

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin  
Institut für Humangenetik

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Gal

## **Analyse der Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen im humanen CBL-Protein auf die Regulation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR)**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Hendrik Kentsch  
aus Osnabrück

Hamburg 2012

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:**

**08.02.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:**

**Prof. Dr. K. Kutsche**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:**

**PD Dr. H.-J. Kreienkamp**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:**

**PD Dr. C. Bernreuther**

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
I. 1	Das Noonan-Syndrom	1
I. 2	Die Pathogenese des Noonan-Syndroms	2
I. 2.1	Der hyperstimulierte RAS-MAPK-Signalweg	2
I. 2.2	Die bekannten Krankheitsgene für das Noonan-Syndrom	4
I. 3	<i>CBL</i> als neues Krankheitsgen für eine Noonan-Syndrom-ähnliche Erkrankung	6
I. 4	Die zelluläre Funktion des CBL-Proteins	7
I. 4.1	c-Cbl ist eine E3-Ubiquitin-Ligase	7
I. 4.2	c-Cbl reguliert durch Ubiquitylierung das Trafficking des EGF-Rezeptors	8
I. 5	Humanpathogene Mutationen in <i>CBL</i>	9
I. 6	Arbeitshypothese und Fragestellung	10
<b>II</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>11</b>
II. 1	Chemikalien, Zusätze und Lösungsmittel	11
II. 2	Kits, Enzyme, Nukleotide, Standards	12
II. 3	Medien und Zusätze	12
II. 4	Puffer und Lösungen	13
II. 4.1	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	13
II. 4.2	Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten	14
II. 4.3	Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten	16
II. 5	Bakterienstämme und Zelllinie	17
II. 6	Vektoren und Expressionskonstrukte	17
II. 6.1	Zur Verfügung gestellte Konstrukte	17
II. 6.2	Ausgangsvektoren für die Herstellung neuer Konstrukte	17
II. 6.3	Hergestellte Konstrukte	18
II. 7	Oligonukleotide	19
II. 7.1	Oligonukleotide für Klonierungen	19
II. 7.2	Oligonukleotide für Sequenzierungen	19
II. 8	Antikörper	20
II. 8.1	Primärantikörper	20
II. 8.2	Sekundärantikörper	21
II. 9	Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien	21
II. 10	Datenbanken und Software	22
II. 10.1	Datenbanken	22
II. 10.2	Software	22

II. 11	Molekularbiologische Methoden	22
II. 11.1	Amplifikation von genomischer DNA	22
II. 11.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
II. 11.3	PCR-vermittelte Mutagenese	24
II. 11.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	26
II. 11.5	Agarosegelelektrophorese	26
II. 11.6	DNA-Sequenzierung	27
II. 11.7	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNA	28
II. 11.8	Anzucht von Bakterien	29
II. 11.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	29
II. 11.10	Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA	29
II. 11.11	Klonierung mittels TOPO® Cloning-Technologie	30
II. 11.12	Klonierung mittels GATEWAY™-Technologie	30
II. 11.13	Photometrische Quantifizierung von DNA	31
II. 12	Proteinbiochemische Methoden	31
II. 12.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
II. 12.2	Western-Blot	32
II. 12.3	Immunologische Detektion von auf PVDF-Membranen immobilisierten Proteinen	33
II. 13	Zellbiologische Methoden	34
II. 13.1	Kultivierung von etablierten Zelllinien	34
II. 13.2	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Lipofectamin™ 2000	34
II. 13.3	Biotinylierungsassays	35
II. 13.4	Biotinylierung und Quantifizierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren	36
II. 13.5	Biotinylierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren und Quantifizierung der EGF-Rezeptor Endozytose	37
II. 13.6	Biotinylierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren und Analyse der EGF-Rezeptor Trafficking-Kinetik	39
II. 13.7	Quantifizierung der lysosomalen EGF-Rezeptor Degradierung bei inhibierter Proteinbiosynthese	40
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
III. 1	Mutationsanalyse des <i>CBL</i> -Gens bei mutationsnegativen Patienten mit Noonan-Syndrom bzw. einem Noonan-Syndrom ähnlichen Krankheitsbild	41
III. 1.1	Vorbemerkung	41
III. 1.2	PCR-Amplifikation ausgewählter Exons des <i>CBL</i> -Gens und anschließende DNA-Sequenzierung	41
III. 2	Analyse der Auswirkungen von Aminosäure-substitutionen im c-Cbl-Protein auf die Regulation des EGFR in COS-7-Zellen mittels Rezeptor-Biotinylierungsassays und Quantifizierung der Gesamt-EGFR-Menge	43
III. 2.1	Vorbemerkung	43

III. 2.2	Bestimmung der Menge an EGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche von transient transfizierten COS-7-Zellen mittels Rezeptor-Biotinylierungsassays	43
III. 2.3	Untersuchung der EGF-Rezeptor-Internalisierung in transient transfizierten COS-7-Zellen mittels Rezeptor-Biotinylierungsassays	46
III. 2.4	Analyse des zeitlichen Verlaufs der Internalisierung und Degradierung von EGFR in transient transfizierten COS-7-Zellen mittels Rezeptor-Biotinylierungsassays	48
III. 2.5	Untersuchung der EGF-Rezeptor-Degradierung in transient transfizierten COS-7-Zellen	50
<b>IV</b>	<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
IV. 1	Keine pathogene Mutation in <i>CBL</i> bei 185 Patienten mit Noonan-Syndrom bzw. dazu ähnlichem Krankheitsbild	53
IV. 2	Die <i>CBL</i> -Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q vermindern die Internalisierung und Degradierung von EGFR nach EGF-Stimulus und haben Auswirkungen auf das intrazelluläre EGFR-Trafficking	55
IV. 3	Heterozygote Keimbahnmutationen in <i>CBL</i> erhöhen die intrazelluläre Signaltransduktion und prädisponieren für Leukämie	61
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>VI</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>VII</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>VIII</b>	<b>Danksagung</b>	<b>73</b>
<b>IX</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>74</b>

