPINK1 ist mehreren Krebsarten überexprimiert, darunter Pankreas-, Lungen-, Brust- und Prostatakrebs, und wird mit schlechter Prognose und aggressiver Krankheit in Verbindung gebracht.^[190] *PAK Signaling*, auch inhibiert vorliegend, nimmt auf PAKs Bezug. Diese sind p21-aktivierte Kinasen, die durch externe Signale aktiviert werden und Funktionen wie Aktin-Zytoskelett-Organisation, Zellzyklusregulation, oder Apoptose steuern.^[191] *Agrin Interactions at Neuromuscular Junction* beschreibt neuromuskuläre Verbindung, welche durch das Signalprotein Agrin entstehen, indem das Protein von Motoneuronen an Kontaktstellen mit Muskelzellen abgegeben wird. Agrin initiert dabei die Synapsenbildung und aktiviert die Muskelspezifische Tyrosinkinase (MuSK). Aktiviertes MuSK löst Signalkaskaden aus, die die Verbindung zum Zytoskelett fördern.^[192] *Virus Entry via Endocytic Pathways* beschreibt das Eindringen von Viren in Wirtszellen mittels Endozytose.^[193]

5.5.4 Auswirkungen von HRAS^{Gly12Val} auf das Phosphoproteom



Abbildung 29: Der Volcano-Plot zeigt Veränderungen der Phosphopeptidabundanzen zwischen der HRAS^{Gly12Val}- und WT-Zellen im Phosphoproteom. Phosphopeptide mit signifikant höheren Abundanzen in HRAS^{Gly12Val}-Zellen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5) sind rot gefärbt, während Phosphopeptide mit signifikant niedrigeren Abundanzen (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5) in HRAS^{Gly12Val}-Zellen blau sind. FDR-signifikante Phosphopeptide sind in dunkleren Farben hervorgehoben. Proteine, für die mit OmixLitMiner mit den Keywords "Head, Neck, Cancer" oder "Squamous, Cell, Carcinoma" relevante Publikationen gefunden wurden, sind golden gefärbt.

Die Analyse der Phosphopeptide mittels *PhosphoSitePlus* und *OmixLitMiner* wurde analog zu den beiden anderen Varianten durchgeführt.^[98] Insgesamt waren 188 Phosphopeptide in HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Zellen signifikant höher abundant (p-Wert < 0,05; *Fold Change* > 1,5). Davon waren 30 Proteine FDR-signifikant (q-Wert < 0,05). 229 Proteine waren signifikant niedriger abundant (p-Wert < 0,05; *Fold Change* < 1,5), wovon 90 Proteine FDR-signifikant waren (q-Wert < 0,05). Das geht aus Abbildung 29 hervor.

Das FDR-signifikante Phosphopeptid mit dem höchsten *Fold Change* war SET S7, welches auch in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen ein signifikant höher abundantes Phosphopeptid darstellte. Wie erwähnt inhibiert es die Acetylierung von Nukleosomen durch Histonacetylasen (HATs) und reduziert dadurch HAT-abhängige Transkription.^[98,149] S7 wird von CDK1 phosphoryliert, was zur Inhibition von Apoptose und verstärktem Zellwachstum führt.^[150] Das folgende Phosphopeptid war Teil des *HUWE1-associated protein modifying stress responses 1* (C16orf72 S167). Das Protein C16orf72 fungiert als negativer Regulator von TP53/P53 bei der zellulären Reaktion auf Telomer-Erosion und wahrscheinlich auf DNA-Schäden.^[194] Die Phosphorylierungsstelle S167 wurde bereits im Zusammenhang mit Brustkrebs identifiziert, wie *PhosphoSitePlus* hervorbrachte.^[98,195] *DNA topoisomerase 2-alpha* (TOP2A S1377) hat einen Einfluss auf die DNA-Topologie.^[196] Die Phosphorylierungsstelle S1377 steht laut *PhosphoSitePlus* im Zusammenhang mit Melanomen.^[98,197] Mutationen in *Cellular tumor antigen p53* (TP53 S315) konnten laut *OmixLitMiner* mit Kopf-Hals-Karzinomen in Verbindung gebracht werden.^[198] Zudem ist S315 an TP53 eine gut erforschte Phosphorylierungsstelle, die unter anderem Karzinogenese induziert, wie aus *PhosphoSitePlus* hervorgeht.^[98,199]

Das Phosphopeptid mit dem niedrigsten *Fold Change* war Teil des *Zinc finger protein 618* (ZNF618 S429), ein Protein, welches die Position von UHRF2 an Chromatin kontrolliert.^[200] Ein Peptid des Proteins *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16* (USP16 S415) war ebenfalls höher abundant in WT-Zellen. USP16 deubiquitiniert einen spezifischen Tag für die epigenetische transkriptionelle Repression an Histon 2A, und agiert daher als Ko-Aktivator.^[201] *Dedicator of cytokinesis protein 5* (DOCK5 S1766) ist ein GEF für RHO und RAC; und aktiviert dabei kleine GTPasen, indem es GDP gegen GTP tauscht.^[202]



Abbildung 30: Der Bubble-Volcano-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege (p-Wert < 0,05, Fisher's Exact-Test), sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Keratinozyten im Phosphoproteom. Nur eindeutig aktivierte oder inhibierte Signalwege (absoluter z-Score > 0,1) werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr zum jeweiligen Signalweg gehörende Proteine wurden im Datensatz gefunden. Aktivierte Signalwege in HRAS^{Gly12Val}-Zellen (z-Score > 0) sind in Rot dargestellt, während inhibierte Signalwege (z-Score < 0) blau gefärbt sind. Signalwege, welche in allen Datensätzen vorkommen, sind golden annotiert.

Die Signalweganalyse des Phosphoproteoms wurde analog zu den beiden anderen Varianten durchgeführt. Im Phosphoproteom waren 21 Signalwege in HRAS^{Gly12Val}-Zellen aktiviert und 23 inhibiert (p-Wert < 0,05; *z-Score* > 0 bzw. < 0; siehe Abbildung 30).

Auch im Phosphoproteom war der Signalweg *RHO GTPase Cycle* als Vertreter der Signaltransduktion aktiviert (Zuordnung der Signalwege zu Kategorien siehe Abbildung A9).^[63] Der am stärksten aktivierte Signalweg war der *Sumoylation Pathway*. Sumoylierung ist eine posttranslationale Modifikation, welche diverse Prozesse, wie die Transkription, Replikation, Chromosom-Segregation und DNA-Reparatur umfasst.^[157] Auch *HIPPO Signaling* lag im aktivierten Zustand vor und spielt eine Rolle bei der Regulation des Wachstums von Epithelzellen.^[203] Wiederum war *Keratinization* aktiviert, ein Prozess, welcher bereits in der Interaktomanalyse angesprochen wurde.

Zwei stark inhibierte Signalwege hatten Bezug zum RNA-Metabolismus (siehe Abbildung A9), darunter *Processing of capped intron-Containing pre-mRNA* sowie *Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol*. Zusätzlich war der *Histone Modification Signaling Pathway* inhibiert, welcher sich wie bereits in früheren Kapiteln erwähnt auf die Regulation bestimmter Histon-Modifikationen, wie beispielsweise Acetylierungen und Methylierungen, bezieht.^[118] Die am stärksten inhibierte Entität war *TCF dependent signaling in response to WNT*. Hierbei wird über den kanonischen WNT-Signalweg TCF/LEF-abhängige Transkription aktiviert, welche Prozesse wie Proliferation, Selbsterneuerung von Stammzellen oder Tumorbildung beeinflusst.^[204]

5.6 Vergleich zwischen den HRAS-Varianten-exprimierenden Keratinozyten

Wie aus den vorangehenden Kapiteln hervorgeht, gibt es bei den Auswirkungen der drei HRAS-Varianten auf Keratinozyten Unterschiede, aber auch zahlreiche Gemeinsamkeiten. Um ein abschließendes Bild darüber zu erhalten, werden die signifikant veränderten Proteine zwischen den HRAS^{Gly13Arg}-, HRAS^{Gly12Ser}-, und HRAS^{Gly12Val}-Zellen im Vergleich zum WT im Interaktom, Proteom, und Phosphoproteom untereinander verglichen. Zudem werden die Ergebnisse aller Signalweganalysen gegenübergestellt.

5.6.1 Interaktom



Abbildung 31: Venn-Diagramme, die alle Proteine umfassen, welche im Interaktom in den HRAS^{Gly13Arg}-, HRAS^{Gly12Ser}-, und HRAS^{Gly12Val}-Zellen im Vergleich zu HRAS^{WT-}Zellen **(A)** signifikant höhere Abundanzen aufwiesen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5), **(B)** signifikant niedrigere Abundanzen hatten (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5).

In Abbildung 31A zeigte sich zunächst, dass in HRAS^{Gly13Arg}-exprimierenden Keratinozyten im Vergleich zu WT-Zellen im Interaktom mit Abstand die meisten Proteine signifikant erhöhte Abundanzen aufwiesen (p-Wert < 0,05; *Fold Change* > 1,5): Insgesamt waren das 818 Proteine, im Vergleich zu nur 37 Proteinen in HRAS^{Gly12Ser}- und 97 in HRAS^{Gly12Val}-Zellen. Einige Proteine waren aber in allen Varianten höher abundant als im WT (22), besonders traf das auf HRAS-Effektoren zu. Verhältnismäßig wenige Proteine waren spezifisch nur in HRAS^{Gly12Ser}- bzw. HRAS^{Gly12Val}-Keratinozyten signifikant höher abundant (6 bzw. 11 Proteine). Hingegen wiesen 727 Proteine ausschließlich in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen eine signifikant höhere Abundanz auf. Nur wenige Proteine wiesen in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen signifikant abgesenkte Abundanzen im Vergleich mit WT-Zellen auf (p-Wert < 0,05; *Fold Change* < 1,5), deutlich weniger als in HRAS^{Gly12Ser}- bzw. HRAS^{Gly12Val}-Zellen (Respektive 5, 77, und 59 Proteine; siehe Abbildung 31B). Dennoch waren zwei Proteine in allen Varianten in ihrer Abundanz abgesenkt, und zwischen HRAS^{Gly12Ser} bzw. HRAS^{Gly12Val} gab es mit 23 Proteinen eine relativ große Überschneidung.

Tabelle 2: KRAS, RAP1B, und HRAS-Effektoren im Vergleich zwischen allen HRAS-Varianten nach ANOVA-Test und *post-hoc Tukey's HSD-Test*. In der Tabelle werden die Gennamen, die ANOVA p-Werte, sowie die Mittelwerte der Proteinabundanzen (Log2-transformiert und *Column-median* normalisiert) innerhalb der vier Phänotypen gezeigt.

Genname	ANOVA p-Wert	Mittelwert der Proteinabundanzen innerhalb der Phänotypen			
		HRAS ^{WT}	HRAS ^{Gly12Arg}	HRAS ^{Gly12Ser}	HRAS ^{Gly12Val}
KRAS	2,13E-11	10,73	-9,60	-9,72	-10,73
RAP1B	4,23E-08	-6,57	-5,37	7,37	-7,37
MLLT4	1,26E-05	-4,97	3,47	3,95	4,97
RAF1	1,54E-05	-4,90	3,89	3,24	4,90
RIN1	1,96E-05	-4,83	3,41	3,54	4,83
RAB5C	5,04E-05	-4,61	4,61	-2,31	-2,51
ARAF	9,15E-04	-2,80	2,80	1,37	2,80
PIK3R1	2,85E-03	-2,13	2,50	-2,50	-1,41
RGL2	1,02E-02	0,00	2,21	-2,21	0,00

Die Interaktion der HRAS-Varianten mit bekannten HRAS-Effektoren sowie den beiden RAS-Proteinen KRAS und RAP1B wurde in Tabelle 2 noch einmal näher beleuchtet. Um die Interaktion dieser Proteine zwischen den HRAS-Varianten und HRAS^{WT} vergleichbar zu machen, wurde ein ANOVA-Test mit anschließenden post hoc Tukey's HSD-Test durchgeführt. Die in Tabelle 2 angegebenen ANOVA p-Werte sind damit ein Maß für die Unterscheidbarkeit der Proteinabundanzen zwischen allen vier Phänotypen. Zudem sind die jeweils die Mittelwerte der Proteinabundanzen (Log2-transformiert und Columnmedian normalisiert) für jeden Phänotypen aufgelistet. Dabei war festzustellen, dass die Interaktion mit KRAS in allen Varianten im Vergleich zu HRAS^{WT} stark abnahm, während RAP1B lediglich mit HRAS^{Gly12Ser} verstärkt interagierte. Bei vier HRAS-Effektoren, RAF1, ARAF, MLLT4, und RIN1, war in allen HRAS-Varianten gleichermaßen eine verstärkte Interaktion festzustellen. RAB5C interagierte ebenfalls stärker mit allen HRAS-Varianten, besonders aber mit HRAS^{Gly13Arg}. PIK3R1 wies dagegen spezifisch in HRAS^{Gly13Arg} eine höhere Abundanz auf, und RGL2 lediglich in HRAS^{Gly12Ser} eine abgesenkte Abundanz. Für RGL2 scheint hier ein positiver Wert für HRAS^{Gly13Arg} auf, weil der Effektor im Vergleich HRAS^{Gly13Arg} vs. HRAS^{Gly12Ser} signifikant höher abundant war. Jedoch reichte die Abundanzänderung nicht aus, dass RGL2 in HRAS^{Gly13Arg} im Vergleich mit HRAS^{WT} signifikant verändert vorlag, weshalb RGL2 in früheren Analysen nicht erwähnt wurde.
5.6.2 Proteom



A Signifikant höher abundante Proteine

B Signifikant niedriger abundante Proteine

Abbildung 32: Venn-Diagramme, die alle Proteine umfassen, welche im Proteom in HRAS^{Gly13Arg}, HRAS^{Gly12Ser}-, und HRAS^{Gly12Val}-Zellen im Vergleich zu HRAS^{WT-}Zellen **(A)** signifikant höhere Abundanzen aufwiesen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5), **(B)** signifikant niedrigere Abundanzen hatten (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5).

In Abbildung 32 ließ sich feststellen, dass HRAS^{Gly13Arg}-exprimierende Zellen im Vergleich mit WT-Zellen insgesamt die meisten differenziell in ihren Abundanzen veränderten Proteine aufwiesen. Es waren sowohl mehr Proteine signifikant höher abundant (p-Wert < 0,05; *Fold Change* > 1,5; 311 vs. 47 vs. 106 Proteine) als auch signifikant niedriger abundant (p-Wert < 0,05; *Fold Change* < 1,5; 303 vs. 82 vs. 48 Proteine) als im Vergleich der HRAS^{Gly12Ser}- bzw. HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Zellen gegen WT-Zellen. 14 bzw. drei Proteine waren in allen drei Varianten gleichermaßen in ihrer Abundanz verändert. Ein bedeutender Anteil der Proteine wies lediglich in einer der drei Varianten-exprimierenden Zellen signifikant erhöhte Abundanzen auf: 255 in HRAS^{Gly13Arg}, 21 in HRAS^{Gly12Ser}, und 58 in HRAS^{Gly12Val}. Umgekehrt wiesen 256 Proteine ausschließlich in HRAS^{Gly13Arg}, 43 lediglich in HRAS^{Gly12Ser}, und 29 nur in HRAS^{Gly12Val} signifikant reduzierte Abundanzen auf.

5.6.3 Phosphoproteom



A Signifikant höher abundante Proteine

B Signifikant niedriger abundante Proteine

Abbildung 33: Venn-Diagramme, die alle Proteine umfassen, welche im Phosphoproteom in HRAS^{Gly13Arg}-, HRAS^{Gly12Ser}-, und HRAS^{Gly12Val}-Zellen im Vergleich zu HRAS^{WT-}Zellen (**A**) signifikant höhere Abundanzen aufwiesen (p-Wert < 0,05, Fold Change > 1,5), (**B**) signifikant niedrigere Abundanzen hatten (p-Wert < 0,05, Fold Change < 1,5).

Im Phosphoproteom spiegeln die Venn-Diagramme in Abbildung 33 Ähnlichkeiten zwischen allen drei HRAS-Varianten wider. So waren 53 Proteine in allen drei Varianten-exprimierenden Zellen signifikant höher abundant als in WT-Zellen (p-Wert < 0,05; *Fold Change* > 1,5), und 127 Proteine waren in allen Varianten gleichermaßen signifikant niedriger abundant (p-Wert < 0,05; *Fold Change* < 1,5). Nur eine Minderheit der Proteine war jeweils spezifisch in einer Variante höher abundant (110 in HRAS^{Gly13Arg}, 81 in HRAS^{Gly12Ser}, und 39 in HRAS^{Gly12Val}). Bei Proteinen mit signifikant reduzierten Abundanzen zeigte sich ein ähnliches Bild. 141 waren nur in HRAS^{Gly13Arg}, 99 lediglich in HRAS^{Gly12Ser}, und 25 ausschließlich in HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden Keratinozyten verändert als in den HRAS^{Gly12Val}-Zellen.

5.6.4 Vergleich der Signalweganalysen

		Differenzielle Regulation								
		Interaktom		Proteom			Phospho			
Funktionelle Gruppe	Signalwegkategorie	HRAS ^{giy13Arg}	HRAS ^{Gly125er}	HRAS ^{Gly12Val}	HRAS ^{Gly13Arg}	HRAS ^{Gly125er}	HRAS ^{Gly12Val}	HRAS ^{Gly13Arg}	HRAS ^{Gly125er}	HRAS ^{Gly12Val}
	Signaltransduktion									
	Zellantwort auf Stimuli									
	Intrazelluläres und Second Messenger Signaling									
	Kardiovaskuläres Signaling									
Zelluläres Signaling	Neurotransmitter- und anderes Nervensystem-Signaling									
Zenulares Signaling	Wachstumsfaktor-Signaling									
	Pathogen-beeinflusstes Signaling									
	Krankheitsspezifische Signalwege und Krebs									
	Zytokin-Signaling									
	Nuklearrezeptor-Signaling									
	Zell-Zell-Kommunikation									
Zell-Zell- und Zell-Watrix-	Extrazelluläre Matrix-Organisation									
Kommunikation/Organisation	Vesikel-mediierter Transport									
Transkriptionelle Regulierung	Genexpression									
und Genexpression	Regulation der Transkription									
	Biosynthese									
	Metabolismus									
	RNA-Metabolismus									
	Protein-Metabolismus									
Metabolismus	Generation von Precursor-Metaboliten und Energie									
	Ingenuity Toxicity List Signalweg									
	Xenobiotischer Metabolismus									
	Degradation/Utilisation/Assimilation									
	Detoxifizierung									
	Homöostase									
	Immunsystem									
Immunsystem und Zellantwort	Humorale Immunantwort									
auf extrinsischen/intrinsischen	Zelluläre Immunantwort									
Stress	Zellstress und -verletzung									
l	DNA-Reparatur									
	Entwicklungsbiologie									
	Wachstum und Entwicklung des Organismus									
Entwicklung, Wachstum.	Zellwachstum, -proliferation, und -entwicklung									
Proliferation, Differenzierung,	Zellzyklus									
und Tod	Regulierung des Zellzvklus									
	Apoptose									
	Programmierter Zelltod									

Abbildung 34: Vergleich der Stärke der Veränderung der zusammengefassten Signalwegkategorien der Bubble-Charts im Interaktom, Proteom, und Phosphoproteom aller HRAS-Varianten-exprimierenden Zellen gegen WT-Keratinozyten. Alle Signalwege einer Bubble-Chart-Kategorie (siehe Abbildungen A1-A9) wurden zusammengefasst und nach p-Wert und z-Score gewichtet. Je intensiver das Rot, desto stärker die Aktivierung, je intensiver das Blau, desto stärker die Inhibition dieser Kategorie in diesem Datensatz. Weiße Felder bedeuten, dass die jeweilige Signalwegkategorie in diesem Datensatz nicht differenziell reguliert vorlag. Abbildung 34 gibt einen zusammengefassten Überblick darüber, welche Signalwegkategorien in welcher Variante bzw. welchem Datensatz (Interaktom, Proteom, Phosphoproteom) besonders stark aktiviert oder inhibiert waren. Es zeigte sich, dass im Interaktom besonders viele Kategorien in HRAS^{Giy13Arg}-Zellen aktiviert waren, darunter einige den Metabolismus betreffend, aber auch Genexpression, transkriptionelle Regulierung, intrazelluläres und *Second Messenger Signaling*, Zellwachstum, -proliferation, und -entwicklung sowie Entwicklungsbiologie. In den anderen beiden Varianten, besonders aber in HRAS^{Giy12Val}-Zellen, waren im Interaktom dagegen viele Funktionen inhibiert, darunter die genannten Kategorien Zellwachstum, -proliferation, und -entwicklung und Entwicklungsbiologie, aber auch der Vesikel-mediierte Transport, Homöostase und die zelluläre Immunantwort. HRAS^{Giy12Ser}-Zellen sind zudem die einzigen, in denen der Protein-Metabolismus inhibiert war. Eine Gemeinsamkeit zwischen allen Varianten war, dass das Immunsystem inhibiert war.