# I Einleitung

## I. 1 Das Noonan-Syndrom

Das Noonan-Syndrom [NS (MIM 163950)] wurde erstmalig 1968 von der Kinderkardiologin Jacqueline Noonan näher beschrieben. Dabei fasste sie die Auffälligkeiten eines Krankheitsbildes zusammen, das sie zuvor an neun Patienten studiert hatte. Die Autorin berichtete von einem gemeinsamen Auftreten gewisser Anomalien, wie Pulmonalstenose, fazialen Dysmorphien und Deformierungen des Brustkorbes [Noonan, 1968]. Das Noonan-Syndrom zählt zu den *neuro-cardio-facial-cutaneous syndromes* (NCFC-S) und ist eine genetisch heterogene Erkrankung, die autosomal-dominant erblich ist. In über der Hälfte der Fälle findet man *de novo* Mutationen. Die Prävalenz wird mit 1:1000 - 1:2500 angegeben [Nora et al., 1974]. In der Klinik ist diese Erkrankung häufig durch eine typische Trias gekennzeichnet, nämlich faziale Dysmorphien, kongenitale Herzfehler und Kleinwuchs [Mautner et al., 2010].

Zu den fazialen Dysmorphien zählen u. a. Hypertelorismus, Ptosis, Epikanthus und tief ansetzende, nach hinten rotierte Ohren (Abb. 1). Bei den kongenitalen Herzfehlern ist am häufigsten die *hypertrophic cardiomyopathy* (HCM) und die Pulmonalstenose zu finden [Tartaglia et al., 2010]. Fakultative klinische Merkmale dieser Erkrankung sind Lernschwierigkeiten, Kryptorchismus und ein erhöhtes Malignom-Risiko (vor allem juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) und Riesenzelltumoren) [Mautner et al., 2010]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die phänotypischen Merkmale des Noonan-Syndroms.



**Abb. 1: Foto einer Patientin mit Noonan-Syndrom**

Typische Fazies von einer Patientin mit Noonan-Syndrom [Allanson et al., 2010]

Bei den kongenitalen Herzfehlern ist am häufigsten die *hypertrophic cardiomyopathy* (HCM) und die Pulmonalstenose zu finden [Tartaglia et al., 2010]. Fakultative klinische Merkmale dieser Erkrankung sind Lernschwierigkeiten, Kryptorchismus und ein erhöhtes Malignom-Risiko (vor allem juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) und Riesenzelltumoren) [Mautner et al., 2010]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die phänotypischen Merkmale des Noonan-Syndroms.

<p><b>faziale Dysmorphien</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Epikanthus</li> <li>Hypertelorismus</li> <li>Ptosis</li> <li>nach lateral abfallende Lidachsen</li> <li>tief ansetzende, nach hinten rotierte Ohren</li> </ul> <p><b>Herzfehler</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Pulmonalstenose</li> <li>hypertrophe Kardiomyopathie</li> <li>atrioventrikuläre Septierungsdefekte</li> <li>Mitralklappendefekte</li> <li>Fallot-Tetralogie</li> </ul> <p><b>Kleinwuchs</b></p> <p><b>Entwicklungsverzögerung / Lernschwierigkeiten</b></p> <p><b>visuelle Defizite</b></p>	<p><b>spärliches, lockiges Haar</b></p> <p><b>Skelettanomalien</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Trichterbrust</li> <li>Kielbrust</li> <li>Skoliose</li> </ul> <p><b>kurzer, breiter Hals</b></p> <p><b>tiefer Haaranatz im Nacken</b></p> <p><b>Kryptorchismus</b></p> <p><b>hämatologische Anomalien</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>erhöhte Blutungsneigung</li> <li>Thrombozytopenie</li> <li>Leukämie</li> </ul> <p><b>hyperpigmentierte Hautareale</b></p> <p><b>Lymphgefäßerkrankungen</b></p> <p><b>Hörminderung</b></p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Tab. 1: Häufig beobachtete klinische Merkmale beim Noonan-Syndrom**

In Anlehnung an Tartaglia und Gelb (2005).

Eine Diagnosestellung erfolgt in erster Linie klinisch. Als hilfreich dafür haben sich Scoring-Systeme erwiesen, die zwischen Hauptkriterien und Nebenkriterien unterscheiden. Als Hauptkriterien gelten u. a. eine positive Familienanamnese, das Vorliegen einer Pulmonalstenose oder HCM oder eine Körpergröße, die unterhalb der 3. Percentile liegt. Zu den Nebenkriterien zählen andere Herzfehler als die genannten, ein erweiterter Thorax oder eine Körpergröße unter der 10. Percentile. Gewisse Konstellationen, wie das Vorliegen von zwei Hauptkriterien oder das Vorliegen eines Hauptkriteriums und zwei Nebenkriterien, lassen eine Diagnosestellung zu [van der Burgt, 2007]. Darüber hinaus besteht für die Diagnostik die Möglichkeit eines Gen-Tests (siehe Kap. 1.2.2). Dieser kann einerseits anhand einer Blutprobe erfolgen; werden jedoch bereits Anomalien in der vorgeburtlichen Entwicklung festgestellt, besteht andererseits die Möglichkeit einer pränatalen molekulargenetischen Diagnostik. Die endgültige Diagnosestellung wird häufig dadurch erschwert, dass das Noonan-Syndrom mit einer sehr variablen klinischen Ausprägung einhergeht, die zudem mit zunehmendem Alter an Markanz verliert [Allanson et al., 1985]. Differentialdiagnostisch müssen aufgrund eines überlappenden Phänotyps zudem immer folgende Erkrankungen abgewogen werden: das Turner-Syndrom, das *cardio-facio-cutaneous* (CFC) *syndrome*, das Costello-Syndrom, die Neurofibromatose Typ I und das LEOPARD-Syndrom [van der Burgt, 2007].