Im Proteom gab es keine Kategorie, welche in allen Varianten differenziell reguliert vorlag, was den direkten Vergleich erschwert. Jedoch waren etwa der Metabolismus, sowie die Generation von *Precursor*-Metaboliten und Energie in den Varianten HRAS^{Gly13Arg} und HRAS^{Gly12Ser} aktiviert, während die Entwicklungsbiologie in HRAS^{Gly12Ser} inhibiert und in HRAS^{Gly13Arg} aktiviert war. Signaltransduktion sowie Zellstress und -verletzung waren sowohl in HRAS^{Gly13Arg} als auch in HRAS^{Gly12Val} aktiviert, intrazelluläres *Signaling* dagegen inhibiert. Einige weitere Funktionen, wie Wachstum und Entwicklung, der Zellzyklus, und *Pathogen-Signaling* sowie Krebs waren in HRAS^{Gly13Arg} erhöht, aber in HRAS^{Gly12Val} inhibiert.

Im Phosphoproteom waren insgesamt weniger Kategorien differenziell reguliert und es gab weniger Unterschiede zwischen den Varianten. Der bedeutendste Unterschied war bei der Kategorie Programmierter Zelltod erkennbar, die in HRAS^{Gly13Arg}-Keratinozyten inhibiert war aber in den anderen beiden Varianten aktiviert, oder bei zellulärem Stress und Verletzung, welche in HRAS^{Gly12Ser} aktiviert war, aber in HRAS^{Gly13Arg} inhibiert. Alle Varianten hatten gemein, dass Genexpression und transkriptionelle Regulierung, sowie RNA-Metabolismus und Zellwachstum, -proliferation, und -entwicklung inhibiert waren.

6. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels LC-MS/MS-basierter Proteomik ein tiefer Einblick darüber gewonnen werden, wie sich HRAS^{Gly13Arg}, HRAS^{Gly12Ser}, und HRAS^{Gly12Val} auf humane Keratinozyten auswirken. Damit konnte ein wertvoller Beitrag zur Ermittlung der molekularen Grundlage der mit diesen HRAS-Varianten assoziierten Pathologien geleistet werden: der mosaischen RASopathie Nävus Sebaceus (HRAS^{Gly13Arg}), der einer Keimzellmutation zugrunde liegenden RASopathie CS (HRAS^{Gly12Ser}), und der onkologischen Variante HRAS^{Gly12Val}.^[27,28,38] Nachdem ermittelt worden war, wie sich die genannten Aminosäuren-Substitutionen auf die Interaktion von HRAS mit Effektoren und anderen Proteinen auswirkte, wurden über die Analyse des Gesamtzell-Proteoms und des Phosphoproteoms Rückschlüsse über veränderte Signalwege und Funktionen in jeder Varianten-exprimierenden Zellpopulation möglich.

Zunächst aber konnte mittels LC-MS/MS-Analyse bestätigt werden, dass alle HRAS-Varianten wie vorgesehen exprimiert wurden (siehe Abbildungen 7 und 8). Alle hier beobachteten Änderungen im Interaktom, im Proteom, und im Phosphoproteom beruhen also auf der Expression der entsprechenden HRAS-Varianten. In der Hauptkomponentenanalyse zeichnete sich dann ab, dass es in jedem Datensatz Unterschiede zwischen allen Phänotypen gab (siehe Abbildung 9). Jedoch hoben sich HRAS^{Gly13Arg}-Zellen am deutlichsten ab. Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich die Tertiärstruktur durch den Tausch von Glycin durch Arginin am maßgeblichsten ändert. Arginin ist die basischste Aminosäure und kann sowohl elektrostatische Wechselwirkungen als auch H-Brückenbindungen eingehen, zudem hat es eine lange Seitenkette, womit es sich deutlich von Glycin unterscheidet.^[32] Serin kann zwar ebenfalls H-Brücken ausbilden, besitzt aber eine kleinere Seitenkette als Arginin und kann keine elektrostatischen Wechselwirkungen vollziehen.^[31] Valin hingegen besitzt lediglich eine apolare Seitenkette und ist damit der ursprünglichen Aminosäure, Glycin, am ähnlichsten (siehe Abbildung 2).^[32] Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften dieser Aminosäuren war es erwartbar, dass sich die Expression aller HRAS-Varianten abweichend auf das Interaktom, und somit in weiterer Folge auf das Gesamtzell-Proteom und das Phosphoproteom auswirkten.^[27-30]

Zudem konnten durch die kombinierte Analyse von Interaktom, Proteom, und Phosphoproteom unterschiedliche Aspekte der Zellbiologie abgedeckt werden. Die Venn-Diagramme in den Abbildungen 10, 17 und 24 zeigten, dass ein Großteil der Proteine lediglich in einem der drei Datensätze signifikante Abundanzänderungen aufwies und nur wenige Proteine in mehreren Datensätzen gleichzeitig verändert vorlagen. So waren im Vergleich HRAS^{Gly13Arg} vs. WT beispielsweise 731 Proteine nur im Interaktom signifikant höher abundant, 247 Proteine ausschließlich im Proteom, und 195 Proteine lediglich im Phosphoproteom (p-Wert < 0,05; *Fold Change* > 1,5, siehe Abbildung 10). Im Kontrast dazu waren nur vier Proteine waren in allen Datensätzen gleichzeitig signifikant verändert. Einige Proteinabundanzen waren sogar signifikant gegenteilige Richtungen verändert, wie zum Beispiel das Protein RBM26, welches im Interaktom und im Proteom einen positiven *Fold Change* aufwies (*Fold Change* = 1,98 bzw. 0,874), im Phosphoproteom aber einen negativen *Fold Change* (*Fold Change* = -2,13; siehe Tabelle A1 im Anhang).

Die Beobachtung, dass sich in jedem Datensatz unterschiedliche Aspekte der Zellbiologie zeigten, setzte sich in der Signalweganalyse fort. Auch hier war ein großer Teil der Signalwege nur in einem Datensatz verändert. Zum Beispiel waren im Vergleich HRAS^{Gly13Arg} vs. WT 165 Signalwege im Interaktom, 111 Signalwege im Proteom und 69 Signalwege im Phosphoproteom signifikant angereichert, aber lediglich 13 Signalwege waren in allen Datensätzen präsent. Von diesen lag nur der *Protein Ubiquitination Pathway* in allen drei Datensätzen aktiviert vor; die anderen 12 Signalwege waren in allen Datensätzen unterschiedlich reguliert (siehe Tabelle A2 im Anhang).

Die Diskrepanzen zwischen Interaktom, Proteom, und Phosphoproteom sind kein überraschendes Ergebnis, da sich die Probenvorbereitungen jeweils grundlegend unterschieden. Bei Ko-IPs, welche für die Analyse des Interaktoms durchgeführt wurden, wird das Zielprotein HRAS (als WT oder als Variante) zusammen mit Bindungspartnern aus dem Zelllysat isoliert. Dadurch kann analysiert werden, ob Proteine etwa stärker an eine HRAS-Variante oder den WT binden.^[51] Jedoch kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie sich Proteinzusammensetzung in der gesamten Zelle ändert. So ist es denkbar, dass ein Protein etwa stärker an HRAS^{Gly13Arg} bindet, aber die Konzentration dieses Proteins in der Zelle insgesamt unverändert bleibt. Zugleich hat HRAS als *Signaling*-Protein Einfluss auf Proteine in der gesamten Zelle, und durch den Austausch z.B. von Glycin-13 zu Arginin können sich dadurch auch die Abundanzen einzelner Proteine ändern, die nicht direkt mit HRAS interagieren. Um diesen Aspekt abzudecken, wurde die (Gesamtzell-)Proteomanalyse durchgeführt, in der die Zellen als Ganzes lysiert wurden und alle Proteine unvoreingenommen analysiert wurden.

Bei der Phosphoproteomanalyse wurde wiederum ein neuer Aspekt abgedeckt, da Phosphorylierungen (und andere Proteoformen) bei der Proteom- und Interaktomanalyse außer Acht gelassen wurden. Zur Analyse wurden gezielt Phosphopeptide mit TiO₂-Beads aus den Zelllysaten angereichert und separat von unmodifizierten Peptiden (bzw. Proteinen) ausgewertet. Dieser Datensatz zeigt also nur Änderungen der Abundanzen einzelner Phosphopeptide, die nicht unbedingt mit Änderungen der Proteinabundanz korrelieren. Das kann etwa die Diskrepanz bei dem zuvor genannten Protein RBM26 erklären, welches im Interaktom und im Proteom einen positiven *Fold Change* aufwies aber im Phosphoproteom aber einen negativen *Fold Change* (siehe Tabelle A2 im Anhang). Phosphoproteomik bringt also insbesondere bei Signalkaskaden, deren Aktivierung über Phosphorylierungen stattfindet, einen weiteren Erkenntnisgewinn.

Während sich Interaktom-, Proteom-, und Phosphoproteomanalyse also gegenseitig ergänzen, ist es wichtig, für die Interpretation der Ergebnisse die Kausalität zwischen den -Omen zu berücksichtigen. Als erstes sollte immer das Interaktom betrachtet werden, da sich etwa die Substitution von Glycin-13 durch Arginin in erster Linie auf die direkten Interaktionspartner von HRAS auswirkt. Ändern sich die Interaktionen mit HRAS, nimmt das Einfluss auf diverse Signalwege, die schließlich die gesamte Zellbiologie beeinflussen. Die Folgen von Änderungen dieser Signalwege spiegelt sich anschließend in den Gesamtzell-Proteom- und Phosphoproteomanalysen wider.

6.1 Die Auswirkungen von HRAS^{Gly13Arg} auf humane Keratinozyten

Aus den Interaktom-Daten konnte zunächst geschlossen werden, dass HRAS^{Gly13Arg} mit vielen Proteinen deutlich stärker interagierte als HRAS^{WT} – allein unter den FDR-signifikanten Proteinen waren 489 Proteine höher abundant in HRAS^{Gly13Arg}- und nur 4 in HRAS^{WT}-Keratinozyten (siehe Abbildung 11). Die Affinität von HRAS zu anderen Proteinen wurde durch den Austausch von Glycin-13 zu Arginin also deutlich erhöht. Die Signalweganalyse des Interaktoms zeigte, dass auffallend viele Proteine mit Bezug zu Protein-, RNA- und generell Metabolismus signifikant höher abundant in HRAS^{Gly13Arg}-Keratinozyten vorlagen (siehe Abbildung 12). Das ist besonders auf ribosomale Proteine zurückzuführen, wobei aktuell keine direkten Interaktionen zwischen HRAS und ribosomalen Proteinen bekannt sind. Eine Möglichkeit wären sekundäre Wechselwirkungen. Es ist aber auch diskutabel, dass es sich dabei um Artefakte handelt, da bei Ko-IPs die Lokalität der Proteine nicht berücksichtigt wird. Es kann also sein, dass sich Wechselwirkungen mit bestimmten Proteinen zeigen, welche in physiologischen Zellen nicht miteinander interagieren, da sie in unterschiedlichen Teilen der Zelle lokalisiert sind. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch der Signalweg mit der stärksten Inhibition, der Coronavirus Pathogenesis Pathway, dessen Inhibition laut dem Signalweganalyse-Programm IPA ebenfalls auf die Aktivierung ribosomaler Proteine zurückzuführen ist. Hier könnte es sich also um ein Artefakt der Signalweganalyse handeln.

Neben ribosomalen Proteinen sind insbesondere einige bekannte RAS-Effektoren erwähnenswert, welche höhere Abundanzen im Interaktom von HRAS^{Giy13Arg} aufwiesen: RIN1, RAB5C, MLLT4, PIK3R1, RAF1, ARAF, und NF1 (siehe Abbildung 11).

Am stärksten war RIN1 in seiner Abundanz erhöht. *HRAS-RIN1-Signaling* kann zur RAB5-mediierter Endozytose oder auch zum Umbau des Zytoskeletts über die Aktivierung der ABL-Tyrosinkinase führen. ^[21–23] An dieser Stelle ist es erwähnenswert, dass auch RAB5C eine signifikant erhöhte Abundanz aufwies, was ein weiteres Indiz für verstärkte HRAS-RIN1-RAB5-mediierte Endozytose ist. Es folgte der Effektor MLLT4 (auch AFDN), welcher eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung von *Adherens Junctions*, Zell-Zell-Kontakten und der Zellpolarität spielt.^[18,19] Ein weiterer Effektor mit erhöhter Interaktion zu HRAS^{Gly13Arg} war PIK3R1, eine regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase, welche über AKT eine Vielzahl an Funktionen steuert, darunter etwa Zellwachstum, Eintritt in den Zellzyklus und das Überleben der Zelle. Über das Protein RAC wird aber auch die Reorganisation des Zytoskeletts gesteuert.^[14]

Die Effektoren PI3K, RIN1, und MLLT4 regulieren also Signalwege, welche, verallgemeinert gesagt, Einfluss auf die zelluläre Architektur, Zell-Zell-Kontakte sowie die Endozytose nehmen können. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass im Interaktom auch MYH10, ein Protein, dass auch eine Rolle bei der Reorganisation des Zytoskeletts spielt, und UACA, welches als Teil des RHO-GTPase-Zyklus auch indirekt Einfluss auf das Zytoskelett haben könnte, beide sehr hohe *Fold Changes* aufwiesen (siehe Abbildung 11).^[63,65,66]

In der Proteomanalyse fanden sich weitere Indizien, dass die Expression von HRAS^{Giy13Arg} Änderungen der zellulären Architektur bewirkt. So hatten einige mit dem Zytoskelett assoziierte Proteine im Proteom mitunter die höchsten Auslenkungen Richtung HRAS^{Giy13Arg}: PLIM4, DPYSL3, und FLG (siehe Abbildung 13). PDLIM4 spielt direkt eine Rolle bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und ist, sowie DPYSL3, Teil des Aktinfilaments; FLG ist hingegen mit dem Intermediärfilament assoziiert.^[78–80] Auch in der Signalweganalyse des Proteoms gab es einige weitere Indikatoren dafür, dass es zu einem Umbau des Zytoskeletts kam (siehe Abbildung 14). So waren RHO-GTPasen aktiviert, bzw. *RHOGDI Signaling* inhibiert, ein Prozess, welcher RHO-GTPasen deaktiviert. Über RHO-GTPasen wird auch das Aktin-Zytoskelett reguliert, weshalb die Aktivierung der Signalwege *Actin Cytoskeleton Signaling* und *Integrin Signaling* naheliegt (siehe Abbildung 14).^[69] Hinweise auf verstärkte Endozytose (und damit verstärktes HRAS-RIN1-Signaling im Speziellen) boten vier aktivierte Signalwege, die zum Vesikel-mediierten Transport gehören, darunter zum Beispiel *Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the Plasma Membrane* (siehe Abbildung 14 bzw. Abbildung A2).

Neben PI3K, RIN1 und MLLT4 wies auch der Effektor RAF1 eine signifikant stärkere Interaktion mit HRAS^{GIy13Arg} auf. *RAS-RAF-MAPK-Signaling* führt in Abwesenheit von onkogenen Mutationen etwa zu Proliferation, reguliert aber auch das Überleben/Apoptose und den Zellzyklus.^[11] Zudem liegt der Signalweg in rund einem Drittel aller humanen Krebsarten fehlerhaft aktiviert vor.^[9,10] ARAF, ebenfalls ein Protein mit hohem *Fold Change* im Interaktom, ist mit RAF1 verwandt, hat aber eine geringere Kinaseaktivität.^[71] Passend zu *HRAS-RAF-MAPK-Signaling* lagen im Phosphoproteom einige apoptotische Signalwege aktiviert vor, darunter *Death Receptor Signaling*, welcher über die Bindung bestimmter Todesliganden initiiert werden kann (siehe Abbildung 16).^[116]

Auch Transkription wird über *HRAS-RAF-MAPK-Signaling* gesteuert.^[11] Die Interaktion zwischen HRAS und RAF1 war mit HRAS^{Gly13Arg} stärker als mit HRAS^{WT}, und erwartungsgemäß sollte sich das auf verstärkte Transkription auswirken. In der Signalweganalyse der Phosphoproteomanalyse waren aber besonders Entitäten unter den Kategorien RNA-Metabolismus und Genexpression (Transkription) inhibiert – darunter etwa *Processing of Capped Intron-Containing pre-mRNA, RNA-Polymerase II Transciption*, und *Histone Modification Signaling Pathway* (siehe Abbildung 16).

Zudem wiesen Phosphopeptide etwa aus ACIN1, SART1, und HNRHPA3, welche mit RNA-Bindung und dem Spliceosom assoziiert sind, signifikant abgesenkte Abundanzen in HRAS^{Gly13Arg} auf (siehe Abbildung 15).^[107–110] Auch im Proteom waren Signalwege, welche für den Schutz und die Reparatur der DNA zuständig sind, besonders stark inhibiert, darunter *Telomere Maintenance, Cohesion Chromatin Regulation Pathway*, und *Sirtuin Signaling Pathway* (siehe Abbildung 14). Trotz verstärkter Interaktion zwischen HRAS^{Gly13Arg} und RAF1 scheinen also weitere Faktoren die Genexpression zu beeinträchtigen.^[205] Allgemein scheint es, als gäbe es in HRAS^{Gly13Arg}-Keratinozyten Probleme bei der zellulären Genomstabilität und der Genregulation.