Der Großteil der am Noonan-Syndrom erkrankten Patienten ist in der Lage, ein normales Leben zu führen, ohne eine ständige, spezielle medizinische Betreuung in Anspruch nehmen zu müssen. Ausgenommen davon sind Patienten, deren Vitalität durch krankheitsspezifische Anomalien und den sich daraus ergebenden Umständen gerade in den ersten Lebensjahren gefährdet ist. Insbesondere trifft dies bei angeborenen Herzfehlern, hämatologischen Komplikationen und bei Ernährungsstörungen zu [van der Burgt, 2007].

## **I. 2 Die Pathogenese des Noonan-Syndroms**

### **I. 2.1 Der hyperstimulierte RAS-MAPK-Signalweg**

Eine gesteigerte Signalweiterleitung innerhalb eines intrazellulären Signalweges, des RAS-MAPK-Signalweges, gilt als Hauptursache des Noonan-Syndroms [Bentires-Alj et al., 2006]. Diese komplexe Signalkaskade nimmt, wie in Abb. 2 veranschaulicht, ihren Anfang mit der Bindung von extrazellulären Wachstumsfaktoren (Liganden) an deren entsprechende Transmembranrezeptoren, wie z.B. von EGF (*epidermal*

*growth factor*) an den EGFR (*epidermal growth factor receptor*) [Schlessinger, 2000, Seger et al., 1995]. Die Ligandenbindung induziert eine Dimerisierung und in Folge eine Autophosphorylierung der EGFR. Sodann wird das Adapterprotein *growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2), vermittelt durch eine SH2-Domäne und phosphorylierte Tyrosinreste, an den EGFR rekrutiert. Da sich GRB2 im Komplex mit *Son of sevenless homolog 1* (SOS1) befindet, wird dieses ebenfalls an die Plasmamembran befördert. SOS1 ist ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) und katalysiert den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) an RAS-GTPasen und aktiviert diese somit [Quilliam et al., 1995]. Inaktiviert werden die GTPasen wiederum durch Hydrolyse von GTP zu GDP. Die sehr geringe intrinsische Hydrolyseaktivität wird dabei durch die Aktivität von GTPase aktivierenden Proteinen (GAPs) potenziert. Demnach zyklisieren RAS (*rat sarcoma*)-Proteine zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand und einer aktiven, GTP-gebundenen Konformation [Krauss et al., 2003]. Die Konformation im aktiven Zustand ermöglicht den RAS-Proteinen daraufhin mit Effektorproteinen, wie z. B. *rat fibrosarcoma kinase* (RAF-Kinasen), zu interagieren. Dieses führt zur Aktivierung der RAF-Kinasen [Leicht et al., 2007]. Nachfolgend phosphorylieren aktivierte RAF-Kinasen die *mitogen-activated protein kinase* (MAP-Kinase) MEK1 (MAP2K1) und MEK2 (MAP2K2), welche die *extracellular signal-regulated kinases* ERK1 und ERK2 phosphorylieren [Tartaglia et al., 2010]. Letztere translozieren schließlich vom Cytosol in den Zellkern und regulieren dort Transkriptionsfaktoren. Über den RAS-MAPK-Signalweg werden verschiedene basale zelluläre Prozesse, wie z. B. Proliferation, Differenzierung, Motilität, Überleben etc., kontrolliert.

Da bei über 70% aller Patienten mit Noonan-Syndrom *gain-of-function*-Mutationen in Genen gefunden werden, die für Proteine aus dem RAS-MAPK-Signalweg kodieren, wird ein erhöhter Fluss durch diesen Signalweg als Krankheitsursache gesehen [Tartaglia et al., 2010]. Per Definition führen diese Mutationen zu einer gesteigerten Aktivität der betroffenen Proteine hinsichtlich ihrer Funktion in der RAS-MAPK-Signalkaskade.

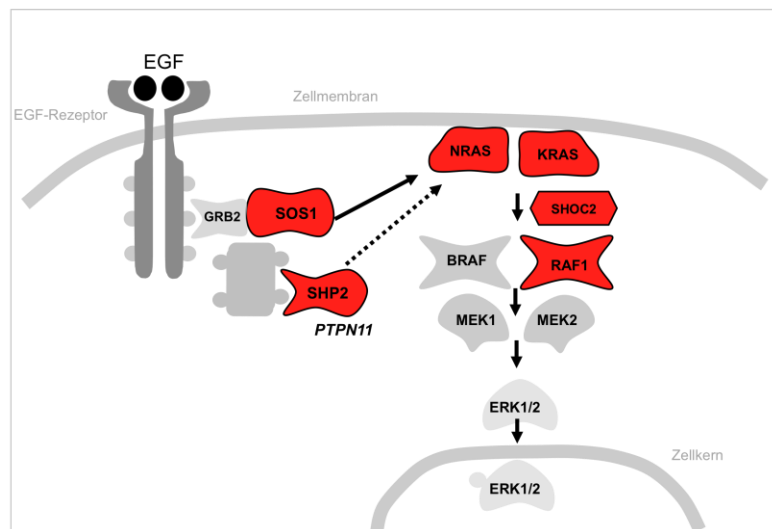
Eine Hyperstimulation dieser Signalkaskade ist schon länger aus der Tumorbio­logie bekannt: So wurde etwa gezeigt, dass somatische *gain-of-function*-Mutationen in *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (*KRAS*), *Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog* (*NRAS*), *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog* (*HRAS*) und *Murine sarcoma viral oncogene homolog B1* (*BRAF*) überaus häufig im Rahmen von gewissen Malignomen gefunden werden. Dabei wird mutiertes *KRAS* insbesondere für die Entstehung von Pankreaskarzinomen, Lungenkarzinomen,