Auch unabhängig von HRAS-Effektor-Signalwegen konnten interessante Aspekte festgestellt werden, wie etwa die Aktivierung von Signalwegen mit Bezug zum Immunsystem im Proteom, darunter vor allem *Neutrophil Degranulation* (siehe Abbildung 12). Immunreaktionen in HRAS-Varianten-exprimierenden Keratinozyten sind bereits bekannt. So wurde etwa in HRAS^{Gly12Ser}-Mäusen nach Stimulation erhöhte Zytokin-Produktion festgestellt.^[206] Womöglich löst HRAS^{Gly13Arg} also eine ähnliche Reaktion aus.

Das Gleichgewicht der Homöostase schien sich durch die Expression von HRAS^{Gly13Arg} ebenfalls zu verändern. Es gab Hinweise, dass HRAS^{Gly13Arg}-Keratinozyten vermehrt in der Epidermis proliferieren, anstatt sich auszudifferenzieren und die kutane Barriere auszubilden. So lag ITGA6, bei dem es sich um einen Marker für proliferierende Zellen in der Epidermis handelt, höher abundant in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen vor. ITGA6 ist für die Mediation der Adhäsion zwischen basalen Keratinozyten und der Basalmembran verantwortlich. Im Gegenzug dazu war IVL, ein Marker für die Differenzierung von Keratinozyten, im Proteom signifikant niedriger abundant in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen.^[207] Im direkten Widerspruch zu ITGA6 und IVL steht allerdings, dass in der Signalweganalyse des Phosphoproteoms die *Keratinization*, also die Ausdifferenzierung von Keratinozyten in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen aktiviert vorlag.^[205]

Mittels *OmixLitMiner* konnten im Interaktom, im Proteom, und im Phosphoproteom einige Proteine identifiziert werden, die mit dem HRAS^{Giy13Arg}-assoziierten Phänotypen Nävus Sebaceus und ähnlichen Konditionen in Verbindung stehen. Am interessantesten war hierbei das Protein PHLDA1, ein Markerprotein für Trichoblastome (inklusive Nävus Sebaceus). Auch in der vorliegenden Proteomanalyse war PHLDA1 in den HRAS^{Giy13Arg}-Zellen höher abundant (siehe Abbildung 13).^[82] Das kann als Merkmal dafür dienen, dass die HaCaT-Zellkultur, welche für diese Arbeit verwendet wurde, den klinischen Phänotypen akkurat widerspiegelte. Kein klares Bild ergab sich jedoch bei verwandten Nävus-Varianten. Es wurden zwar Proteine identifiziert, die mit diversen Nävus-Varianten in Zusammenhang stehen, ein klares Muster hinsichtlich der Veränderung der Proteinabundanzen ergab sich jedoch nicht. So war das mit Nävus Comedonicus in Verbindung stehende FLG zwar höher

abundant in HRAS^{Gly13Arg}-Keratinozyten, mit anderen Nävi assoziierte Proteine waren allerdings höher abundant in WT-Zellen, wie KRT4, PTEN, und CTSD (siehe Abbildung 13).^[81,86–88] Das spricht dafür, dass in verschiedenen Nävi unterschiedliche proteomische Muster auftreten und man einzelne Marker nicht von einem Nävus auf andere übertragen kann.

Bemerkenswert war im Interaktom auch die stark absenkte Abundanz von KRAS (*Fold Change* = -8,41), einem eng mit HRAS verwandten RAS-Protein (siehe Abbildung 11). Die beiden Proteine sind bioäquivalent – HRAS kann KRAS etwa in vielen biologischen Funktionen ersetzen.^[208] Zudem ist bereits bekannt, dass postzygotische KRAS-Mutationen Nävus Sebaceus auslösen. In einer Studie lagen bei insgesamt 65 Sebaceus Nävi zu 95% Mutationen am HRAS-Gen und zu 5% am KRAS-Gen vor. Dabei wurde auch festgestellt, dass in einigen Patienten mehrfache Mutationen vorhanden waren.^[28] Dass auch KRAS in dieser Zelllinie eine Punktmutation aufwies, ist unwahrscheinlich, da gezielt HRAS^{Gly13Arg}-exprimierende Zellen verwendet wurden, die keine weiteren Mutationen aufweisen sollten. Die direkte Wechselwirkung zwischen KRAS und HRAS ist wenig erforscht. Eine Erklärung für die abgesenkte Abundanz könnte aber ein Verdrängungseffekt zu sein, bei dem das konstitutiv aktivierte HRAS stärker an gemeinsame RAS-Effektoren bindet, im Gegensatz zu KRAS, welches vermutlich nicht in seiner aktivierten Form vorlag.

Insgesamt zeigte sich, dass HRAS^{Gly13Arg} starke Änderungen im Interaktom hervorrief, welche sich im Proteom und im Phosphoproteom widerspiegelten. Über die stärkere Interaktion von einigen HRAS-Effektoren wurden etwa der Vesikel-mediierte Transport und die Umstrukturierung des Zytoskeletts aktiviert. Zudem konnte eine gesteigerte Immunreaktion festgestellt werden. Transkription und Genexpression schienen trotz verstärkter HRAS-RAF-Interaktion gestört zu sein, und es gibt Hinweise auf verstärkte Apoptose. Es gibt Hinweise auf verstärkte Proliferation anhand der Marker ITGA6 und IVL im Proteom, was sich in der Phosphoproteomanalyse allerdings nicht bestätigen ließ.

6.2 Die Auswirkungen von HRAS^{Gly12Ser} auf humane Keratinozyten

Wie auch bei HRAS^{Gly13Arg}-Zellen zeigte sich im Allgemeinen, dass HRAS^{Gly12Ser}-exprimierende Keratinozyten im Vergleich zu WT-Zellen im Interaktom, Proteom, und im Phosphoproteom signifikante Unterschiede aufwiesen (siehe Abbildung 17). Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass im Proteom kein Protein FDR-Signifikanz aufwies, und im Interaktom lediglich zwei. Im Phosphoproteom waren hingegen 251 Peptide FDR-signifikant (siehe Abbildungen 18, 20 und 22). Das deutet darauf hin, dass veränderte Interaktionen von HRAS^{Gly12Ser} mit Effektoren starken Einfluss auf die Aktivierung bzw. Deaktivierung von Signalkaskaden nimmt, auch wenn die meisten Änderungen im Interaktom lediglich p-Wert-signifikant waren.

Im Interaktom war besonders die Interaktion zwischen HRAS^{Gly12Ser} und RAP1B stark erhöht (*Fold Change* = 8.31, siehe Abbildung 18). RAP-Proteine sind kleine GTPasen aus der RAS-Familie, wie auch HRAS. Die beiden Proteine haben eine hohe Sequenzhomologie, weshalb sie sich auch viele Bindungspartner bzw. Effektoren teilen.^[121] RAP1-Proteine interagieren mit Effektoren, welche die Integrin-mediierte Zell-ECM-Adhäsion, Zell-Zell-Kontakte, und die Zellpolarisierung steuern.^[209] Zu direkten Interaktionen zwischen HRAS und RAP1B ist wenig bekannt. Es ist daher unklar, wieso RAP1B eine derart stark erhöhte Abundanz in HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden Keratinozyten aufweist.

Unter den Proteinen mit signifikant reduzierten Abundanzen im Interaktom war KRAS das Bedeutendste, wie auch in HRAS^{Gly13Arg}_Keratinozyten (*Fold Change* = -8,58, siehe Abbildung 18). Keimzellmutationen von KRAS-Varianten sind im Zusammenhang mit dem Costello-Syndrom bekannt, wie mit dem *OmixLitMiner* ermittelt wurde.^[125] Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass KRAS in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen mutiert vorlag. Es scheint wahrscheinlicher, dass ein ähnlicher Effekt eintritt, wie in HRAS^{Gly13Arg}_Keratinozyten; nämlich, dass die konstitutiv aktivierte HRAS-Variante KRAS von gemeinsamen RAS-Effektoren verdrängt. Es kann allerdings nur spekuliert werden, warum drei ähnliche Proteine – KRAS, HRAS, und RAP1B – sich in der Interaktomanalyse derart unterschiedlich verhalten. Aufgrund der hohen Sequenzhomologien ist es denkbar, dass neben HRAS (und seinen Interaktionspartnern) auch Proteine mit ähnlichen Bindungsstellen präzipitiert wurden. Eventuell begünstigen HRAS^{WT} bzw. HRAS^{Gly12Ser} die Ko-Präzipitationen von KRAS bzw. von RAP1B, ohne dass in der Zelle tatsächlich physiologische Wechselwirkungen vorliegen.

Neben RAP1B wiesen zahlreiche bekannte HRAS-Effektoren eine stärkere Interaktion mit HRAS^{Gly12Ser} als mit HRAS^{WT} auf (siehe Abbildung 18). Einige davon, RIN1, RAB5C, MLLT4, RAF1, ARAF, und NF1 interagierten auch stärker mit HRAS^{Gly13Arg} und wurden in diesem Zusammenhang schon besprochen. Ein HRAS-Effektor, welcher lediglich mit HRAS^{Gly12Ser} veränderte Interaktion aufwies, war RGL2. Das Protein nimmt über RAL-GEF-Proteine Einfluss auf vesikulären Transport und spielt auch in vielen Krebsarten eine Rolle. Im Kontrast zu anderen Effektoren war die Interaktion von HRAS^{Gly12Ser} zu RGL2 abgeschwächt, was angesichts der konstitutiven Aktivierung von HRAS^{Gly12Ser} interessant ist.^[16,17]

Wie auch in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen zeigte RIN1 also eine signifikant erhöhte Abundanz in HRAS^{Gly12Ser} im Interaktom (siehe Abbildung 18). Im Gegenzug zum Interaktom war RIN1 aber im Proteom signifikant niedriger abundant in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen (siehe Abbildung 20). Das ist kein Widerspruch, denn auch wenn insgesamt weniger RIN1 in HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden Zellen vorlag, kann die Interaktion mit HRAS^{Gly12Ser} trotzdem stärker sein. Für die Aktivierung von *HRAS-RIN1-Signaling* ist die direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen entscheidend, nicht unbedingt die Abundanz in der gesamten Zelle. Im Phosphoproteom war RIN1 an den Stellen S333 und S337 in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen signifikant höher phosphoryliert als im WT, was ein weiteres Indiz für verstärktes *HRAS-RIN1-Signaling* sein könnte, auch wenn über die spezifischen identifizierten Phosphorylierungsstellen wenig bekannt ist (siehe Abbildung 22).

Die verstärkte Interaktion von RIN1 (bzw. RAB5C) mit HRAS^{Gly12Ser} in Keratinozyten wurde bereits in einer Studie von *Nauth et al.* festgestellt. In der Studie wurde auf einen Zusammenhang zwischen *HRAS-RIN1-Signaling* und der Beeinträchtigung des *Integrin-Trafficking* geschlossen, und in weiterer Folge, dass *HRAS-RIN1-Signaling* die Zelladhäsion beeinflusst.^[210] Das scheint die vorliegende Phosphoproteomanalyse zu belegen: Unter den Signalwegen mit starker Inhibition befanden sich *RHO GTPase Cycle* und *Actin Cytoskeleton Signaling* (siehe Abbildung 23). Beide Prozesse sind eng miteinander sowie mit dem *Integrin-Signaling* verbunden und beeinflussen die Zellform, -motilität und -adhäsion.^[76,161] Im Proteom könnte die starke Auslenkung des Aktin-bindende Protein LCP1 Richtung HRAS^{Gly12Ser}-exprimierende Zellen ebenfalls durch *HRAS-RIN1-Signaling* ausgelöst worden sein (siehe Abbildung 20).^[134,135]

Neben RIN1 zeigte auch der Effektor RAF1 eine verstärkte Interaktion mit HRAS^{Gly12Ser} (siehe Abbildung 18). *RAS-RAF-MAPK-Signaling* führt in Abwesenheit von onkogenen Mutationen etwa zu Proliferation, reguliert aber auch das Überleben/Apoptose und den Zellzyklus.^[11] Im Proteom und im Phosphoproteom fanden sich weitere Indizien für *RAS-RAF-MAPK-Signaling*, besonders im Zusammenhang mit verstärkter Apoptose. So könnte die höhere Abundanz der Proteine NDRG1 und BIRC7 in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen, welche in die Regulierung der Apoptose involviert sind, auf

RAS-RAF-MAPK-Signaling zurückzuführen sein (siehe Abbildung 20).^[137–140] Im Phosphoproteom zeigte sich zudem, dass einige der am stärksten aktivierten Signalwege mit der Apoptose zusammenhängen, etwa *Apoptotic Execution Phase* und *p53 Signaling* (siehe Abbildung 23).^[158,159] Ein weiteres Indiz für aktiviertes *RAS-RAF-MAPK-Signaling* im Allgemeinen war in der Signalweganalyse des Proteoms zu finden. Hier war verstärktes TR/RXR-Aktivierung zu erkennen, welche das Zellwachstum über den RAF-MAPK-Signalweg steuert (siehe Abbildung 21).^[146,147]

RAS-RAF-MAPK-Signaling wirkt sich oft auch auf verstärkte Transkription aus.^[11] Im Phosphoproteom fanden sich aber Hinweise, die das Gegenteil nahelegten. Hier war die RNA-Transkription stark reduziert, was sich in den Entitäten *Processing of capped intron-containing pre-mRNA* und *Histone Modification Signaling Pathway* zu widerspiegelte (siehe Abbildung 23).^[118] In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass auch etwa Phosphopeptide von SET und ACIN1 höher abundant in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen vorlagen, welche Transkription bzw. RNA-Prozessierung reduzieren (siehe Abbildung 22).^[149,106] In HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden Zellen könnte also, wie auch in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen, die Genexpression trotz verstärktem *HRAS-RAF-MAPK-Signallings* beeinträchtigt sein.

Auch das Gleichgewicht der epidermalen Homöostase scheint durch HRAS^{Gly12Ser} beeinflusst zu werden, wie die Inhibition der *Keratinization* im Proteom nahelegt (siehe Abbildung 21). Bei der Keratinisierung bewegen sich Keratinozyten von der basalen Schicht der Epidermis zu weiter oben liegenden Hautschichten, wo sie sich differenzieren und Keratin bilden, welche die äußere, schützende Schicht der Haut abbildet.^[115] Die eingeschränkte Keratinisierung könnte bedeuten, dass HRAS^{Gly12Ser}-exprimierende Keratinozyten stärker proliferieren und sich weniger stark differenzieren als WT-Zellen.

Ein weiterer Punkt waren Änderungen im Metabolismus im Zusammenhang mit HRAS^{Gly12Ser}, welche bereits in früheren Studien festgestellt wurden. Das bestätigte sich in dieser Studie angesichts der Aktivierung des Glucose-Metabolismus im Proteom (siehe Abbildung 21).^[211]

Aus vorliegenden plausibel, HRAS-RIN1-Signaling den Daten scheint es dass in HRAS^{Gly12Ser}-exprimierenden Keratinozyten eine entscheidende Rolle spielt. Frühere Erkenntnisse zu diesem Signalweg in HRAS^{Gly12Ser}-Zellen und ein Zusammenhang mit verminderten Integrin-Trafficking scheinen sich zu bestätigen. Zudem gibt es Hinweise, dass verstärktes HRAS-RAF-MAPK-Signaling eine Rolle spielt und sich etwa auf apoptotische Prozesse auswirkt. Auch die Genexpression scheint beeinträchtigt zu sein. Die Proteomdaten legen zudem nahe, dass HRAS^{Gly12Ser}-Keratinozyten verstärkt proliferieren.

6.3 Die Auswirkungen von HRAS^{Gly12Val} auf humane Keratinozyten

Auch in HRAS^{Gly12Val}-exprimierenden Keratinozyten lagen im Vergleich zu WT-Zellen im Interaktom, Proteom, und Phosphoproteom signifikante Veränderungen vor (siehe Abbildung 24). Die stärksten Veränderungen lagen im Phosphoproteom vor, wo insgesamt 120 Phosphopeptide FDR-Signifikanz aufwiesen (siehe Abbildung 29).

Im Interaktom wiesen mehr Proteine signifikant höhere Abundanzen als umgekehrt, was bedeuten könnte, dass HRAS^{Gly12Val} stärker mit Interaktionspartnern wechselwirkt (bzw. mehr Interaktionspartner hat) als HRAS^{WT}. Bei genauerer Betrachtung des Interaktoms wurde deutlich, dass besonders einige bekannte Interaktionspartner von HRAS eine höhere Affinität zu HRAS^{Gly12Val} aufwiesen als zu HRAS^{WT}: RIN1, RAB5C, MLLT4, RAF1, ARAF, und NF1 (siehe Abbildung 25). Alle Effektoren wiesen auch eine stärkere Interaktion mit den anderen beiden Varianten auf, und wurden bereits ausführlich diskutiert.

KRAS wies im Interaktom eine sehr stark reduzierte Interaktion mit HRAS^{Gly12Val} (Fold Change = -10.00) auf, wie auch zu den anderen beiden HRAS-Varianten. KRAS ist eines der am häufigsten von Mutationen betroffenen Onkogene im Menschen und könnte daher auch im Zusammenhang mit der karzinogenen Variante HRAS^{Gly12Val} eine Rolle spielen.^[8] Es könnte sich bei der stark abgesenkten Abundanz aber auch um einen Verdrängungseffekt bei der Ko-IP handeln, welcher bereits im Rahmen der Interaktomanalysen der anderen beiden Varianten diskutiert worden war. Im Gegenzug zur reduzierten Abundanz im Interaktom fand sich KRAS in der Proteomanalyse unter den Proteinen mit signifikant erhöhten Abundanzen in HRAS^{Gly12Val}-Zellen wieder (siehe Abbildung 27). Möglicherweise spielt KRAS also eine Rolle in der Onkogenese HRAS^{Gly12Val}-exprimierender Zellen, ohne mit HRAS^{Gly12Val} zu interagieren. Mit TYMP, NDRG1, und LGALS1 fanden sich im Proteom unter den Proteinen mit den höchsten Abundanzen in HRAS^{Gly12Val} weitere Proteine, welche eine Rolle in Kopf-Hals-Krebs spielen (siehe Abbildung 27).^[177,181,182] Zudem konnte im Phosphoproteom mit TP53 S315, C16orf72 S167 und TOP2A S1377 drei Karzinogenese-induzierende Phosphorylierungsstellen als signifikant höher abundant in HRAS^{Gly12Val} identifiziert werden (siehe Abbildung 29).^[195,197,198] Neben den vielen Krebsmarkern, welche in den HRAS^{Gly12Val}-Zellen höher abundant waren, muss allerdings auch erwähnt werden, dass mit NBN und RRAS2 zwei Krebsmarker im Proteom niedriger abundant in HRAS^{Gly12Val} waren – Das Bild ist also nicht vollkommen eindeutig (siehe Abbildung 27).^[186,187]

Neben zahlreichen Krebsmarkerproteinen spielt im Zusammenhang mit der onkogenen Variante HRAS^{Gly12Val} auch die verstärkte HRAS-RAF1-Interaktion eine Rolle, welche im Interaktom beobachtet wurde (siehe Abbildung 24). Immerhin liegt der RAF-MAPK-Signalweg in einem Drittel aller humanen Krebsarten fehlerhaft aktiviert vor, während er in Abwesenheit onkogener Mutationen etwa Proliferation, aber auch das Überleben und den Zellzyklus steuert.^[9-11] Es gibt neben der verstärkten Protein-Protein-Interaktion zwischen HRAS^{Gly12Val} und RAF1 einige weitere Indizien für die Aktivierung des Signalwegs, etwa im Proteom. Hier war das Protein NDRG1 signifikant höher abundant in HRAS^{Gly12Val}-Zellen. Es spielt bei Zellwachstum, Differenzierung, und Apoptose eine Rolle, und könnte somit im Zusammenhang mit erhöhtem HRAS-RAF-MAPK-Signaling stehen (siehe Abbildung 27).^{[137-} ^{139]} Aus der Signalweganalyse des Proteoms könnte in diesem Kontext auch der MET-Signalweg von Bedeutung sein, da er aktiviert vorlag und Überfunktionen häufig mit Krebs in Verbindung stehen (siehe Abbildung 28). MET ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, welche in weiterer Folge unter anderem auch RAS-RAF-MAPK-Signaling aktivieren kann.^[188] Die Aktivierung des MET-Signalwegs ist also wohl ein direkter Ausdruck von verstärktem Signaling über die konstitutiv aktivierte HRAS-Variante. Dass andere Signalwege, die mit Krebs assoziiert waren, inhibiert waren, wirkt allerdings widersprüchlich. So war etwa der SPINK1-Krebssignalweg inhibiert, welcher in vielen menschlichen Krebsarten eine Rolle spielt und mit schlechter Prognose in Verbindung steht.^[190] Allerdings unterscheiden sich Krebsarten voneinander und es ist möglich, dass in HRAS^{Gly12Val}-Zellen eben besonders der MET-Signalweg von Bedeutung ist (bzw. HRAS-RAF-MAPK-Signaling), im Gegensatz zu anderen Signalwegen.

HRAS-RAF-MAPK-Signaling reguliert auch die Transkription und im Phosphoproteom fanden sich einige Indizien, dass das auch in HRAS^{Giy12VaI}-exprimierenden Zellen eine Rolle spielt.^[11] So wiesen etwa die Phosphopeptide SET S7 und C16orf72 S167 besonders hohe Auslenkungen Richtung HRAS^{Giy12Ser}-Zellen auf (siehe Abbildung 29). Beide interagieren mit der DNA bzw. mit Histonen und sind somit in die Transkription involviert.^[149,194] In der Signalweganalyse des Phosphoproteoms zeigte sich dagegen, dass besonders Signalwege, welche mit dem RNA-Metabolismus sowie der Histon-Modifizierung in Verbindung standen, inhibiert waren (siehe Abbildung 30). Auch die Phosphopeptide der Proteine ZNF618 und USP16, welche in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, wiesen signifikant abgesenkte Abundanzen in HRAS^{Giy12VaI} auf (siehe Abbildung 29).^[200,201] Das Bild ist also nicht eindeutig, aber es liegt daher nahe, dass wie auch in den anderen beiden Varianten-exprimierenden Zellarten die Genexpression und Transkription insgesamt eher inhibiert vorlagen.

Neben RAF1 war auch RIN1 als Effektorprotein mit signifikant höherer Abundanz zu HRAS^{Gly12Val} im Interaktom beobachtet worden (siehe Abbildung 25). Wie erwähnt fördert *HRAS-RIN1-Signaling* die Aktivierung von RAB5-GTPasen und ABL-abhängigen Tyrosinkinasen, was respektive zu verstärkter Endozytose oder zu einem Umbau des Zytoskeletts führt.^[21,22] Dass verstärktes *HRAS-RIN1-Signaling* eine Rolle spielen könnte, spiegelte sich in der Signalweganalyse des Interaktoms wider (siehe Abbildung 26). Hier standen unter anderem viele Signalwege mit Bezug zum RHO-GTPase-Zyklus, welcher ein Hauptregulator des Aktin-Zytoskeletts ist und auf einen verstärkten Umbau desselben hindeuten könnte.^[160] In der Signalweganalyse des Proteoms hingegen waren Signalwege, welche mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen, sowohl aktiviert als auch inhibiert (siehe Abbildung 28). So waren der *RHO GTPase Cycle* und auch der *Nuclear Cytoskeleton Pathway* zwar aktiviert, *PAK Signaling* aber zum Beispiel inhibiert, obwohl auch PAKs bei der Aktin-Zytoskelett-Organisation eine Rolle spielen.^[191] Allerdings hängen RHO-GTPasen direkt mit *RAS-Signaling* zusammen, daher liegt es nahe, dass Änderungen am Aktin-Zytoskelett darüber stattfinden und nicht über PAKs.^[160] Der *RHO GTPase Cycle* war zudem auch im Phosphoproteom aktiviert, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass ein Umbau des Zytoskeletts über *HRAS-RIN1-Signaling* stattfinden könnte (siehe Abbildung 30).

Ein weiteres Effektor-Protein mit verstärkter Interaktion zu HRAS^{Gly12Val} war MLLT4 (siehe Abbildung 25). *HRAS-MLLT4-Signaling* nimmt Einfluss auf *Adherens Junctions* und in diesen Kontext passt, dass *Cell Junction Organization* in der Signalweganalyse des Interaktoms signifikant höher abundant war (siehe Abbildung 26).^[18,19] Zu verstärktem *HRAS-MLLT4-Signaling* könnten die erhöhten Abundanzen von F11R und DSG3 im Proteom passen, da diese Proteine für die Ausbildung 27).^[179] In der Signalweganalyse des Proteoms war zudem die Aktivierung von *Cell Surface Interactions at the vascular wall* beobachtet worden, welches sich auf *Adherens Junctions* und Zell-Zell-Kontakte auswirkt (siehe Abbildung 28).^[132]

Bezüglich des Gleichgewichts der Homöostase zeigte sich ein differenziertes Bild. So war etwa mit ITGA6 wiederum ein Marker für proliferierende Keratinozyten signifikant höher im Proteom von HRAS^{Gly12Val}-Zellen abundant, wie das auch schon für HRAS^{Gly13Arg}-Zellen beobachtet worden war (siehe Abbildung 27).^[207] Allerdings war *Keratinization* in der Signalweganalyse des Proteoms und des Phosphoproteoms aktiviert, was nahelegen würde, dass sich HRAS^{Gly12Val}-Zellen verstärkt differenzieren (siehe Abbildungen 28 und 30).^[115]

Insgesamt zeigte sich, dass *HRAS-RAF-MAPK-Signaling* in HRAS^{Gly12Val}-Keratinozyten vermutlich eine wichtige Rolle zukommt. Zahlreiche Krebsmarkerproteine belegen zudem die Onkogenese dieser Variante. Außerdem gibt es Indizien, die auf einen Umbau des Zytoskeletts und veränderten Zell-Zell-Kontakten hinweisen. Die epidermale Homöostase wird durch HRAS^{Gly12Val} ebenfalls beeinflusst, es ist auf Basis der vorliegenden Daten allerdings nicht eindeutig, ob HRAS^{Gly12Val} zu verstärkter Differenzierung oder Proliferation führt. Die Genexpression und Transkription scheinen, wie auch bei den anderen beiden Varianten beobachtet, mehrheitlich beeinträchtigt zu sein.

6.4 Vergleich der Varianten und Schlussfolgerung

Im Interaktom wiesen alle HRAS-Varianten im Vergleich mit HRAS^{WT} mehr als 100 differenziell abundante Proteine auf, wobei in HRAS^{Gly13Arg} mit Abstand die meisten Proteine signifikant veränderte Abundanzen aufwiesen (Abbildung 31). Mutmaßlich hängt das mit den chemischen Eigenschaften der Aminosäure Arginin zusammen, welche sich deutlicher noch als Serin und Valin von Glycin unterscheidet. Um einen zielgerichteteren Blick zu erhalten und das Risiko einzuschränken, Artefakten zu folgen, wurde allerdings ein besonderes Augenmerk auf RAS-Effektoren gelegt. Zahlreiche RAS-Effektoren sind heute bekannt, weshalb lediglich die bekanntesten herangezogen wurden. Auffällig war dabei, dass einige RAS-Effektor-Proteine – MLLT4, RAF1, ARAF, und RIN1 – in allen Varianten ähnlich starke Interaktionen aufwiesen (siehe Tabelle 2). Das mag damit zusammenhängen, dass es sich bei allen HRAS-Varianten um konstitutiv aktivierte Varianten handelt, welche mutmaßlich stärker an Effektoren binden als HRAS^{WT}. Auch die stark reduzierte Abundanz von KRAS, einem Protein mit hoher Sequenzhomologie mit HRAS, in allen Varianten sticht ins Auge.

Allerdings gab es in dieser Hinsicht auch Unterschiede: so war PIK3R1 nur in HRAS^{Gly13Arg} höher abundant und RGL2 lediglich in HRAS^{Gly12Ser} niedriger abundant. Zudem war RAP1B, ebenfalls ein mit HRAS (und KRAS) verwandtes Protein, ausschließlich in der Variante HRAS^{Gly12Ser} signifikant höher abundant. HRAS, KRAS und RAP1B weisen hohe Sequenzhomologien auf. Während aber alle Varianten gleichermaßen schwächer mit KRAS interagierten, wies lediglich HRAS^{Gly12Ser} diese verstärkte Interaktion mit RAP1B auf. Dabei könnte es sich aber auch um ein Artefakt der Ko-IP handeln, wie das bereits diskutiert worden war. Möglicherweise begünstigt etwa HRAS^{Gly12Ser} die Ko-Präzipitation von RAP1B im Besonderen, ohne dass tiefgreifende physiologische Wechselwirkungen vorliegen.

Im Proteom waren in HRAS^{Gly13Arg}-Keratinozyten im Vergleich mit WT-Zellen die meisten Proteine differenziell verändert. Entsprechend geringer waren dagegen die Änderungen in den HRAS^{Gly12Ser}- und HRAS^{Gly12Val}-Zellen (siehe Abbildung 32). Die Anzahl der differenziell veränderten Proteine im Proteom scheint also mit der Anzahl an signifikant in ihrer Abundanz veränderten Proteinen im Interaktom zusammenzuhängen. Bemerkenswerterweise war das im Phosphoproteom aber nicht der Fall, da sich alle Varianten ähnlich stark auf die Anzahl an differenziell veränderten Phosphopeptiden auswirkten. Die Venn-Diagramme zeigten zudem, dass zu einem großen Anteil in allen Varianten die gleichen Phosphopeptide reguliert waren (siehe Abbildung 33). Möglicherweise gibt es also Kompensationsmechanismen, die die Auswirkungen der HRAS-Varianten auf Phosphoproteomebene zu einem großen Teil kompensieren können.

Die Signalweganalysen offenbarten, dass in allen Varianten unterschiedliche Prozesse betroffen waren, trotzdem dass viele HRAS-Effektoren ähnlich stark mit allen Varianten interagierten (siehe Abbildung 34). So führte HRAS^{Gly13Arg} dazu, dass viele Signalwege mit Bezug zum Immunsystem sowie Entwicklung, Wachstum, und Proliferation aktiviert vorlagen, was bei den anderen Varianten nicht bzw. weniger ausgeprägt der Fall war. Alle Varianten führten hingegen zu Änderungen bei der zellulären Architektur und Dynamik, also Prozessen, die etwa die Reorganisation des Zytoskeletts oder Zell-Zell-Kontakte umfassen. Während Signalwege in diesem Zusammenhang mit HRAS^{Gly13Arg} und HRAS^{Gly12Val} aber vorwiegend aktiviert vorlagen, war für HRAS^{Gly12Ser} das Gegenteil der Fall. So konnte HRAS^{Gly12Ser} bereits in einer früheren Studie in Zusammenhang mit verstärktem HRAS-RIN1-Signaling und daraus resultierender Beeinträchtigung des Integrin-Trafficking gebracht werden.^[210] In den anderen beiden Varianten schien aber, trotz ebenfalls erhöhter RIN1-Abundanz im Interaktom, das Gegenteil der Fall zu sein. Im Zusammenhang mit HRAS^{Gly13Arg} war bereits die Vermutung angestellt worden, dass HRAS-PI3K-Signaling zum Umbau des Zytoskeletts beiträgt. Alle Varianten scheinen HRAS-RAF-MAPK-Signaling zu begünstigen und besonders in HRAS^{Gly13Arg}- und HRAS^{Gly12Ser}-Zellen legen die Signalweganalysen in diesem Zusammenhang erhöhten Zellstress und Apoptose nahe. Insgesamt reichen verstärkte Interaktionen mit bekannten HRAS-Effektoren aber nicht aus, um auf alle beobachteten Änderungen im (Phospho-)Proteom eine zufriedenstellende Antwort zu finden. So führten etwa alle Varianten zu inhibierter Transkription und Genexpression, was scheinbar im Widerspruch zu verstärktem HRAS-RAF-MAPK-Signaling steht. Der Verdacht liegt nahe, dass es bisher unerforschte HRAS-Effektoren gibt, die ebenso Einfluss auf molekulare Mechanismen in Keratinozyten nehmen.

Die pathogenen Varianten scheinen sich unterschiedlich auf die epidermale Homöostase auszuwirken. So scheint HRAS^{Gly12Ser} zu Proliferation zu führen, während HRAS^{Gly13Val}-Zellen eher differenzieren. Besonders bei HRAS^{Gly13Arg} gibt es allerdings Widersprüche zwischen Marker-Proteinen, die auf verstärkte Proliferation von HRAS^{Gly13Arg} hinweisen (IVL und ITGA6; siehe Abbildung 12) und den Ergebnissen der Signalweganalyse (Verstärkte Keratinisierung; siehe Abbildung 15).

Insgesamt konnte belegt werden, dass sich alle Varianten trotz einiger Gemeinsamkeiten unterschiedlich auf humane Keratinozyten auswirken. Die Kombination aus Interaktomik, (Gesamtzell-)Proteomik und Phosphoproteomik ermöglichte es, Verbindungen zwischen differenziell regulierten HRAS-Effektorproteinen und daraus folgenden Auswirkungen auf die Zellbiologie herzustellen. Von vorwiegender Bedeutung in allen Varianten sind neben Änderungen der epidermalen Homöostase insbesondere Änderungen der zellulären Architektur und Dynamik sowie die Inhibition von Transkription und Genexpression.

7. Ausblick

Während in dieser Arbeit viele Einblicke in die molekularen Grundlagen der Pathologien Nävus Sebaceus (HRAS^{Gly13Arg}), CS (HRAS^{Gly12Ser}), und der onkologischen Variante HRAS^{Gly12Val} gewonnen werden konnten, können aufbauend auf den Erkenntnisgewinn noch weitere Fragestellungen formuliert werden. So konnten einige Zusammenhänge zwischen der verstärkten Interaktion von HRAS mit Effektoren wie RAF1 oder RIN1 und Änderungen im Proteom und Phosphoproteom hergestellt werden. Allerdings erfüllen HRAS-Effektoren sehr weitreichende und zum Teil auch überlappende Funktionen, weshalb orthogonale Analysen nötig sind, um die in dieser Arbeit diskutierten Zusammenhänge zu bestätigen. So könnten *Knockout*-Experimente, bei denen einzelne RAS-Effektoren ausgeschaltet werden Klarheit darüber bringen, ob z.B. die verstärkte Reorganisation des Zytoskeletts in HRAS^{Gly13Arg}-Zellen auf *RAS-RIN-Signaling* oder *RAS-PI3K-Signaling* zurückzuführen ist. Die Ergebnisse unterstreichen zudem die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zu HRAS-Effektoren, um das vollständige Wirkungsspektrum dieses Signalproteins – sowohl in der WT-Form als auch in pathogenen Varianten – auf die Zellbiologie zu erfassen.

Bis auf das Phosphoproteom wurden PTMs, beziehungsweise Proteoformen, außen vorgelassen, wobei diese in allen Phänotypen eine wichtige Rolle spielen könnten. Die Analyse von spezifischen PTMs, zum Beispiel Acetylierungen, könnte weiteren Aufschluss über die biologischen Gegebenheiten bieten. Lysin-Acetylierungen an Histon-Proteinen spielen etwa eine zentrale Rolle in der Genregulation, indem sie die Chromatinstruktur beeinflussen und die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren erhöht.^[212] Alle drei HRAS-Varianten hatten Auswirkungen auf die Genexpression und Transkription gezeigt, weshalb die Analyse von Histon-Acetylierungen hier einen weiteren Erkenntnisgewinn bringen könnte.

Ein weiterer interessanter Aspekt wäre es auch, anstelle von Zellkulturen Hautproben von Patienten zu analysieren. In den letzten Jahren wurde es etwa durch die Probenentnahme mit einem Nanosekunden-Infrarot-Laser (NIRL) ermöglicht, Gewebe hocheffizient und mit 3D-Aufösung zu entnehmen.^[213] Besonders spannend wäre es, die Epidermis Schicht für Schicht zu ablatieren und somit tiefe Einblicke in die durch die HRAS-Varianten veränderte epidermale Homöostase zu erhalten. Bei Patienten mit Nävus Sebaceus, der auf die mosaische HRAS-Variante HRAS^{Gly13Arg} zurückzuführen ist, wäre zudem eine unkomplizierte Gewinnung von Kontrollproben möglich. Aufgrund des Mosaizismus sind nicht alle Keratinozyten von der Mutation betroffen, sodass sich von derselben Person sowohl erkranktes als auch gesundes Gewebe für Vergleichsanalysen entnehmen ließe.

8. Material und Methoden

8.1 Methoden

8.1.1 Zellkultur

Die HaCaT-Keratinozyten-Zelllinie ist eine spontan immortalisierte und nicht-tumorigene Zelllinie, die typische Eigenschaften von Keratinozyten beibehält und oft für *in-vitro*-Hautmodelle verwendet wird.^[47] HaCaT-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) kultiviert, das 10 % Serum (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland) sowie Penicillin-Streptomycin (jeweils 100 U/ml und 100 mg/ml), 1,3 mM Calcium (Endkonzentration) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) enthielt, bei 37 °C und 5 % CO₂. Zur Calciumentfernung wurden HaCaT-Zellen in calciumfreiem Dermalife-Medium LL-0029 mit Zusatzstoffen kultiviert, das 0,06 mM Calcium (Endkonzentration) (Life Line Cell Technology, San Diego, USA) enthielt. Die Zellen wurden von Dr. rer. nat. Theresa Nauth kultiviert.

8.1.2 Erzeugung stabiler Zelllinien

Die codierenden Sequenzen von HA-markiertem HRASWT (GenBank-Zugangsnummer NM_005343.4) sowie der HRAS-Mutanten c.34G>A (p.G12S), c.35G>T (p.G12V) und c.37G>C (p.G13R) wurden in den pcDNA 3.2-DEST-Mammalian-Expression-Vektor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) subkloniert. HaCaT-Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem Neon-Transfektionssystem (Thermo Fisher Scientific Waltham, USA) entsprechend den Herstellerangaben transfiziert (Puls-Spannung 1.600 V; Pulsdauer 10 ms; Anzahl der Pulse: 3). Die Selektion der Zellen erfolgte gemäß den Herstellerangaben mit 500 µg/ml Geneticin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Anschließend wurden die Zellen mittels FACS (FACS Aria III; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) als Einzelzellen sortiert und einzelne Zellklone auf Expression untersucht. Nach der Selektion wurde die Geneticin-Konzentration auf 200 µg/ml reduziert. Die Erzeugung stabiler Zelllinien wurde von Dr. rer. nat. Theresa Nauth durchgeführt.