kolorektalen Karzinomen und Karzinomen der Gallengänge verantwortlich gemacht [Almoguera et al., 1988, Burmer et al., 1989, Karnoub et al., 2008, Tam et al., 2006]. Mutationen in *NRAS* konnten u. a. vermehrt in Tumorzellen maligner Melanome, Karzinomen des Dünndarms und in leukämischen Zellen nachgewiesen werden. In einigen Fällen von Speicheldrüsenkrebs und Karzinomen des Urogenitaltraktes konnten Mutationen in *HRAS* gefunden werden [Karnoub et al., 2008]. Die mutierten RAS-Proteine stellen in diesen Fällen Onkogene dar, die einen unkontrollierten Signalfluss durch den RAS-MAPK-Signalweg induzieren. Dieser unkontrollierte Signalfluss kann ebenso weiter „flussabwärts“ durch Mutationen in *BRAF* bedingt sein: *gain-of-function*-Mutationen in *BRAF* werden unter anderem mit dem Non-Hodgkin-Lymphom und dem malignen Melanom in Verbindung gebracht [Davies et al., 2002]. Welche Gene genau beim Noonan-Syndrom betroffen sind, ist in Abb. 2 ersichtlich und wird im nächsten Kapitel erörtert.

**Abb. 2: Der RAS-MAPK-Signalweg**

Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) an den EGFR führt zu einer Dimerisierung und Auto-phosphorylierung des Rezeptors. An die nun im carboxyterminalen Bereich befindlichen Phosphatreste binden Adapterproteine, wie z.B. GRB2. Diese rekrutieren SOS1 und SHP2 an den Rezeptor, welche daraufhin zur Aktivierung der RAS-Proteine NRAS und KRAS beitragen. Die aktivierten GTPasen binden und aktivieren RAF-Kinasen, die sodann über eine Aktivierung von MEK1 und MEK2 die MAPK-Kaskade stimulieren. Nach Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 werden diese in den Zellkern transloziert, wo sie die Transkription spezifisch steuern.



Mutationen in *PTPN11* (kodiert für SHP2), *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *NRAS* oder *SHOC2* (rote Symbole) sind mit dem Noonan-Syndrom assoziiert (Kap. I.2.2).

**I. 2.2 Die bekannten Krankheitsgene für das Noonan-Syndrom**

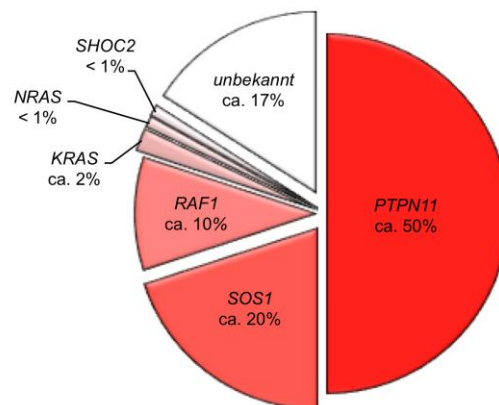
Mutationen in folgenden Genen liegen dem Noonan-Syndrom zugrunde: *PTPN11*, *SOS1*, *KRAS*, *NRAS*, *RAF1* und *SHOC2* [Carta et al., 2006, Cirstea et al., 2010, Cordeddu et al., 2009, Pandit et al., 2007, Razzaque et al., 2007, Roberts et al., 2007, Schubbert et al., 2006, Tartaglia et al., 2001, Tartaglia et al., 2007] (Abb. 2+3).

Im Folgenden sollen diese Gene und der jeweils zugrunde liegende mutationsbedingte molekulare Pathomechanismus knapp umschrieben werden.

Bei ca. 50% der Patienten mit Noonan-Syndrom können Mutationen in *PTPN11* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*) ausgemacht werden [Tartaglia et al., 2010]. Dieses Gen codiert SHP2, eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, die zwischen einem aktiven und einem inaktiven Zustand zyklisiert und deren Aktivität den RAS-MAPK-Signalweg stimuliert [Dance et al., 2008].

Derzeit ist zwar nicht genau bekannt, über welchen Mechanismus die gefundenen Mutationen letztendlich zu einem erhöhten Fluss durch diesen Signalweg führen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Mutationen gewisse Konformationsänderungen von SHP2 bewirken, die zu einem vermehrten Vorliegen des aktiven Zustands und erhöhter Phosphatase-Aktivität führen [Fragale et al., 2004, Niihori et al., 2005]. Den zweitgrößten Anteil machen in ca.

20% der Fälle Mutationen in *SOS1* aus [Pandit et al., 2007, Roberts et al., 2007]. Dieser Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor aktiviert RAS-Proteine durch Stimulation des Austausches von GDP zu GTP [Quilliam et al., 1995]. Es wird vermutet, dass die entdeckten Mutationen Konformationsänderungen von *SOS1* nach sich ziehen, sodass ein bestimmtes aktives Zentrum freigelegt wird. Dadurch wird die Aktivität von *SOS1* weitgehend von Regulationsmechanismen entkoppelt und steigt an [Tartaglia et al., 2010]. Seltener werden Mutationen in *KRAS*, *NRAS* und *v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1* (*RAF1*) gefunden (Abb. 3). Derzeit existieren mehrere mögliche Erklärungen, über welchen molekularen Mechanismus die Noonan-Syndrom assoziierten Mutationen in *KRAS* und *NRAS* die Aktivität der jeweiligen Proteine steigern: Eine These besagt, dass als Folge der Mutationen die GAP-stimulierte GTPase-Aktivität der RAS-Proteine beeinträchtigt ist. Eine zweite Erklärung geht zusätzlich noch von einer mutationsbedingt erniedrigten intrinsischen GTPase-Aktivität aus. Andere sehen in einer mutationsbedingt geänderten



**Abb.3: Das Noonan-Syndrom wird durch Mutationen in unterschiedlichen Genen verursacht**

Prozentuale Verteilung der betroffenen Gene, basierend auf Untersuchungen bei Individuen mit Noonan-Syndrom. In ca. 17 Prozent der Fälle ist die Krankheitsursache noch unbekannt [Mautner et al., 2010, Tartaglia et al., 2010].

Dissoziationsrate von Guanin-Nukleotiden einen Grund für die gesteigerte Aktivität [Gremer et al., 2011, Schubbert et al., 2007, Schubbert et al., 2006, Tartaglia et al., 2010]. Wie die bisher gefundenen Mutationen in *RAF1* zu einer Funktionssteigerung und somit erhöhtem *Downstream-Signaling* führen, ist noch nicht zufriedenstellend geklärt. Ein Erklärungsansatz besagt, dass einige der Mutationen vermutlich eine Interaktion mit dem Adaptorprotein 14-3-3 beeinträchtigen, durch welche normalerweise eine Autoinhibierung des RAF1-Proteins stabilisiert wird [Pandit et al., 2007, Tartaglia et al., 2010]. Schließlich wurde vor kurzer Zeit eine bestimmte Mutation in *soc-2 suppressor of clear homolog (C. elegans) (SHOC2)* aufgedeckt, welche eine unterscheidbare Subform des Noonan-Syndroms verursacht (*Noonan syndrome with loose anagen hair*) [Cordeddu et al., 2009]. SHOC2 führt zu einer Translokation von Protein-Phosphatase 1 an die Plasmamembran, welche daraufhin fördernd auf die RAF1-Aktivität wirkt [Rodriguez-Viciano et al., 2006]. Die durch die wiederkehrende Mutation verursachte N-Myristoylierung von SHOC2 verankert das Protein an der Plasmamembran, was indirekt eine vermehrte Aktivierung von RAF1 zur Konsequenz hat. Es resultiert ein erhöhter Signalfluss [Cordeddu et al., 2009]. Interessanterweise sind Mutationen in den unterschiedlichen Genen mit unterschiedlichen Phänotypen assoziiert [Mautner et al., 2010, Tartaglia et al., 2005]. So wird zum Beispiel bei Patienten mit *PTPN11*-Mutation häufig eine Pulmonalstenose, hingegen bei Patienten mit *RAF1*-Mutation gehäuft eine hypertrophe Kardiomyopathie festgestellt [Pandit et al., 2007, Tartaglia et al., 2001].

### I. 3 ***CBL* als neues Krankheitsgen für eine Noonan-Syndrom-ähnliche Erkrankung**

Wie bereits erwähnt werden zwar beim Großteil der Patienten mit Noonan-Syndrom ursächliche Mutationen identifiziert, bei ca. 17% der Fälle findet man jedoch keine Mutation in den bekannten Krankheitsgenen (vgl. Abb. 3). Kürzlich berichteten Martinelli und Mitarbeiter [2010], dass Keimbahnmutationen im *CBL*-Gen ein Krankheitsbild verursachen, das mit dem des Noonan-Syndroms überlappt [Martinelli et al., 2010]. Diese Entdeckung kam durch ein *CBL*-Screening bei 365 mutationsnegativen Patienten mit Noonan-Syndrom bzw. einem zum Noonan-Syndrom ähnlichen Krankheitsbild zustande, wobei vier Individuen eine heterozygote Missense-Mutation (c.1100A>C/p.Q367P, c.1144A>G/p.K382E, c.1168G>T/p.D390Y, c.1259G>A/p.R420Q) in *CBL* aufwiesen. Das äußere Erscheinungsbild dieser Patienten ist in Abb. 4 gezeigt. Die Betroffenen zeigen Noonan-Syndrom



**Abb. 4: Fotografien von vier Patienten mit Noonan-Syndrom ähnlichem Krankheitsbild**

Abgebildet sind vier Personen, bei denen im Rahmen eines *CBL*-Screenings Missense-Mutationen in *CBL* festgestellt wurden. Die Faziemorphie ist fast unauffällig (a) oder aber klassisch wie beim Noonan-Syndrom (b). Gut zu erkennen sind insbesondere folgende Noonan-Syndrom typische Merkmale: breite Nasenwurzel (c,d), tief ansetzende, nach hinten rotierte Ohren (b,c), Ptosis (b,c), Hypertelorismus (b), Epikanthus (b,c), tiefer Haaransatz im Nacken (b), Pterygium colli (b).