8.1.3 (Ko-)Immunpräzipitation

Die Zellen wurden gewaschen und in eiskaltem *Phosphate Buffered Saline* (PBS) abgekratzt. Zellpellets wurden für 60 Minuten auf Eis in eiskaltem Ko-Immunpräzipitationspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 120 mM NaCl, 0,5 % Nonidet P40, ergänzt mit Complete Mini Protease Inhibitoren und PhosStop (Roche, Basel, Schweiz) lysiert und durch Zentrifugation geklärt (14.000 rpm, 15 min, 4 °C). Nach Entnahme kleiner Aliquots (Gesamtzelllysate) wurden die Überstände mit 20 µl Pierce Anti-HA-Magnetbeads (#88836, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei 4 °C unter Rotation für 60 Minuten inkubiert. Die Beads wurden magnetisch von den Zelllysaten getrennt und anschließend dreimal mit Ko-IP-Puffer bei Raumtemperatur unter Rotation für 3 Minuten gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Beads mit Probenpuffer versetzt, auf 95 °C erhitzt, und die präzipitierten Proteine anschließend zur Probenaufbereitung für die Proteomik weiterverarbeitet. Die (Ko)-Immunopräzipitation wurde von Dr. rer. nat. Theresa Nauth durchgeführt.

8.1.4 Tryptischer Verdau der Proben für die Proteom- und Phosphoproteomanalysen

Alle Proben für die Proteom- und Phosphoproteomanalysen wurden zunächst in einer Pufferlösung bestehend aus 100 mM Triethylammoniumbicarbonat (TEAB) und 1% w/v Natriumdesoxycholat (SDC) gelöst. Zu allen Phosphoproteomproben wurde zudem 1% v/v Phosphatase-Inhibitor zugesetzt (HALT Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Fischer, Waltham, USA). Anschließend wurden sie bei 95 °C für fünf Minuten aufgekocht und sonifiziert. Die Proteinkonzentrationen wurden daraufhin mit einem Pierce Bicinchoninsäure Assay (BCA) Kit (Thermo Fisher, Waltham, USA) bestimmt. Die Proben für die Proteomanalysen wurden zu Proteinmengen à 20 µg aliquotiert, für die Proben für die Phosphoproteomanalysen wurden je 500 µg Protein eingesetzt. Die Phosphoproteomproben wurden noch einmal jeweils in Aliquots à 250 µg aufgeteilt, um die Handhabung in den folgenden Schritten zu erleichtern. Zunächst wurde 10 mM (finale Konzentration) Dithiothreitol (DTT) für 30 Minuten lang bei 56 °C zugesetzt, um Disulfidbrücken zu denaturieren. Anschließend wurde bei einer finalen Konzentration von 20 mM Iodoacetamid (IAA) 30 Minuten lang bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben weiter auf eine Konzentration von 70% Acetonitril (ACN) verdünnt. Carboxylatmodifizierte magnetische Beads (GE Healthcare Sera-Mag, Chicago, USA) wurden im 1:1 Verhältnis (hydrophil: hydrophob) in Methanol in einem Verhältnis von 1:1 (Beads : Protein) jeder Probe zugesetzt, um das Single-Pot, Solid-Phase Enhanced Sample Preparation (SP3) Protocol auszuführen.^[214] Dem SP3-Protokoll folgend wurden die Proben anschließend bei Raumtemperatur für 18 Minuten bei 1400 rpm geschüttelt. Dann wurden die Proben auf einem magnetischen Rack platziert

und der Überstand wurde entfernt. Alle Proben wurden zweimal mit 100% ACN und zweimal mit 70% Ethanol (EtOH) gewaschen. Danach wurden die Proben in 50 mM Ammoniumbicarbonat (AmBiCa) gelöst und Trypsin (Sequencing Grade, Promega, Madison, USA) wurde in einem Verhältnis von 1:100 (Enzym : Protein) zugegeben. Der Verdau wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt, während mit 1400 rpm geschüttelt wurde. Am nächsten Tag wurde die ACN-Konzentration auf 95% erhöht, um die tryptischen Peptide zu binden, und die Proben wurden bei 1400 rpm bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionsgefäße wurden daraufhin auf einem magnetischen Rack platziert und der Überstand wurde entfernt. Danach wurden die Proben zweimal mit 100% ACN gewaschen. Im finalen Schritt wurden die Peptide mit 2% Dimethylsulfoxid (DMSO) in 1% Ameisensäure (FA) eluiert. Das Eluat wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -20 °C gelagert.

8.1.5 In-Gel-Verdau der Proben für die Interaktomanalyse

Die Proben wurden basierend auf einem Protokoll von Shevchenko et al. im Gel verdaut.^[215] Schrumpfen und Schwellen der Gele wurde mit 100% ACN bzw. Mit 100 mM AmBiCa durchgeführt. Eine finale Konentration von 10 mM DTT (in 100 mM AmBiCa) wurden für die Denaturierung und eine finale Konzentration von 55 mM IAA (in 100 mM AmBiCa) für die Alkylierung zugesetzt. Der Proteinverdau wurde im Gel durchgeführt, indem 8 ng/µL Trypsin (Sequencing Grade, Promega, Madison, USA) in 50 mM AmBiCa über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde. Tryptische Peptide wurden am nächsten Tag mit 2% FA in 80% ACN extrahiert. Die Extrakte wurden dann in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -20 °C gelagert.

8.1.6 Phosphopeptidanreicherung

Die Phosphopeptid-Anreicherung wurde mit einem TiO₂-Phosphopeptid-Anreicherungskit (A32992, Thermo Fisher, Waltham, USA) den Angaben des Herstellers folgend durchgeführt. 500 μg Protein wurden als Inputmaterial verwendet.

8.1.7 Flüssigchromatographie (LC) aller Proben

Vor der Messung wurden alle Proben in 20 μ L 0,1% FA gelöst. Ein Zwei-Puffer-System (Puffer A: 0,1% FA in H₂O, Puffer B: 0,1% FA in ACN) wurde für die chromatographische Separierung auf einem nano-Ultra High-Performance Flüssigchromatographie-System (UHPLC, Dionex Ultimate 3000 RSLC nano, Thermo Fischer, Waltham, USA) verwendet. Eine Peptid-Vorsäule (100 μ m x 20 mm, 100 Å Porengröße, 5 μ m Partikelgröße, C18, Nano Viper, Thermo Fisher) wurde für die Online-Entsalzung und Aufreinigung verwendet, während eine 25 cm C18 reversed phase (RP) Säule (75 μ m x 250 mm, 130 Å Porengröße, 1,7 μ m Partikelgröße, Peptid BEH C18, nanoEase, Waters, Milford, USA) als analytische Trennsäule benutzt wurde. Eine 80-minütige Methode, mit linearem ACN-Gradienten von 2% bis 30% über 60 Minuten wurde für die Trennung angewandt.

8.1.8 Massenspetrometrische (MS) Messungen der Proteomproben

Für die Proteomproben wurde ein Quadrupol-Ionenfallen-Orbitrap MS (Orbitrap Fusion, Thermo Fischer, Waltham, USA) verwendet. Die eluierenden Peptide wurden mit einer nano-Elektrospray Ionisierungsquelle (nano-ESI) mit einer Spannung von 1.800 V ionisiert. Die Peptide wurden im data-dependant-acquisition- (DDA-) Modus gemessen. Für die MS1-Scans wurde die Ionen maximal 120 ms oder bis zu einer Ladungsdichte von 2x10⁵ Ionen (AGC-Target) akkumuliert. Auf Fourier-Transformation basierende Massenanalysen wurden in einem Massenbereich von m/z 400 – 1.300 und bei einer Auflösung von 120.000 bei m/z 200 durchgeführt. Die 15 Peptide mit den höchsten Signalintensitäten pro Precursor-Scan wurden mit Ladungszuständen von +2 bis +5 mit Signalintensitäten über 1.000 in einem m/z-Fenster von 1,6 im Top Speed Modus für 3 Sekunden isoliert. Anschließend wurden die Peptide mittels *Higher Energy Collisional Dissociation* (HCD) mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 30% fragmentiert. Ein Ionenfallen-Massenanalysator wurde bei einer *Rapid Scan Rate* und mit einem Massenbereich beginnend bei m/z 120 für die MS2-Scans verwendet. Es wurde für 60 ms akkumuliert, oder bis das AGC-Target von 1x10⁵ erreicht war. Peptide, welche bereits fragmentiert worden waren, wurden für 30 Sekunden von der Fragmentierung exkludiert.

8.1.9 MS-Messungen der Interaktom- und Phosphoproteomproben

Phosphoproteom-Proben Interaktomund wurden in einem Quadrupol-Orbitrap Hybrid-Massenspektrometer (QExactive, Thermo Fischer, Waltham, USA) gemessen. Eluierende Peptide wurden mit einer nano-ESI Quelle mit einer Spannung von 1.800 V ionisiert. Die Proben wurden im DDA-Modus gemessen. Die Ionenakkumulation bei jedem MS1-Scan wurde maximal für 240 ms durchgeführt, oder bis ein AGC-Target von 1x10⁶ erreicht wurde. Ein Massenbereich von m/z 400 - 1.200 wurde mit einer Auflösung von 70.000 bei m/z 200 abgedeckt. Die 15 Peptide mit den höchsten Signalintensitäten pro Precursor-Scan mit einem AGC-Target von 5x10³ mit Ladungszuständen von +2 bis +5 wurden in einem Isolationsfenster von m/z 2 isoliert. Die Fragmentierung wurde mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 25% mit HCD durchgeführt. MS2 Scans wurden in einem Massenbereich beginnend bei m/z 100 durchgeführt. Die Akkumulation dauerte für 50 ms an, oder bis ein AGC-Target von 1x10⁵ erreicht wurde. Eine Auflösung von 17.500 bei m/z 200 wurde verwendet, bereits fragmentierte Peptide wurden für 20 Sekunden exkludiert.

8.1.10 Datenprozessierung und -analyse

Die Datenbanksuche der LC-MS Rohdaten wurde in Proteome Discoverer (Proteom- und Phosphoproteomdaten: Version 3.0; Interaktomdaten: Version 3.1, Thermo Fischer, Waltham, USA) mit dem Sequest Algorithmus durchgeführt. Eine humane Swissprot Datenbank, heruntergeladen im April 2021, mit 20.365 Einträgen, wurde für die Suche verwendet. Die Carbamidomethylierung von Cysteinen wurde als fixe Modifikation angegeben, während die Oxidation von Methionin sowie die Acetylierung des Protein N-Terminus als variable Modifikationen gesetzt wurden. Bei den Phosphoproteom-Proben wurde zudem die Phosphorylierung von Serin, Threonin, und Tyrosin als variable Modifikation angegeben. Maximal zwei fehlende Schnitte von Trypsin wurden zugelassen. Nur Peptide mit einer Länge zwischen 6 und 144 Aminosäuren wurden berücksichtigt. Ein FDR-Cutoff von < 0,01 wurde für die Protein- bzw. Peptididentifizierung angewandt. Der Minora-Algorithmus wurde für die Quantifizierung verwendet.

Die Proteom-Proben wurden auf dem Peptid-Level in Proteome Discoverer normalisiert. Phosphoproteom-Proben wurden mit dem R-Package VSN (Variance Stabilizing Normalization) normalisiert^[216], während die Interaktom-Proben auf HRAS (Aminosäuren 14-189) normalisiert wurden. Phosphoproteom- und Interaktom-Proben wurden des Weiteren imputiert, und alle Proben wurden einer log2-Transformation unterzogen. Da die Interaktom- und Phosphoproteom-Proben in jeweils zwei Batches gemessen wurden, wurden diese mit dem R-Package HarmonizR integriert.^[217] Proteine bzw. Phosphopeptide, welche nach einem Student's t-Tests p-Werte < 0,05 und *Fold Changes* > 1,5 aufwiesen, wurden als signifikant in ihrer Abundanz verändert betrachtet. Für PCA-Plots wurden ANOVA-signifikante Proteine/Phosphopeptide (p-Wert < 0,05) herangezogen und die Daten auf 100% gültige Werte reduziert. Imputierungen, log2-Transformationen, ANOVA-Tests, t-Tests, sowie Post-Hoc Tukey HSD wurden in Perseus (Version 2.0.10.0) durchgeführt. *Volcano-Plots* und Venn-Diagramme wurden in RStudio (Version 4.3.0, Prosit, Boston, USA) erstellt, PCA-Plots in GraphPad Prism 8 (GraphPad, Boston, USA). Die 3D-Struktur des Proteins HRAS wurde mit AlphaFold 3.0 (Google, Mountain View, USA) dargestellt.

Das Programm Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Version 9402991, QIAGEN Bioinformatics, Venlo, The Netherlands) wurde verwendet, um Proteine und Phosphoproteine mit signifikant veränderten Abundanzen mit dem Core Analysis Tool zu analysieren. Eine *z-Score*-Algorithmus-Analyse wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Signalwege in der ersten (z > 0) oder der zweiten Gruppe (z < 0) hochreguliert waren. P-Werte wurden mittels *Fisher's Exact Test* ermittelt. Nur Signalwege mit p-Wert < 0,05 sowie einem absolutem *z-Score* > 0,1 wurden für *Bubble-Charts* und *Bubble-Volcano-Plots* herangezogen.

Um die differenzielle Regulation der Signalwegkategorien zu berechnen, wurde zunächst für jeden Signalweg ein kombinierter Score aus *z-Score**p-Wert**Ratio* erstellt. Die Summe aller Signalwege einer Kategorie entspricht dann der differenziellen Regulation.

Als *Text-Mining-Tool* wurde der *OmixLitMiner 2.0* verwendet.^[218] *PhosphoSitePlus* wurde für die Literaturrecherche in Zusammenhang mit Phosphopeptiden verwendet (Version 6.7.9, Cell Signaling Technology, Cambridge, UK).^[98] Zur Formulierung einiger Sätze wurde ChatGPT verwendet (Version GPT-4, Open AI, San Francisco, USA).

8.2 Material

8.2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialen und Geräte

Verbrauchsmaterial oder Gerät	Hersteller	Katalognummer
ThermoMixer [®] C	Eppendorf, Germany	Cat#5382000015
Probe Sonicator	N/A	N/A
SpeedVac SC110 Savant	Thermo Fisher Scientific	N/A
	(Waltham, USA)	
Dionex Ultimate 3000 RSLCnano	Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/de/
	(Waltham, USA)	de/home/industrial/chromatograph
		y/liquid-chromatography-lc/hplc-
		uhplc-systems
Reversed Phase (RP) Säule (75	Waters (Milford, USA)	Cat#186008794
μm x 250 mm, 130 Å		
Porengröße, 1,7 μm		
Partikelgröße, Peptid BEH C18,		
nanoEase)		
Acclaim PepMap 100 Vorsäule	Thermo Fisher Scientific	Cat#164946
(100 μm x 20 mm, 100 Å	(Waltham, USA)	
Porengröße, 5 µm Partikelgröße,		
C18, Nano Viper)		
Orbitrap Fusion Quadrupole	Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/de/
Orbitrap Iontrap Tribrid	(Waltham, USA)	de/home/industrial/mass-
Massenspektrometer		spectrometry/liquid-
		chromatography-mass-
		spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems
Orbitrap QExactive Quadrupole	Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/de/
Orbitrap Hybrid	(Waltham, USA))	de/home/industrial/mass-
Massenspektrometer		spectrometry/liquid-
		chromatography-mass-
		spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems

8.2.2 Chemikalien

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer
Triethylammonium Bicarbonate	Thermo Fisher Scientific	Cat#90114
(TEAB)	(Waltham, USA)	
Natrium-Desoxycholat (SDC)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	Cat#30970
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich-Merck	Cat#DTT-RO
	(Darmstadt, Deutschland)	
Iodoacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	Cat#l1149
Ameisensäure (FA)	Promega (Madison, USA)	Cat#88328
Acetonitril (ACN)	Sigma-Aldrich-Merck	Cat#27004-100ML
	(Darmstadt, Deutschland)	
Ethanol (EtOH)	Sigma-Aldrich-Merck	Cat#1.11727.1000
	(Darmstadt, Deutschland)	
Wasser (LC-MS grade)	Th. Geyer (Renningen,	Cat#455.1000
	Germany)	
Ammoniumbicarbonat (AmBiCa)	Sigma-Aldrich-Merck	Cat#A6141
	(Darmstadt, Deutschland)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich-Merck	Cat#472301-100ML
	(Darmstadt, Deutschland)	
Methanol (MeOH)	Th. Geyer (Renningen,	Cat#1428.1000
	Germany)	
Carboxylat-modifizierte	Sigma-Aldrich-Merck	Cat#GE44152105050250
magnetische Beads (Hydrophob)	(Darmstadt, Deutschland)	
Carboxylat-modifizierte	Sigma-Aldrich-Merck	Cat#GE24152105050250
magnetische Beads (Hydrophil)	(Darmstadt, Deutschland)	
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat#23227
	(Waltham, USA)	
Phosphopeptid-Anreicherungskit	Thermo Fisher Scientific	Cat#A32993
	(Waltham, USA)	
Halt Phosphatase-Inhibitor-	Thermo Fisher Scientific	Cat#78420
Einwegcocktail	(Waltham, USA)	
Trypsin	Promega (Madison, USA)	Cat#V5111

8.2.3 Software und Datenbanken

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Software und Datenbanken

Software oder Datenbank	Hersteller	Katalognummer
Perseus Version 2.0.10.0	Max Planck Institut für	https://maxquant.net
	Biochemie (Martinsried,	
	Deutschland)	
Proteome Discoverer	Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/de/de/
Version 3.0	(Bremen, Deutschland)	home/industrial/mass-spectrometry/
		liquid-chromatography-mass-
		spectrometry-lc-ms/lc-ms-
		software/multi-omics-data-
		analysis/proteome-discoverer-
		software.html
Proteome Discoverer	Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/de/de/
Version 3.1	(Bremen, Deutschland)	home/industrial/mass-spectrometry/
		liquid-chromatography-mass-
		spectrometry-lc-ms/lc-ms-
		software/multi-omics-data
		analysis/proteome-discoverer-
		software.html
R Software Umgebung 4.3	R Core Team	https://cran.r-project/
VSN (Bioconductor	Huber et al. 2002	https://bioconductor.org/packages/
Package) Version 3.74.0		release/bioc/html/vsn.html
Humane FASTA Datenbank	UniProt (EMBL, Schweiz)	https://uniprot.org/
(April 2021, 20365		
Einträge)		
Ingenuity Pathway Analysis	QIAGEN Bioinformatics	https://digitalinsights.qiagen.com/
(IPA) Version 9402991	(Venlo, Niederlande)	products-overview/discovery-
		insights-portfolio/analysis-and-
		visualization/qiagen-ipa/
PhosphoSitePlus	Cell Signaling Technology	https://www.phosphosite.org/
(Version 6.7.9)	(Cambridge, UK)	
AlphaFold	Google	https://alphafoldserver.com/
(Version 3.0)	(Mountain View, USA)	
OmixLitMiner	Gocke, Siebels et al. 2025	https://colab.research.google.com
(Version 2)		/drive/17FJ4kBt1iSBwqk5vTu
		IWvDqcB3UVCrCC?usp=sharing
ChatGPT	Open Al	https://openai.com/chatgpt/
(Version GTP-4)	(San Francisco, USA)	