**a:** c.1100A>C/p.Q367P, **b:** c.1144A>G/p.K382E, **c:** c.1168G>T/p.D390Y, **d:** c.1259G>A/p.R420Q

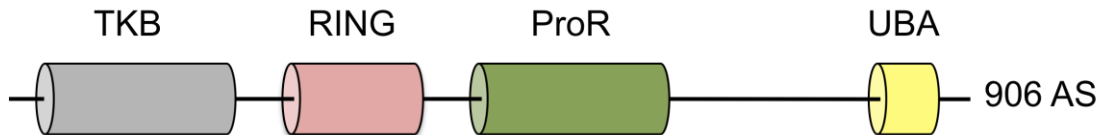
typische Merkmale, wie kongenitale Herzfehler, Kleinwuchs, hyperpigmentierte Hautareale oder tiefen Haaransatz im Nacken [Martinelli et al., 2010, Niemeyer et al., 2010, Perez et al., 2010].

*CBL* wurde in die Mutationsanalyse einbezogen, da es erstens an der Regulation des RAS-MAPK-Signalweges beteiligt ist (siehe unten) und zweitens *CBL*, wie auch andere Noonan-Syndrom assoziierte Gene, ein Protoonkogen darstellt.

## I. 4 Die zelluläre Funktion des CBL-Proteins

### I. 4.1 c-Cbl ist eine E3-Ubiquitin-Ligase

Die Familie der CBL-Proteine (*casitas B-lineage lymphoma*) umfasst drei Mitglieder: c-Cbl, Cbl-b und Cbl-c. In der vorliegenden Arbeit steht c-Cbl im Mittelpunkt. Das multivalente Adaptorprotein c-Cbl wird ubiquitär exprimiert und weist eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität auf [Thien et al., 2005]. In Abb. 5 ist die Proteindomänenstruktur von c-Cbl dargestellt. Am N-terminalen Ende von c-Cbl befindet sich eine Tyrosinkinase-Bindedomäne (TKB). Diese hochkonservierte Domäne ermöglicht dem Protein eine direkte spezifische Assoziation mit Proteinmotiven mit phosphorylierten Tyrosin-Resten [Thien et al., 2005]. Die hochkonservierte RING-Domäne birgt die intrinsische E3-Ligase-Aktivität und dient demnach der Übertragung von Ubiquitin-Molekülen auf Zielproteine. Über die Prolinreiche Region ist c-Cbl in der Lage, Adaptorproteine, wie zum Beispiel GRB2, zu binden. Über die Funktion der C-terminalen Ubiquitin-assoziierten-Domäne (UBA) ist noch nichts genaues bekannt. Verbunden werden die Domänen durch sogenannte Linker-Regionen [Schmidt et al., 2005].



**Abb. 5: Proteindomänen von c-Cbl**

Die funktionellen Proteindomänen sind als farbige Zylinder dargestellt. TKB, Tyrosinkinase-Bindedomäne; RING, RING-Domäne; ProR, Prolin-reiche Region; UBA, Ubiquitin-assoziierte Domäne, AS, Aminosäuren

Mittels E3-Ligase-Aktivität verknüpft c-Cbl Ubiquitine - kleine ubiquitär exprimierte globuläre Moleküle [Pickart et al., 2004] - kovalent und reversibel spezifisch an Zielproteine. Die Konsequenzen, die sich für das ubiquitylierte Zielprotein ergeben, sind von dem Muster der Ubiquitylierung abhängig. Werden zum Beispiel Ubiquitin-Moleküle in Form einer Kette an bestimmte Proteine ligiert (= Polyubiquitylierung), erfolgt ein Abbau über das Proteasom [Pickart et al., 2000]. Werden bestimmte Substrate jedoch einfach ubiquityliert (= Monoubiquitylierung), erfolgt ein lysosomaler Abbau [Miranda et al., 2007]. Über diese Mechanismen werden beispielsweise Signalwege reguliert [Garcia-Higuera et al., 2001], der Zellzyklus gesteuert [Schwab et al., 2001] oder die Transkription geregelt [Conaway et al., 2002]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Ubiquitin eine Interaktion zwischen gewissen Proteinen im Rahmen von DNA-Reparatur-Mechanismen ermöglicht [Hoege et al., 2002]. Eines der am besten analysierten Substrate von c-Cbl ist der EGFR.

#### **I. 4.2 c-Cbl reguliert durch Ubiquitylierung das Trafficking des EGF-Rezeptors**

Nach Stimulation mit EGF kann in den stimulierten Zellen ein Absinken der EGFR-Proteinmenge beobachtet werden [Levkowitz et al., 1998, Stoscheck et al., 1984]. Dabei geht man derzeit von folgendem mechanistischen Modell aus: Sobald EGFR nach Stimulation im dimerisierten und autophosphorylierten Zustand vorliegen, wird c-Cbl an diese Rezeptoren rekrutiert. Es kommt zu einer c-Cbl-vermittelten Ubiquitylierung der EGFR im cytoplasmatischen Bereich [Sorkin et al., 2008] und anschließend zur Endozytose (Internalisierung) der Rezeptoren. Ob c-Cbl bzw. die EGFR-Ubiquitylierung für die Internalisierung essentiell ist, wird kontrovers diskutiert; es gibt widersprüchliche Befunde [Huang et al., 2007, Jiang et al., 2003, Lill et al., 2000, Thien et al., 2001]. Die internalisierten, membranumschlossenen Vesikel, in denen sich die Rezeptoren nun befinden, verschmelzen größtenteils alsbald mit

frühen Endosomen, die sich zu multivesikulären Körpern (MVB) weiterentwickeln. Da die EGFR durch die Ubiquitin-Moleküle markiert sind, werden sie durch die ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-Maschinerie erkannt und in MVBs durch Invagination in intraluminale Vesikel eingeschlossen. Dadurch akkumulieren die Rezeptoren in diesen MVBs [Katzmann et al., 2002]. MVBs fusionieren sodann mit primären lysosomalen Vesikeln und werden fortan als Lysosomen bezeichnet. Mit Hilfe von proteolytischen Enzymen kommt es in den Lysosomen zu einer Degradierung der EGFR [Futter et al., 1996].

Da dieser zelluläre Prozess die Anzahl von EGFR in Zellen vermindert, bezeichnet man ihn als Rezeptor-Degradierung oder *receptor downregulation*. Es kann als negativer Feedback-Mechanismus auf den EGF-Stimulus verstanden werden, um die Stärke und Dauer einer EGF-Stimulation zu regulieren. Dass die Ubiquitin-Markierung des EGFR für die Rezeptor-Degradierung essentiell ist, konnten bereits diverse Studien belegen [Levkowitz et al., 1999, Levkowitz et al., 1998, Masson et al., 2006]. Demnach kann c-Cbl signifikant in EGFR-vermittelte Signalübertragung und -weiterleitung eingreifen. Entsprechend haben *in vitro* Experimente bereits früh gezeigt, dass mutationsbedingte Funktionseinschränkungen von c-Cbl gravierende Auswirkungen haben können: zum einen eine verminderte EGFR-Degradierung und Internalisierung [Jiang et al., 2003, Waterman et al., 1999] und zum anderen erhöhte Phosphorylierungsgrade und somit Aktivitätslevel von intrazellulären Signalproteinen [Martinelli et al., 2010, Niemeyer et al., 2010, Sargin et al., 2007].

## I. 5 Humanpathogene Mutationen in *CBL*

Zunächst war das pathogene Potential von Mutationen in *CBL* nur aufgrund eines Lymphoms in Mäusen bekannt [Andoniou et al., 1994, Langdon et al., 1989]. *In vitro* Versuchsreihen zeigten, dass die verursachende c-Cbl-Mutante (70Z-Cbl), in der Teile einer Linker- und der angrenzenden RING-Domäne deletiert sind, keine der EGF-Stimulation folgende Ubiquitylierung und Degradierung von EGFR bewirkte [Thien et al., 2001, Waterman et al., 1999]. In Folge wurde entdeckt, dass somatische Mutationen in *CBL* auch bei Menschen Erkrankungen hervorrufen. Mutationen in *CBL* werden häufig bei Patienten mit Leukämie, wie etwa der juvenilen myeloproliferativen Leukämie (JMML) oder der akuten myeloischen Leukämie, beschrieben. Darunter befindet sich interessanterweise auch eine Mutation in *CBL*, die als Keimbahnmutation aufgedeckt wurde (c.1259G>A/p.R420Q) [Caligiuri et al., 2007, Dunbar et al., 2008, Grand et al., 2009, Loh et al., 2009, Martinelli et al., 2010, Niemeyer et al., 2010, Perez et al., 2010, Sanada et al., 2009, Sargin et al., 2007].

Sowohl die Tumormutationen als auch die Keimbahnmutationen liegen meist in Exon 8 oder 9, die zusammen mit Exon 7 für die RING-Domäne in c-Cbl kodieren. Wie in Kapitel I.4.1 beschrieben, ermöglicht diese Proteindomäne die Ubiquitylierung von Substratproteinen [Schmidt et al., 2005]. Zusammenfassend nimmt man an, dass krankheitsassoziierte *CBL*-Mutationen über noch nicht hinreichend geklärte Mechanismen die *receptor downregulation* beeinträchtigen und auf diese Weise in einer EGF-Hypersensibilität und in einer deregulierten Signalweiterleitung über den RAS-MAPK-Weg resultieren [Flotho et al., 2007, Loh et al., 2009, Niemeyer et al., 2010, Sanada et al., 2009].

## I. 6            **Arbeitshypothese und Fragestellung**

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand in der Suche nach Mutationen im *CBL*-Gen bei mutationsnegativen Patienten mit Noonan-Syndrom oder einem ähnlichen Krankheitsbild. Dazu standen drei Patientenkollektive zur Verfügung. Zwei davon beinhalten klinisch gut charakterisierte Patienten mit Verdacht auf Noonan-Syndrom, das dritte Kollektiv umfasst Patienten mit Verdacht auf Noonan-Syndrom oder einem zum Noonan-Syndrom ähnlichen klinischen Bild. Da alle bereits bekannten, Noonan-Syndrom assoziierten Mutationen die RING-Domäne bzw. eine angrenzende Linker-Region von c-Cbl betreffen [Martinelli et al., 2010, Niemeyer et al., 2010, Perez et al., 2010], sollten nur die Exons 7, 8 und 9, die für diese Proteindomänen kodieren, auf das Vorliegen von Mutationen hin analysiert werden.

Das zweite Ziel war die Aufklärung der funktionellen Auswirkungen der bereits bekannten Noonan-Syndrom assoziierten *CBL*-Mutationen c.1144A>G/p.K382E, c.1168G>T/p.D390Y und c.1259G>A/p.R420Q auf die EGFR-Regulation. Hierfür sollten mithilfe PCR-vermittelter Mutagenese entsprechende cDNA-Konstrukte kloniert und diese in COS-7-Zellen transient exprimiert werden. Das EGF-Rezeptor Trafficking sollte daraufhin mithilfe von Rezeptor-Biotinylierungsassays in diesen Zellen untersucht werden. Diese Methode erlaubt durch Markierung spezifischer EGFR-Fraktionen zu gewählten Zeitpunkten nach EGF-Stimulation eine Analyse der EGFR-Internalisierung und des anschließenden intrazellulären EGFR Traffickings. Der Vorgang der EGFR-Degradierung in diesen Zellen sollte durch Quantifizierung der Gesamt-EGFR-Menge im Verlauf einer mehrere Stunden dauernden EGF-Stimulation untersucht werden.