9. Literaturliste

- [1] J. Cherfils, M. Zeghouf, *Physiological reviews* **2013**, *93*, 269.
- [2] D. K. Simanshu, D. V. Nissley, F. McCormick, *Cell* **2017**, *170*, 17.
- [3] S. J. Leevers, H. F. Paterson, C. J. Marshall, *Nature* **1994**, *369*, 411.
- [4] Y. Zhou, P. Prakash, H. Liang, K.-J. Cho, A. A. Gorfe, J. F. Hancock, *Cell* **2017**, *168*, 239-251.e16.
- [5] J. Colicelli, *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2004**, *2004*, RE13.
- [6] E. Castellano, E. Santos, *Genes & Cancer* **2011**, *2*, 216.
- [7] O. Soriano, M. Alcón-Pérez, M. Vicente-Manzanares, E. Castellano, Genes 2021, 12.
- [8] Cancer Treatment Reviews **2020**, *89*, 102070.
- [9] R. Roskoski, *Pharmacological research* **2017**, *117*, 20.
- [10] I. Wortzel, R. Seger, Genes & Cancer 2011, 2, 195.
- [11] P. J. Roberts, C. J. Der, Oncogene **2007**, *26*, 3291.
- [12] R. Marais, Y. Light, H. F. Paterson, C. J. Marshall, *The EMBO journal* **1995**, *14*, 3136.
- [13] a) S. G. Macdonald, C. M. Crews, L. Wu, J. Driller, R. Clark, R. L. Erikson, F. McCormick, Molecular and cellular biology 1993, 13, 6615; b) R. Seger, N. G. Ahn, J. Posada, E. S. Munar, A. M. Jensen, J. A. Cooper, M. H. Cobb, E. G. Krebs, *The Journal of biological chemistry* 1992, 267, 14373; c) R. Roskoski, *Pharmacological research* 2012, 66, 105.
- [14] L. C. Cantley, Science (New York, N.Y.) 2002, 296, 1655.
- [15] T. Urano, R. Emkey, L. A. Feig, *The EMBO journal* **1996**, *15*, 810.
- [16] S. Nakashima, K. Morinaka, S. Koyama, M. Ikeda, M. Kishida, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Kishida, A. Kikuchi, *The EMBO journal* **1999**, *18*, 3629.
- [17] I. Khan, P. S. Steeg, British journal of cancer **2021**, 124, 66.
- [18] J. K. Sawyer, N. J. Harris, K. C. Slep, U. Gaul, M. Peifer, *The Journal of cell biology* **2009**, *186*, 57.
- [19] T. Linnemann, M. Geyer, B. K. Jaitner, C. Block, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, C. Herrmann, *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, 13556.
- [20] M. Goudreault, V. Gagné, C. H. Jo, S. Singh, R. C. Killoran, A.-C. Gingras, M. J. Smith, *Nature Communications* **2022**, *13*, 4562.
- [21] G. G. Tall, M. A. Barbieri, P. D. Stahl, B. F. Horazdovsky, Developmental cell 2001, 1, 73.
- [22] H. Hu, J. M. Bliss, Y. Wang, J. Colicelli, *Current biology : CB* 2005, 15, 815.
- [23] R. Salgia, J. L. Li, D. S. Ewaniuk, W. Pear, E. Pisick, S. A. Burky, T. Ernst, M. Sattler, L. B. Chen, J. D. Griffin, *The Journal of clinical investigation* **1997**, *100*, 46.
- [24] A. Ehrhardt, G. R. A. Ehrhardt, X. Guo, J. W. Schrader, *Experimental hematology* **2002**, *30*, 1089.
- [25] a) A. D. Cox, S. W. Fesik, A. C. Kimmelman, J. Luo, C. J. Der, *Nature reviews. Drug discovery* **2014**, *13*, 828; b) K. A. Rauen, *Annual review of genomics and human genetics* **2013**, *14*, 355; c)
 D. Carli, N. Resta, G. B. Ferrero, M. Ruggieri, A. Mussa, *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* **2022**, *190*, 520.
- [26] a) Y. Aoki, T. Niihori, Y. Narumi, S. Kure, Y. Matsubara, *Human mutation* 2008, *29*, 992; b) I. Arozarena, F. Calvo, P. Crespo, *Genes & Cancer* 2011, *2*, 182; c) A. Fernández-Medarde, E. Santos, *Genes & Cancer* 2011, *2*, 344; d) A. Kotsinas, V. G. Gorgoulis, P. Zacharatos, G. Mariatos, S. Kokotas, T. Liloglou, J. Ikonomopoulos, V. Zoumpourlis, A. Kyroudi, J. K. Field et al., *Cancer genetics and cytogenetics* 2001, *126*, 147.
- [27] K. W. Gripp, L. A. Morse, M. Axelrad, K. C. Chatfield, A. Chidekel, W. Dobyns, D. Doyle, B. Kerr,
 A. E. Lin, D. D. Schwartz et al., *American journal of medical genetics. Part A* 2019, 179, 1725.
- [28] L. Groesser, E. Herschberger, A. Ruetten, C. Ruivenkamp, E. Lopriore, M. Zutt, T. Langmann, S. Singer, L. Klingseisen, W. Schneider-Brachert et al., *Nature genetics* **2012**, *44*, 783.
- [29] C. W. Johnson, C. Mattos, *The Enzymes* **2013**, *33 Pt A*, 41.
- [30] M. I. Parker, J. E. Meyer, E. A. Golemis, R. L. Dunbrack, *Cancer research* 2022, *82*, 2485.

- [31] H.-D. Jakubke, H. Jeschkeit, *Aminosäuren, Peptide, Proteine*, Verl. Chemie, Weinheim, **1982**.
- [32] G. Barrett, *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*, Springer Netherlands, Dordrecht, **1985**.
- [33] M. Rogers, Pediatric dermatology 1992, 9, 342.
- [34] G. Schimmelpenning, Fortschr Röntgenstr **1957**, 87, 716.
- [35] "NEVUS SEBACEOUS Dermatology Conditions and Treatments", zu finden unter https://www.medwebplus.com/conditions/nevus-sebaceous/, **2025**.
- [36] a) Y. Aoki, T. Niihori, H. Kawame, K. Kurosawa, H. Ohashi, Y. Tanaka, M. Filocamo, K. Kato, Y. Suzuki, S. Kure et al., *Nature genetics* 2005, *37*, 1038; b) E. Quezada, K. W. Gripp, *Current opinion in pediatrics* 2007, *19*, 636.
- [37] H. J. Team **2020**.
- [38] J. G. Tate, S. Bamford, H. C. Jubb, Z. Sondka, D. M. Beare, N. Bindal, H. Boutselakis, C. G. Cole, C. Creatore, E. Dawson et al., *Nucleic acids research* 2019, *47*, D941-D947.
- [39] E. Taparowsky, Y. Suard, O. Fasano, K. Shimizu, M. Goldfarb, M. Wigler, Nature 1982, 300, 762.
- [40] Y. Pylayeva-Gupta, E. Grabocka, D. Bar-Sagi, Nature reviews. Cancer 2011, 11, 761.
- [41] Hautarzt Berlin Praxisklinik Dr. Hasert, "Plattenepithelkarzinom | Hautarzt Dr. Hasert Berlin-Mitte", zu finden unter https://www.hasert-haut.de/leistungen/stachelzellplattenepithelkarzinom/, 2023.
- [42] C. L. Simpson, D. M. Patel, K. J. Green, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2011**, *12*, 565.
- [43] "1.1 Aufbau und Funktion der Haut Ligamed medical Produkte GmbH", zu finden unter https://www.ligasano.com/de/dr-gucks-kompendium/details/aufbau-und-funktion-der-haut, 2025.
- [44] M. Drosten, C. G. Lechuga, M. Barbacid, Oncogene 2014, 33, 2857.
- [45] a) M. Delehedde, S. H. Cho, R. Hamm, S. Brisbay, H. N. Ananthaswamy, M. Kripke, T. J.
 McDonnell, *The Journal of investigative dermatology* **2001**, *116*, 366; b) M. B. Vaughan, R. D.
 Ramirez, C. M. Andrews, W. E. Wright, J. W. Shay, *PloS one* **2009**, *4*, e7908.
- [46] a) M. Sandoval, Z. Ying, S. Beronja, *eLife* 2021, 10; b) A. Nyga, S. Ganguli, H. K. Matthews, B. Baum, *Trends in cell biology* 2023, 33, 60.
- [47] I. Colombo, E. Sangiovanni, R. Maggio, C. Mattozzi, S. Zava, Y. Corbett, M. Fumagalli, C. Carlino,
 P. A. Corsetto, D. Scaccabarozzi et al., *Mediators of inflammation* 2017, 2017, 7435621.
- [48] R. Aebersold, M. Mann, Nature 2003, 422, 198.
- [49] O. T. Schubert, H. L. Röst, B. C. Collins, G. Rosenberger, R. Aebersold, *Nature protocols* **2017**, *12*, 1289.
- [50] T. Pawson, P. Nash, *Science (New York, N.Y.)* **2003**, *300*, 445.
- [51] G. Baytek, O. Popp, P. Mertins, B. Tursun, *BioTechniques* 2022, 72, 175.
- [52] a) S. J. Humphrey, D. E. James, M. Mann, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2015, 26, 676; b) S. R. Fuhs, T. Hunter, *Current opinion in cell biology* 2017, 45, 8.
- [53] D. B. Bekker-Jensen, O. M. Bernhardt, A. Hogrebe, A. Martinez-Val, L. Verbeke, T. Gandhi, C. D. Kelstrup, L. Reiter, J. V. Olsen, *Nature Communications* 2020, 11, 787.
- [54] T. Hunter, B. M. Sefton, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1980**, *77*, 1311.
- [55] S. J. Humphrey, O. Karayel, D. E. James, M. Mann, *Nature protocols* **2018**, *13*, 1897.
- [56] J. S. Gerritsen, F. M. White, *Expert review of proteomics* **2021**, *18*, 661.
- [57] K. Schmelzle, F. M. White, *Current opinion in biotechnology* **2006**, *17*, 406.
- [58] A. Bueno, I. Morilla, D. Diez, A. A. Moya-Garcia, J. Lozano, J. A. G. Ranea, Oncotarget 2016, 7, 75810.
- [59] a) S. Tsuji, Y. Ohno, S. Nakamura, T. Yamada, Y. Noda, M. Saio, T. Iwama, M. Shimazawa, H. Hara, *Brain research* 2019, *1723*, 146396; b) K. Iqbal, F. Liu, C.-X. Gong, A. C. Del Alonso, I.

Grundke-Iqbal, *Acta neuropathologica* **2009**, *118*, 53; c) T. Niihori, Y. Aoki, H. Ohashi, K. Kurosawa, T. Kondoh, S. Ishikiriyama, H. Kawame, H. Kamasaki, T. Yamanaka, F. Takada et al., *Journal of human genetics* **2005**, *50*, 192.

- [60] a) E. W. Wilker, R. A. Grant, S. C. Artim, M. B. Yaffe, *The Journal of biological chemistry* 2005, 280, 18891; b) H. Hermeking, C. Lengauer, K. Polyak, T. C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Molecular cell* 1997, 1, 3; c) R. W. Johnstone, W. Wei, A. Greenway, J. A. Trapani, *Oncogene* 2000, 19, 6033.
- [61] a) R. W. Wong, G. Blobel, E. Coutavas, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, *103*, 19783; b) S. Cuylen, C. Blaukopf, A. Z. Politi, T. Müller-Reichert, B. Neumann, I. Poser, J. Ellenberg, A. A. Hyman, D. W. Gerlich, *Nature* 2016, *535*, 308.
- [62] a) K. Brose, K. S. Bland, K. H. Wang, D. Arnott, W. Henzel, C. S. Goodman, M. Tessier-Lavigne, T. Kidd, *Cell* **1999**, *96*, 795; b) J. Y. Wu, L. Feng, H. T. Park, N. Havlioglu, L. Wen, H. Tang, K. B. Bacon, Z. Jiang, X. Zhang, Y. Rao, *Nature* **2001**, *410*, 948.
- [63] P. Fort, M. Milacic, *Reactome*.
- [64] E. Alnemri, *Reactome* **2004**, *11*.
- [65] V. Betapudi, *PloS one* **2010**, *5*, e8560.
- [66] Le Cai, D. Fritz, L. Stefanovic, B. Stefanovic, Journal of molecular biology 2010, 401, 564.
- [67] D. A. Ostler, V. G. Prieto, J. A. Reed, M. T. Deavers, A. J. Lazar, D. Ivan, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **2010**, *23*, 567.
- [68] L. Groesser, S. Singer, E. Peterhof, M. Landthaler, U. Heigl, W. Schneider-Brachert, M. Berneburg, C. Hafner, Acta dermato-venereologica 2016, 96, 737.
- [69] L. Han, D. Wong, A. Dhaka, D. Afar, M. White, W. Xie, H. Herschman, O. Witte, J. Colicelli, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 4954.
- [70] N. Reymond, J. P. Borg, E. Lecocq, J. Adelaide, G. Campadelli-Fiume, P. Dubreuil, M. Lopez, Gene 2000, 255, 347.
- [71] R. Marais, Y. Light, H. F. Paterson, C. S. Mason, C. J. Marshall, *The Journal of biological chemistry* 1997, 272, 4378.
- [72] R. Ballester, D. Marchuk, M. Boguski, A. Saulino, R. Letcher, M. Wigler, F. Collins, *Cell* 1990, *63*, 851.
- [73] L. Gremer, T. Merbitz-Zahradnik, R. Dvorsky, I. C. Cirstea, C. P. Kratz, M. Zenker, A. Wittinghofer, M. R. Ahmadian, *Human mutation* **2011**, *32*, 33.
- [74] M. H. Yang, S. Nickerson, E. T. Kim, C. Liot, G. Laurent, R. Spang, M. R. Philips, Y. Shan, D. E. Shaw, D. Bar-Sagi et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2012, 109, 10843.
- [75] a) K. Nakahara, A. Ohkuni, T. Kitamura, K. Abe, T. Naganuma, Y. Ohno, R. A. Zoeller, A. Kihara, *Molecular cell* 2012, 46, 461; b) A. Ohkuni, Y. Ohno, A. Kihara, *Biochemical and biophysical research communications* 2013, 442, 195; c) E. Castro-Rivera, S. Ran, P. Thorpe, J. D. Minna, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101, 11432; d) A. Maréchal, L. Zou, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2013, 5.
- [76] T. Sasaki, Y. Takai, *Biochemical and biophysical research communications* **1998**, *245*, 641.
- [77] M. Li, C. J. Milligan, H. Wang, A. Walker, L. Churilov, A. J. Lawrence, C. A. Reid, S. C. Hopkins, S. Petrou, *Pharmacology research & perspectives* 2017, 5, e00319.
- [78] O. A. Guryanova, J. A. Drazba, E. I. Frolova, P. M. Chumakov, *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286*, 26849.
- [79] V. Rosslenbroich, L. Dai, S. L. Baader, A. A. Noegel, V. Gieselmann, J. Kappler, Experimental cell research 2005, 310, 434.
- [80] J. Briot, M. Simon, M.-C. Méchin, International journal of molecular sciences 2020, 21.

- [81] I. Kurokawa, Y. Nakai, K. Nishimura, A. Hakamada, K. Isoda, K. Yamanaka, H. Mizutani, A. Tsubura, *Journal of cutaneous pathology* 2007, *34*, 338.
- [82] C. Leblebici, B. Bambul Sığırcı, C. Kelten Talu, S. B. Koca, G. E. Huq, *International journal of surgical pathology* **2019**, *27*, 19.
- [83] C. Niculescu, G. Ganguli-Indra, V. Pfister, V. Dupé, N. Messaddeq, A. de Arcangelis, E. Georges-Labouesse, European Journal of Cell Biology 2011, 90, 270.
- [84] P. Patel, C. Clarke, D. L. Barraclough, T. A. Jowitt, P. S. Rudland, R. Barraclough, L.-Y. Lian, *Journal of molecular biology* **2013**, *425*, 929.
- [85] M. B. Yaffe, H. Beegen, R. L. Eckert, *The Journal of biological chemistry* **1992**, *267*, 12233.
- [86] Y. Qiao, B. Liu, R. Bai, J. Cai, Q. Peng, Genes 2022, 13.
- [87] A. Plana-Pla, L. Condal, A. Jaka, I. Blanco, E. Castellanos, I. Bielsa, *Pediatric dermatology* **2023**, 40, 179.
- [88] L. Zhu, M. Wada, Y. Usagawa, Y. Yasukochi, A. Yokoyama, N. Wada, M. Sakamoto, T. Maekawa,
 R. Miyazaki, E. Yonenaga et al., *Fukuoka igaku zasshi = Hukuoka acta medica* 2013, 104, 370.
- [89] N. Heegaard, *Reactome* **2016**, *58*.
- [90] N. Borregaard, O. E. Sørensen, K. Theilgaard-Mönch, Trends in immunology 2007, 28, 340.
- a) T. Szul, E. Sztul, *Physiology (Bethesda, Md.)* 2011, *26*, 348; b) J. R. Jaldin-Fincati, M. Pavarotti,
 S. Frendo-Cumbo, P. J. Bilan, A. Klip, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2017, *28*, 597.
- [92] R. Ata, C. N. Antonescu, International journal of molecular sciences 2017, 18.
- [93] S. Kühn, M. Geyer, Small GTPases 2014, 5, e29513.
- [94] a) A. Smogorzewska, T. de Lange, Annual review of biochemistry 2004, 73, 177; b) C. B. Harley,A. B. Futcher, C. W. Greider, Nature 1990, 345, 458.
- [95] a) D. Dorsett, M. Merkenschlager, Current opinion in cell biology 2013, 25, 327; b) N. Wu, H. Yu, Cell & bioscience 2012, 2, 5.
- [96] Z. Mei, X. Zhang, J. Yi, J. Huang, J. He, Y. Tao, *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2016, *35*, 182.
- [97] E. A. Stevens, J. D. Mezrich, C. A. Bradfield, *Immunology* **2009**, *127*, 299.
- [98] P. V. Hornbeck, B. Zhang, B. Murray, J. M. Kornhauser, V. Latham, E. Skrzypek, *Nucleic acids research* **2015**, *43*, D512-20.
- [99] H. S. Hillen, Y. I. Morozov, A. Sarfallah, D. Temiakov, P. Cramer, *Cell* **2017**, *171*, 1072-1081.e10.
- [100] V. Bours, G. Franzoso, V. Azarenko, S. Park, T. Kanno, K. Brown, U. Siebenlist, Cell 1993, 72, 729.
- [101] V. Y.-F. Wang, Y. Li, D. Kim, X. Zhong, Q. Du, M. Ghassemian, G. Ghosh, *Molecular cell* 2017, 67, 484-497.e5.
- [102] a) B. Amati, T. D. Littlewood, G. I. Evan, H. Land, *The EMBO journal* 1993, *12*, 5083; b) P. H.
 Watson, J. R. Safneck, K. Le, D. Dubik, R. P. Shiu, *Journal of the National Cancer Institute* 1993, *85*, 902; c) C. V. Dang, *Molecular and cellular biology* 1999, *19*, 1.
- [103] Q. Gao, I. Mechin, N. Kothari, Z. Guo, G. Deng, K. Haas, J. McManus, D. Hoffmann, A. Wang, D. Wiederschain et al., *The Journal of biological chemistry* **2013**, *288*, 30125.
- [104] J. Peng, S.-B. Sun, P.-P. Yang, Y.-M. Fan, Anais brasileiros de dermatologia **2017**, *92*, 682.
- [105] M. Nagao-Watanabe, T. Fukao, E. Matsui, H. Kaneko, R. Inoue, N. Kawamoto, K. Kasahara, M. Nagai, Y. Ichiki, Y. Kitajima et al., *Clinical genetics* 2004, 66, 236.
- [106] C. Schwerk, J. Prasad, K. Degenhardt, H. Erdjument-Bromage, E. White, P. Tempst, V. J. Kidd, J.
 L. Manley, J. M. Lahti, D. Reinberg, *Molecular and cellular biology* 2003, 23, 2981.
- [107] S. Sahara, M. Aoto, Y. Eguchi, N. Imamoto, Y. Yoneda, Y. Tsujimoto, Nature 1999, 401, 168.
- [108] S.-W. Jang, S.-J. Yang, A. Ehlén, S. Dong, H. Khoury, J. Chen, J. L. Persson, K. Ye, *Cancer research* 2008, 68, 4559.
- [109] O. V. Makarova, E. M. Makarov, R. Lührmann, The EMBO journal 2001, 20, 2553.

- [110] A. S. W. Ma, K. Moran-Jones, J. Shan, T. P. Munro, M. J. Snee, K. S. Hoek, R. Smith, *The Journal of biological chemistry* 2002, 277, 18010.
- [111] a) N. Li, Y. Li, J. Lv, X. Zheng, H. Wen, H. Shen, G. Zhu, T.-Y. Chen, S. S. Dhar, P.-Y. Kan et al., *Molecular cell* 2016, 63, 470; b) K. Ghosh, M. Tang, N. Kumari, A. Nandy, S. Basu, D. P. Mall, K. Rai, D. Biswas, *Cell reports* 2018, 24, 2141-2154.e6.
- [112] J. Yuan, K. Luo, L. Zhang, J. C. Cheville, Z. Lou, Cell 2010, 140, 384.
- [113] A. L. Zarling, J. M. Polefrone, A. M. Evans, L. M. Mikesh, J. Shabanowitz, S. T. Lewis, V. H. Engelhard, D. F. Hunt, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103, 14889.
- [114] a) X. Wu, J. H. Bayle, D. Olson, A. J. Levine, *Genes & development* 1993, 7, 1126; b) W. Yang, L. M. Rozan, E. R. McDonald, A. Navaraj, J. J. Liu, E. M. Matthew, W. Wang, D. T. Dicker, W. S. El-Deiry, *The Journal of biological chemistry* 2007, 282, 3273.
- [115] R. Moll, M. Divo, L. Langbein, *Histochemistry and cell biology* **2008**, *129*, 705.
- [116] I. Lavrik, A. Golks, P. H. Krammer, Journal of cell science 2005, 118, 265.
- [117] P. Cramer, Advances in protein chemistry 2004, 67, 1.
- [118] A. J. Bannister, T. Kouzarides, *Cell research* **2011**, *21*, 381.
- [119] J. T. Drummond, G. M. Li, M. J. Longley, P. Modrich, Science (New York, N.Y.) 1995, 268, 1909.
- [120] A. Bertoni, S. Tadokoro, K. Eto, N. Pampori, L. V. Parise, G. C. White, S. J. Shattil, *The Journal of biological chemistry* 2002, 277, 25715.
- [121] J. L. Bos, *The EMBO journal* **1998**, *17*, 6776.
- [122] S. Jono, M. D. McKee, C. E. Murry, A. Shioi, Y. Nishizawa, K. Mori, H. Morii, C. M. Giachelli, *Circulation research* 2000, 87, E10-7.
- [123] D. Uludağ Alkaya, C. Lissewski, G. Yeşil, M. Zenker, B. Tüysüz, American journal of medical genetics. Part A **2021**, 185, 3623.
- [124] M. Tartaglia, B. D. Gelb, M. Zenker, Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism 2011, 25, 161.
- [125] S. Schubbert, G. Bollag, N. Lyubynska, H. Nguyen, C. P. Kratz, M. Zenker, C. M. Niemeyer, A. Molven, K. Shannon, *Molecular and cellular biology* 2007, 27, 7765.
- [126] A. M. Anger, J.-P. Armache, O. Berninghausen, M. Habeck, M. Subklewe, D. N. Wilson, R. Beckmann, Nature 2013, 497, 80.
- [127] E. Lund, S. Güttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, U. Kutay, Science (New York, N.Y.) 2004, 303, 95.
- [128] A. M. Bode, Z. Dong, Science's STKE : signal transduction knowledge environment 2003, 2003, RE2.
- [129] Y. Xie, W. Hou, X. Song, Y. Yu, J. Huang, X. Sun, R. Kang, D. Tang, Cell death and differentiation 2016, 23, 369.
- [130] M. Zasloff, Nature 2002, 415, 389.
- [131] V. Delgado-Rizo, M. A. Martínez-Guzmán, L. Iñiguez-Gutierrez, A. García-Orozco, A. Alvarado-Navarro, M. Fafutis-Morris, Frontiers in immunology 2017, 8, 81.
- [132] W. H. Ouwehand, Reactome 2014, 47.
- [133] T. Areschoug, S. Gordon, *Cellular microbiology* **2009**, *11*, 1160.
- [134] B. Janji, A. Giganti, V. de Corte, M. Catillon, E. Bruyneel, D. Lentz, J. Plastino, J. Gettemans, E. Friederich, *Journal of cell science* 2006, 119, 1947.
- [135] G. H. Wabnitz, T. Köcher, P. Lohneis, C. Stober, M. H. Konstandin, B. Funk, U. Sester, M. Wilm, M. Klemke, Y. Samstag, *European journal of immunology* **2007**, *37*, 649.
- [136] V. J. Allan, Biochemical Society transactions 2011, 39, 1169.
- [137] S. Stein, E. K. Thomas, B. Herzog, M. D. Westfall, J. V. Rocheleau, R. S. Jackson, M. Wang, P. Liang, *The Journal of biological chemistry* 2004, 279, 48930.

- [138] S. K. Kachhap, D. Faith, D. Z. Qian, S. Shabbeer, N. L. Galloway, R. Pili, S. R. Denmeade, A. M. DeMarzo, M. A. Carducci, *PloS one* 2007, 2, e844.
- [139] K.-T. Kim, P. P. Ongusaha, Y.-K. Hong, S. K. Kurdistani, M. Nakamura, K. P. Lu, S. W. Lee, *The Journal of biological chemistry* 2004, 279, 38597.
- [140] B. Nachmias, I. Lazar, M. Elmalech, I. Abed-El-Rahaman, Y. Asshab, O. Mandelboim, R. Perlman,
 D. Ben-Yehuda, *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2007, *12*, 1129.
- [141] A. Ali, K. P. Hoeflich, J. R. Woodgett, Chemical reviews 2001, 101, 2527.
- [142] S. Isemura, E. Saitoh, S. Ito, M. Isemura, K. Sanada, Journal of biochemistry 1984, 96, 1311.
- [143] H. Glatt, C. E. Engelke, U. Pabel, W. Teubner, A. L. Jones, M. W. Coughtrie, U. Andrae, C. N. Falany, W. Meinl, *Toxicology letters* 2000, 112-113, 341.
- [144] Y. Deng, L. Yao, L. Chau, S. S. Ng, Y. Peng, X. Liu, W. Au, J. Wang, F. Li, S. Ji et al., International journal of cancer 2003, 106, 342.
- [145] E. E. Schmidt, *Reactome* **2003**, *5*.
- [146] P. M. Yen, J. H. Brubaker, J. W. Apriletti, J. D. Baxter, W. W. Chin, *Endocrinology* **1994**, *134*, 1075.
- [147] F. Goulart-Silva, C. Serrano-Nascimento, S. S. Texeira, M. T. Nunes, *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 2013, 121, 14.
- [148] J. M. Herrmann, S. Longen, D. Weckbecker, M. Depuydt, Advances in experimental medicine and biology 2012, 748, 41.
- [149] Z. Fan, P. J. Beresford, D. Y. Oh, D. Zhang, J. Lieberman, *Cell* **2003**, *112*, 659.
- [150] L. Yin, Y. Zeng, Y. Xiao, Y. Chen, H. Shen, J. Dong, Cell death & disease 2019, 10, 385.
- [151] A. Gradi, H. Imataka, Y. V. Svitkin, E. Rom, B. Raught, S. Morino, N. Sonenberg, *Molecular and cellular biology* 1998, 18, 334.
- [152] a) B. Fichtman, T. Harel, N. Biran, F. Zagairy, C. D. Applegate, Y. Salzberg, T. Gilboa, S. Salah, A. Shaag, N. Simanovsky et al., *American journal of human genetics* 2019, *105*, 48; b) M. Fornerod, J. van Deursen, S. van Baal, A. Reynolds, D. Davis, K. G. Murti, J. Fransen, G. Grosveld, *The EMBO journal* 1997, *16*, 807.
- [153] a) A. Murayama, K. Ohmori, A. Fujimura, H. Minami, K. Yasuzawa-Tanaka, T. Kuroda, S. Oie, H. Daitoku, M. Okuwaki, K. Nagata et al., *Cell* 2008, *133*, 627; b) X. Ou, M. R. Lee, X. Huang, S. Messina-Graham, H. E. Broxmeyer, *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2014, *32*, 1183; c) H. Vaziri, S. K. Dessain, E. Ng Eaton, S. I. Imai, R. A. Frye, T. K. Pandita, L. Guarente, R. A. Weinberg, *Cell* 2001, *107*, 149.
- [154] a) N. Nasrin, V. K. Kaushik, E. Fortier, D. Wall, K. J. Pearson, R. de Cabo, L. Bordone, *PloS one* 2009, *4*, e8414; b) J. Yao, S. Xu, Y. Sun, Y. Xu, Q. Guo, L. Wei, *Acta Pharmacologica Sinica* 2022, *43*, 1033.
- [155] C.-L. Chang, T.-S. Hsieh, T. T. Yang, K. G. Rothberg, D. B. Azizoglu, E. Volk, J.-C. Liao, J. Liou, Cell reports 2013, 5, 813.
- [156] M. Kaneko, M. Ishiguro, Y. Niinuma, M. Uesugi, Y. Nomura, FEBS letters 2002, 532, 147.
- [157] J. R. Gareau, C. D. Lima, Nature reviews. Molecular cell biology 2010, 11, 861.
- [158] U. Fischer, R. U. Jänicke, K. Schulze-Osthoff, Cell death and differentiation 2003, 10, 76.
- [159] Y. Liu, M. Kulesz-Martin, *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 851.
- [160] A. B. Jaffe, A. Hall, Annual review of cell and developmental biology 2005, 21, 247.
- [161] A. Hall, Science (New York, N.Y.) 1998, 279, 509.
- [162] K. D. Sarge, S. P. Murphy, R. I. Morimoto, *Molecular and cellular biology* 1993, 13, 1392.
- [163] H. Chen, W. N. Howald, M. R. Juchau, Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 2000, 28, 315.
- [164] T. Shimada, J. Watanabe, K. Kawajiri, T. R. Sutter, F. P. Guengerich, E. M. Gillam, K. Inoue, *Carcinogenesis* 1999, 20, 1607.
- [165] T. Katiyar, S. S. Maurya, F. Hasan, A. P. Singh, A. J. Khan, R. Hadi, S. Singh, M. L. B. Bhatt, D. Parmar, *Environmental and molecular mutagenesis* **2017**, *58*, 443.
- [166] S. Körner, T. Pick, F. Bochen, S. Wemmert, C. Körbel, M. D. Menger, A. Cavalié, J.-P. Kühn, B. Schick, M. Linxweiler, *Frontiers in physiology* 2022, *13*, 880004.
- [167] M. Yano, Y. Koumoto, Y. Kanesaki, X. Wu, H. Kido, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1465.
- [168] H. Hu, I. Scholten, C. Gruss, R. Knippers, *Biochemical and biophysical research communications* 2007, 358, 1008.
- [169] T. Nakashima, H. Tomita, A. Hirata, K. Ishida, K. Hisamatsu, Y. Hatano, T. Kanayama, A. Niwa, K. Noguchi, K. Kato et al., *Cancer medicine* **2017**, *6*, 2424.
- [170] Q. Lin, H.-J. Jin, D. Zhang, L. Gao, Molecular medicine reports 2020, 22, 4236.
- [171] C. A. Wild, S. Brandau, R. Lotfi, S. Mattheis, X. Gu, S. Lang, C. Bergmann, Oral oncology 2012, 48, 409.
- [172] S. Jupe, *Reactome* **2012**, 43.
- [173] L. Matthews, Reactome 2009, 31.
- [174] a) J. R. Ortaldo, A. Mantovani, D. Hobbs, M. Rubinstein, S. Pestka, R. B. Herberman, International journal of cancer 1983, 31, 285; b) J. Banchereau, F. Bazan, D. Blanchard, F. Brière, J. P. Galizzi, C. van Kooten, Y. J. Liu, F. Rousset, S. Saeland, Annual review of immunology 1994, 12, 881; c) M. P. Hallsworth, C. P. Soh, S. J. Lane, J. P. Arm, T. H. Lee, The European respiratory journal 1994, 7, 1096.
- [175] M. Blumenberg, Reactome 2016, 58.
- [176] K. Usuki, J. Saras, J. Waltenberger, K. Miyazono, G. Pierce, A. Thomason, C. H. Heldin, Biochemical and biophysical research communications 1992, 184, 1311.
- [177] M. I. Koukourakis, A. Giatromanolaki, G. Fountzilas, E. Sivridis, K. C. Gatter, A. L. Harris, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2000, 6, 381.
- [178] G. L. Waldo, T. K. Ricks, S. N. Hicks, M. L. Cheever, T. Kawano, K. Tsuboi, X. Wang, C. Montell, T. Kozasa, J. Sondek et al., Science (New York, N.Y.) 2010, 330, 974.
- [179] M. Itoh, H. Sasaki, M. Furuse, H. Ozaki, T. Kita, S. Tsukita, *The Journal of cell biology* 2001, 154, 491.
- [180] J. Uttagomol, U. S. Ahmad, A. Rehman, Y. Huang, A. C. Laly, A. Kang, J. Soetaert, R. Chance, M.-T. Teh, J. T. Connelly et al., *International journal of molecular sciences* 2019, 20.
- [181] G.-R. You, J. T. Chang, H.-F. Li, A.-J. Cheng, Cells 2022, 11.
- [182] S. Chawla, T. A. Warren, L. F. Wockner, D. L. J. Lambie, I. S. Brown, T. P. C. Martin, R. Khanna, G. R. Leggatt, B. J. Panizza, *Cancer immunology, immunotherapy : Cll* 2016, 65, 213.
- [183] R. Zheng, R. Ghirlando, M. S. Lee, K. Mizuuchi, M. Krause, R. Craigie, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000, 97, 8997.
- [184] Z. Dong, C. Zhu, Q. Zhan, W. Jiang, Oncotarget 2017, 8, 13240.
- [185] M. Carmo-Fonseca, H. Kern, E. C. Hurt, European Journal of Cell Biology 1991, 55, 17.
- [186] C. Sun, K. D. Mahapatra, J. Elton, C. Li, W. Fernando, W. Lohcharoenkal, J. Lapins, B. Homey, E. Sonkoly, A. Pivarcsi, *The Journal of investigative dermatology* **2023**, *143*, 2386.
- [187] M.-H. Yang, W.-C. Chiang, T.-Y. Chou, S.-Y. Chang, P.-M. Chen, S.-C. Teng, K.-J. Wu, *Clinical cancer* research : an official journal of the American Association for Cancer Research **2006**, *12*, 507.
- [188] G. Heynen, W. Birchmeier, Reactome 2016, 58.
- [189] a) G. Uzer, C. T. Rubin, J. Rubin, *Current molecular biology reports* 2016, *2*, 36; b) A. A. Khilan,
 N. A. Al-Maslamani, H. F. Horn, *Archives of biochemistry and biophysics* 2021, 702, 108829.
- [190] K. Räsänen, O. Itkonen, H. Koistinen, U.-H. Stenman, Clinical chemistry 2016, 62, 449.
- [191] P. R. Molli, D. Q. Li, B. W. Murray, S. K. Rayala, R. Kumar, Oncogene 2009, 28, 2545.

- [192] N. Kim, A. L. Stiegler, T. O. Cameron, P. T. Hallock, A. M. Gomez, J. H. Huang, S. R. Hubbard, M. L. Dustin, S. J. Burden, *Cell* **2008**, *135*, 334.
- [193] A. V. Nicola, H. C. Aguilar, J. Mercer, B. Ryckman, C. M. Wiethoff, Advances in Virology 2013, 2013, 469538.
- [194] Y. Benslimane, M. Sánchez-Osuna, J. Coulombe-Huntington, T. Bertomeu, D. Henry, C. Huard, É. Bonneil, P. Thibault, M. Tyers, L. Harrington, Aging cell 2021, 20, e13331.
- [195] P. Mertins, F. Yang, T. Liu, D. R. Mani, V. A. Petyuk, M. A. Gillette, K. R. Clauser, J. W. Qiao, M. A. Gritsenko, R. J. Moore et al., *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2014, 13, 1690.
- [196] J. P. Wyles, Z. Wu, S. E. L. Mirski, S. P. C. Cole, *Nucleic acids research* 2007, 35, 4076.
- [197] S. A. Stuart, S. Houel, T. Lee, N. Wang, W. M. Old, N. G. Ahn, *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2015, 14, 1599.
- [198] G. Zhou, Z. Liu, J. N. Myers, Journal of cellular biochemistry 2016, 117, 2682.
- [199] Y. Yuan, X. Zhang, K. Du, X. Zhu, S. Chang, Y. Chen, Y. Xu, J. Sun, X. Luo, S. Deng et al., Cell death & disease 2022, 13.
- [200] Y. Liu, B. Zhang, H. Kuang, G. Korakavi, L.-Y. Lu, X. Yu, *The Journal of biological chemistry* **2016**, *291*, 13679.
- [201] H.-Y. Joo, L. Zhai, C. Yang, S. Nie, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, C. Chang, H. Wang, *Nature* **2007**, *449*, 1068.
- [202] M. A. Sanders, D. Ampasala, M. D. Basson, *The Journal of biological chemistry* 2009, 284, 27.
- [203] P. D'Eustachio, *Reactome* **2012**, *41*.
- [204] B. T. MacDonald, K. Tamai, X. He, Developmental cell 2009, 17, 9.
- [205] F. Kern, T. Niault, M. Baccarini, British journal of cancer 2011, 104, 229.
- [206] Y. Katata, S.-I. Inoue, A. Asao, S. Kobayashi, H. Terui, A. Inoue-Shibui, T. Abe, T. Niihori, S. Aiba, N. Ishii et al., *Cell death & disease* **2020**, *11*, 617.
- [207] R. S. Moreci, T. Lechler, *Current biology : CB* **2020**, *30*, R144-R149.
- [208] M. Drosten, L. Simón-Carrasco, I. Hernández-Porras, C. G. Lechuga, M. T. Blasco, H. K. C. Jacob, S. Fabbiano, N. Potenza, X. R. Bustelo, C. Guerra et al., *Cancer research* 2017, 77, 707.
- [209] a) M. Gloerich, J. L. Bos, Trends in cell biology 2011, 21, 615; b) O. L. Roberts, C. Dart, Biochem Soc Trans 2014, 42, 89.
- [210] T. Nauth, F. Bazgir, H. Voß, L. I. Brandenstein, N. Mosaddeghzadeh, V. Rickassel, S. Deden, C. Gorzelanny, H. Schlüter, M. R. Ahmadian et al., *Human molecular genetics* **2023**, *32*, 304.
- [211] G. Carpentieri, C. Leoni, D. Pietraforte, S. Cecchetti, E. Iorio, A. Belardo, D. Pietrucci, M. Di Nottia, D. Pajalunga, F. Megiorni et al., *Human molecular genetics* **2022**, *31*, 561.
- [212] H. P. Chen, Y. T. Zhao, T. C. Zhao, *Critical reviews in oncogenesis* **2015**, *20*, 35.
- [213] J. Navolić, M. Moritz, H. Voß, S. Schlumbohm, Y. Schumann, H. Schlüter, J. E. Neumann, J. Hahn, *Analytical chemistry* **2023**, *95*, 17220.
- [214] C. S. Hughes, S. Moggridge, T. Müller, P. H. Sorensen, G. B. Morin, J. Krijgsveld, Nature protocols 2019, 14, 68.
- [215] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen, M. Mann, Nature protocols 2006, 1, 2856.
- [216] Wolfgang Huber, with contributions from Anja von Heydebreck.Many comments and suggestions by users are acknowledged, amongthem Dennis Kostka, David Kreil, Hans-Ulrich Klein, RobertGentleman, Deepayan Sarkar and Gordon Smyth, vsn, Bioconductor, 2017.
- [217] S. Schlumbohm, J. E. Neumann, P. Neumann, BMC Bioinformatics 2025, 26, 47.
- [218] A. Gocke, B. Siebels, J. Navolić, C. Reinbold, J. E. Neumann, S. Kurtz, H. Schlüter, OmixLitMiner 2: Guided Literature Mining Tools for Automated Categorization of Marker Candidates in Omics Studies, 2025.

10. Anhang

10.1 <u>Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS</u>

Chemikalie	GHS-Symbol	P-Satz	H-Satz	
Natrium-Desovycholat	\wedge	P261, P304+P340,	H302, H315, H319,	
Nathum-Desoxycholat	\checkmark	P305+P351+P338	H335	
HALT Phosphatase		P270, P264, P301+P312,	H302	
Inhibitor Cocktail		P330, P501		
Pierce BCA Protein	¥	P273 P391 P501	H400 H411	
Assay, Reagent B		1273,1331,1301		
		P264, P280, P301+P312,	H302, H315, H318	
Dithiothreitol		P302+P352,		
Ditiliotin citor	\sim \sim	P305+P351+P338,		
		P332+P313		
Iodacetamid		P261, P264, P273, P280,	H301, H317, H334,	
		P301+P310, P302+P352	H413	
		P210, P233, P261, P280,	H225,	
Acetonitril		P312, P370+P378,	H302+H312+H332,	
		P403+P235, P501	H319	
		P210, P233, P280,	H225, H301+H311+H331	
Mothanol		P301+P310,		
Wethanor		P303+P361+P353,	H370	
		P304+P340+P311	11570	
Ethanol		P210, P233, P240, P241,	H225, H319	
Ethanol		P242, P305+P351+P338		
Ammoniumbicarbonat	oniumbicarbonat P264		H302	
		P210, P280, P301+P312,	H226, H302, H314,	
Amoisonsäuro		P303+P361+P353,		
Ameisensaure		P304+P340+P310,	H331	
		P305+P351+P338		
Phosphopentid	(٢)	P280, P264, P302+P352,	H315	
Elutionspuffer		P362+P364, P332+P313,		
		P501		
	for A	P280, P261, P270, P210,		
Rinding (Mach Buffor		P241, P303+P361+P353,	H225, H302+H312+H332,	
(für Phosphopeptide)	< <u>*</u>	P301+P310,		
	· · ·	P305+P351+P338,	H319	
		P403+P235, P501		

10.2 Ergänzende Tabellen

Tabelle A1: Proteine, welche in der Variante HRAS^{Gly13Arg} im Interaktom, Proteom, undPhosphoproteom signifikant verändert zum Wildtyp vorlagen.

Genname	Proteom		Interaktom		Phosphoproteom			
	p-Wert	Log2-Fold-	p-Wert	Log2-Fold-	Stelle	p-Wert	Log2-Fold-	
		Change		Change			Change	
ARHGEF2	2,83E-02	1,09E+00	4,72E-02	1,74E+00	Y589	1,81E-02	-1,46E+00	
CDK12	3,20E-02	-8,44E-01	1,40E-02	1,21E+00	T871	6,79E-04	-2,18E+00	
CDRIS					S439	9,33E-03	-1,89E+00	
COL17A1	5,71E-03	2,88E+00	1,41E-03	3,12E+00	S85	4,25E-04	-7,21E-01	
	6,70E-03	-1,30E+00	3,59E-02	1,58E+00	S510	8,15E-04	1,09E+00	
LF D41L1					S430	1,70E-02	-1,27E+00	
EVPL	7,08E-03	-1,04E+00	3,58E-02	1,61E+00	E+00 S2025 5,38E-05		-2,14E+00	
HSPH1	2,01E-04	1,16E+00	3,54E-03	2,24E+00	S809	5,25E-04	-1,04E+00	
IFI16	6,89E-04	1,16E+00	8,89E-04	2,40E+00	S153 2,18E		4,38E+00	
MKIGT	4 725 04	7,44E-01	1,44E-02		S308	3,65E-02	5,96E-01	
WIKI07	4,72L-04			1,031+00	S827	2,06E-02	6,06E-01	
ΜΥΩΕ	1,68E-05	9,05E-01	3,80E-04	1,76E+00	S1915	2,72E-02	-8,05E-01	
WIYOF					S174	2,81E-06	-9,11E-01	
NOB1	1,30E-03	-7,32E-01	2,72E-02	1,17E+00	S201	3,47E-03	-1,23E+00	
NUMA1	4,82E-06	7,87E-01	5,07E-03	3,25E+00	S169	6,86E-04	8,53E-01	
PFKP	3,73E-03	6,02E-01	4,19E-03	1,95E+00	S386	1,01E-02	-2,51E+00	
PLCB3	1,39E-05	2,12E+00	5,84E-03	2,21E+00	S537 3,04E-0		-1,29E+00	
PRPF40A	4,49E-03	8,17E-01	8,43E-04	1,79E+00	S888 9,84E-03		-6,99E-01	
RABL6	1,57E-02	8,69E-01	1,25E-02	2,61E+00	S402 3,67E-03		-1,72E+00	
RBM26	4,57E-02	8,74E-01	3,42E-03	1,98E+00	S616 5,57E-03		-2,13E+00	
SFN	5,49E-03	5,95E-01	1,25E-02	1,43E+00	S74	1,31E-02	8,70E-01	
SON	3,16E-04	-6,75E-01	1,43E-02	1,45E+00	S1697	5,75E-05	3,39E+00	
3011					S2129	1,71E-03	-1,07E+00	
	4,43E-03	-6,23E-01	1,35E-02	2,07E+00	S432	2,93E-03	-2,83E+00	
TJP2					S431	3,33E-04	-2,50E+00	
					S296	4,06E-02	-1,52E+00	
					S986	3,82E-02	-1,19E+00	
					S244	3,81E-02	-8,75E-01	
	7,91E-03	-6,78E-01	3,91E-02	1,80E+00	S184	4,21E-02	7,88E-01	
ТМРО					T160	4,49E-04	1,21E+00	
					S351	8,01E-05	-1,26E+00	

Tabelle A2: Signalwege, welche in allen drei Datensätzen im Vergleich HRAS^{Gly13Arg}-Zellen vs. WT-Zellen signifikant angereichert sind. Die Entitäten sind alphabetisch sortiert.

Nir	Pathway	Proteom		Interaktom		Phosphoproteom	
INF.		p-Wert	z-Score	p-Wert	z-Score	p-Wert	z-Score
1	Actin Cytoskeleton Signaling	8,61E-06	1,70	1,38E-06	2,86	2,34E-02	-1,73
2	Apoptotic Execution Phase	3,61E-08	0,30	3,89E-03	2,41	3,39E-05	-0,33
3	Cell Cycle Checkpoints	3,29E-04	-0,69	1,55E-04	4,91	4,79E-02	-0,54
4	Cell Junction Organization	3,71E-02	1,89	9,33E-03	3,16	1,86E-02	-1,13
5	Hereditary Breast Cancer Signaling	1,42E-02	1,27	2,69E-03	-0,78	1,07E-02	-0,63
6	Mitotic Metaphase and Anaphase	1,51E-04	1,53	5,01E-03	4,58	6,76E-03	-0,78
7	Nucleotide Excision Repair, Enhanced Pathway	4,16E-03	-1,89	4,27E-04	3,46	4,57E-06	-0,30
8	Nucleotide Excision Repair	1,17E-02	-1,41	6,46E-08	4,58	3,55E-03	0,33
9	Processing of Capped Intron-Containing Pre- mRNA	3,93E-03	-0,47	2,51E-26	8,06	2,69E-02	-0,47
10	Protein Ubiquitination Pathway	3,80E-02	1,00	1,17E-02	4,47	4,07E-02	0,54
11	RHOA Signaling	3,24E-02	1,67	5,37E-03	2,89	1,26E-02	-0,82
12	RNA-Polymerase II Transcription	6,92E-04	-0,58	5,01E-10	5,29	8,32E-07	-1,41
13	TP53 Regulates Transcription of DNA Repair Genes	2,37E-03	-0,38	5,50E-04	2,71	1,51E-03	-1,41

10.3 Ergänzende Abbildungen



Abbildung A1: Der Bubble-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege, sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in der Variante HRAS^{Gly13Arg} im Interaktom. Nur Entitäten mit einem p-Wert < 0,05 für die Anreicherung (Fisher's Exact-Test) sowie einem absolutem z-Score > 0,1 werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr Proteine, die zu dem Signalweg gehören, wurden im Datensatz gefunden. Entitäten mit positivem z-Score (und daher einer Aktivierung in HRAS^{Gly13Arg}) sind rot, während Entitäten mit negativem z-Score (und daher Inhibierung in HRAS^{Gly13Arg}) blau gefärbt sind. Die Signalwege sind zu Kategorien zusammengefasst, welche auf der y-Achse zu sehen sind.



Abbildung A2: Der Bubble-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege, sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in der Variante HRAS^{Gly13Arg} im Proteom. Nur Entitäten mit einem p-Wert < 0,05 für die Anreicherung (Fisher's Exact-Test) sowie einem absolutem z-Score > 0,1 werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr Proteine, die zu dem Signalweg gehören, wurden im Datensatz gefunden. Entitäten mit positivem z-Score (und daher einer Aktivierung in HRAS^{Gly13Arg}) sind rot, während Entitäten mit negativem z-Score (und daher Inhibierung in HRAS^{Gly13Arg}) blau gefärbt sind. Die Signalwege sind zu Kategorien zusammengefasst, welche auf der y-Achse zu sehen sind.



Abbildung A3: Der Bubble-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege, sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in der Variante HRAS^{Gly13Arg} im Phosphoproteom. Nur Entitäten mit einem p-Wert < 0,05 für die Anreicherung (Fisher's Exact-Test) sowie einem absolutem z-Score > 0,1 werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr Proteine, die zu dem Signalweg gehören, wurden im Datensatz gefunden. Entitäten mit positivem z-Score (und daher einer Aktivierung in HRAS^{Gly13Arg}) sind rot, während Entitäten mit negativem z-Score (und daher Inhibierung in HRAS^{Gly13Arg}) blau gefärbt sind. Die Signalwege sind zu Kategorien zusammengefasst, welche auf der y-Achse zu sehen sind.



Abbildung A4: Der Bubble-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege, sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in der Variante HRAS^{Gly12Ser} im Interaktom. Nur Entitäten mit einem p-Wert < 0,05 für die Anreicherung (Fisher's Exact-Test) sowie einem absolutem z-Score > 0,1 werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr Proteine, die zu dem Signalweg gehören, wurden im Datensatz gefunden. Entitäten mit positivem z-Score (und daher einer Aktivierung in HRAS^{Gly12Ser}) sind rot, während Entitäten mit negativem z-Score (und daher Inhibierung in HRAS^{Gly12Ser}) blau gefärbt sind. Die Signalwege sind zu Kategorien zusammengefasst, welche auf der y-Achse zu sehen sind.



^{2,0 2,1 2,2 2,3 2,4 2,5 2,6 2,7 2,8 2,9 3,0 3,1 3,2 3,3 3,4 3,5 3,6 3,7 3,8 3,9 4,0 4,1 4,2 4,3 4,4 4,5 4,6 4,7 4,8 4,9 5,0 5,1 5,2 5,3 5,4} -loα(p-value)

Abbildung A5: Der Bubble-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege, sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in der Variante HRAS^{Gly12Ser} im Proteom. Nur Entitäten mit einem p-Wert < 0,05 für die Anreicherung (Fisher's Exact-Test) sowie einem absolutem z-Score > 0,1 werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr Proteine, die zu dem Signalweg gehören, wurden im Datensatz gefunden. Entitäten mit positivem z-Score (und daher einer Aktivierung in HRAS^{Gly12Ser}) sind rot, während Entitäten mit negativem z-Score (und daher Inhibierung in HRAS^{Gly12Ser}) blau gefärbt sind. Die Signalwege sind zu Kategorien zusammengefasst, welche auf der y-Achse zu sehen sind.



Abbildung A6: Der Bubble-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege, sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in der Variante HRAS^{Gly12Ser} im Phosphoproteom. Nur Entitäten mit einem p-Wert < 0,05 für die Anreicherung (Fisher's Exact-Test) sowie einem absolutem z-Score > 0,1 werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr Proteine, die zu dem Signalweg gehören, wurden im Datensatz gefunden. Entitäten mit positivem z-Score (und daher einer Aktivierung in HRAS^{Gly12Ser}) sind rot, während Entitäten mit negativem z-Score (und daher Inhibierung in HRAS^{Gly12Ser}) blau gefärbt sind. Die Signalwege sind zu Kategorien zusammengefasst, welche auf der y-Achse zu sehen sind.



Abbildung A7: Der Bubble-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege, sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in der Variante HRAS^{Gly12Val} im Interaktom. Nur Entitäten mit einem p-Wert < 0,05 für die Anreicherung (Fisher's Exact-Test) sowie einem absolutem z-Score > 0,1 werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr Proteine, die zu dem Signalweg gehören, wurden im Datensatz gefunden. Entitäten mit positivem z-Score (und daher einer Aktivierung in HRAS^{Gly12Val}) sind rot, während Entitäten mit negativem z-Score (und daher Inhibierung in HRAS^{Gly12Val}) blau gefärbt sind. Die Signalwege sind zu Kategorien zusammengefasst, welche auf der y-Achse zu sehen sind.



Abbildung A8: Der Bubble-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege, sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in der Variante HRAS^{Gly12Val} im Proteom. Nur Entitäten mit einem p-Wert < 0,05 für die Anreicherung (Fisher's Exact-Test) sowie einem absolutem z-Score > 0,1 werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr Proteine, die zu dem Signalweg gehören, wurden im Datensatz gefunden. Entitäten mit positivem z-Score (und daher einer Aktivierung in HRAS^{Gly12Val}) sind rot, während Entitäten mit negativem z-Score (und daher Inhibierung in HRAS^{Gly12Val}) blau gefärbt sind. Die Signalwege sind zu Kategorien zusammengefasst, welche auf der y-Achse zu sehen sind.



-log(p-value)

Abbildung A9: Der Bubble-Plot zeigt signifikant angereicherte Signalwege, sowie deren Aktivierung oder Inhibierung in der Variante HRAS^{Gly12Val} im Phosphoproteom. Nur Entitäten mit einem p-Wert < 0,05 für die Anreicherung (Fisher's Exact-Test) sowie einem absolutem z-Score > 0,1 werden gezeigt. Je größer die Bubble, desto mehr Proteine, die zu dem Signalweg gehören, wurden im Datensatz gefunden. Entitäten mit positivem z-Score (und daher einer Aktivierung in HRAS^{Gly12Val}) sind rot, während Entitäten mit negativem z-Score (und daher Inhibierung in HRAS^{Gly12Val}) blau gefärbt sind. Die Signalwege sind zu Kategorien zusammengefasst, welche auf der y-Achse zu sehen sind.

11. Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie bei meinem Betreuer, Prof. Hartmut Schlüter, für seine Unterstützung bedanken. Ich konnte immer auf deine Unterstützung zählen und du hast mich ermutigt, meinen wissenschaftlichen Interessen nachzugehen und mein Potenzial durch freies, unabhängiges Arbeiten zu entfalten. Neben Hartmut hat die auch gesamte AG Schlüter zum Erfolg dieser Doktorarbeit beigetragen. Es war eine Freude, mit euch zusammenzuarbeiten, Kaffee zu trinken, Kuchen zu essen, zu diskutieren, zu lachen, zu fluchen (wenn die Geräte mal wieder ihr eigenes Ding drehen), und auf Klassenfahrten ähm Konferenzen zu fahren. Sogar pünktlich um 11:30 in die Mensa zu gehen, werde ich irgendwie vermissen. Ich habe in den letzten Jahren unglaublich viel gelernt und werde noch lange von dieser Erfahrung profitieren.

Auch Georg Rosenberger und Theresa Nauth möchte ich für ihre produktive, unkomplizierte und immer freundliche Zusammenarbeit im Rahmen des HRAS-Projektes danken. Besonderer Dank natürlich für das Bereitstellen der Proben, aber auch für den wissenschaftlichen Austausch.

Auch bei meiner Familie möchte ich dafür danken, immer an meiner Seite zu stehen, und mich bei meinen Entscheidungen zu unterstützen. Es ist schön zu wissen, dass man immer ein offenes Ohr hat und einen Ort, an dem man willkommen ist, auch wenn man gerade etwas weiter entfernt ist. Natürlich trifft das auch auf meinen Freund Gabriel zu. Deine emotionale Unterstützung hilft mir immer wieder, mich aufs Neue zu motivieren. Egal, ob durch Besuche, Telefonate, oder auch einfach das Schicken von Katzenvideos - du bist trotz der räumlichen Distanz immer präsent und eine echte Bereicherung für mein Leben.

Zuletzt möchte ich meinen Freundinnen und Freunden danken, egal ob in Hamburg, Innsbruck, oder anderen Orten. Es ist schön, Leute im Leben zu haben, mit denen man auf andere Gedanken kommen kann und die einen bewusst machen, dass es manchmal auch wichtigere Dinge im Leben gibt als Arbeit.

12. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.

nonnas Mair, Hamburg, der 28.04.2025

Thomas Mair