## II Material & Methoden

### II. 1 Chemikalien, Zusätze und Lösungsmittel

Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA 30%; 37,5:1)	Biorad (München)
Agar (Select)	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumacetat ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ )	Merck (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ampicillin-Natriumsalz ( $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}\cdot\text{Na}$ )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Biorad (München)
Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	Merck (Darmstadt)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Merck (Darmstadt)
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim)
Cycloheximide solution	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
D(+)-Glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	Merck (Darmstadt)
Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck (Darmstadt)
Epidermal Growth Factor (EGF), human	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	Merck (Darmstadt)
Ethylendinitrietetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )	J.T. Baker (Griesheim)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Scientific (Bonn)
EZview™ Red Streptavidin Affinity Gel	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ )	Roth (Karlsruhe)
Glycin ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ )	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ )	Fluka (Neu-Ulm)
Kaliumacetat (KAc; $\text{KCH}_3\text{COO}$ )	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kanamycinsulfat ( $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{11}\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Fluka (Neu-Ulm)
L-Glutathion, reduziert ( $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lipofectamin™2000 Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2$ )	Merck (Darmstadt)
Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker (Griesheim)
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Natriumsalz-Desoxycholsäure (DOC, $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$ )	Roth (Karlsruhe)
Natriumtetraborat (Borax; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
N-Ethylmaleimide ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2$ )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED; $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$ )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Orange-G	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trizma® Base (Tris; $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Wasser für Chromatographie (HPLC)	Merck (Darmstadt)



## II. 2 Kits, Enzyme, Nukleotide, Standards

BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Immobilon <sup>TM</sup> Western	Millipore (Schwalbach)
JetQuick PCR Product Purification Spin Kit	Genomed (Löhne)
NucleoBond® Xtra Maxi	Macherey/Nagel (Düren)
pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO® Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Restore <sup>TM</sup> Western-Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific (Bonn)
ExoSAP-IT	USB Corporation (Cleveland, OH, USA)
Illustra <sup>TM</sup> GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit	GE Healthcare (Bedford, UK)

Gateway® LR Clonase <sup>TM</sup> Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
PfuULTRA <sup>TM</sup> HF DNA Polymerase	Stratagene (Waldbronn)
Restriktionsendonukleasen	Promega (Mannheim), NEB (Frankfurt a. Main), Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq DNA Polymerase	Finzymes

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 pmol/µl	Invitrogen (Karlsruhe)
-------------------------------------------	------------------------

DNA-Standard Fast-Ruler <sup>TM</sup>	Fermentas (St. Leon-Rot)
PageRuler <sup>TM</sup> Plus Prestained Protein	Fermentas (St. Leon-Rot)
100 Bp DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
1 Kb DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)

## II. 3 Medien und Zusätze

Medien und Zusätze für die Anzucht und Kultivierung von Bakterien

LB-Medium (lysogeny broth)	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Natriumchlorid
	ad 1000 ml	Aqua dest.
	pH	7,0

Agar für Festmedien		LB-Medium
	+ 15 g/l	Agar

Ampicillin	1 ml pro 1000 ml von Stocklösung (250 mg/ml in Aqua)
Kanamycin	1 ml pro 1000 ml von Stocklösung (25 mg/ml in Aqua)

SOC-Medium	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,5 g	Natriumchlorid
	ad 970 ml	Aqua dest.
	10 ml	steril filtriertes 1M MgSO <sub>4</sub>
	10 ml	steril filtriertes 1M MgCl <sub>2</sub>
	10 ml	steril filtrierte 40% Glucose

Medien und Zusätze für die Zellkultivierung

Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium (D-MEM) mit L-Glutamin	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Opti-MEM® I serumreduziertes Medium mit GlutaMAX™ I	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Fötales Rinderserum (FBS)	PAA Laboratories (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml / 100 mg/ml)	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

## II. 4 Puffer und Lösungen

### II. 4.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

#### PCR-Puffer

F-101 10x Buffer for <i>Taq</i> DNA Polymerase		MgCl <sub>2</sub>
Finnzymes		Tris-Cl
		KCl
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
		pH 8,7

10x PfuUltra™ HF Reaction Buffer	100 mM	KCl
Stratagene	20 mM	MgSO <sub>4</sub>
	100 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	200 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	1%	Triton® X-100 (v/v)
	1 mg/ml	nukleasefreies BSA

#### Sequenzier-Puffer

BigDye® Terminator 5x Sequencing Buffer		
-----------------------------------------	--	--

#### Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

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

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

Lösung I	50 mM	Glucose
	25 mM	Tris-HCl, pH 8
	10 mM	EDTA
Lösung II	0,2 N	NaOH
	1%	SDS (w/v)
Lösung III	4 M	KAc, pH 5,5
	2 M	Essigsäure
1x TE-Puffer	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	pH	7,5
TE/RNase-Puffer	100 µl/ml	RNase A in 1xTE-Puffer

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

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

II. 4.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten

Zelllyse

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

SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

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

Western-Blot

Transferpuffer	150 mM	Glycin
	25 mM	Tris
	10 %	Methanol (v/v)
	pH	8,3
10x PBST	4 g	KCl
	4,8 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	160 g	NaCl
	28,8 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	20 ml	Tween 20
	ad 2000 ml	Aqua dest.
	pH	7,2
10x TBST	1,5 M	NaCl
	200 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	1%	Tween 20 (v/v)
Antikörperlösung:		für Antikörper von:
1x TBST mit 0,4% Milchpulver (TBSTM)		Abcam (Cambridge, UK) GE Healthcare (Freiburg) Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
1x PBST mit 5% Milchpulver (PBSTM)		GE Healthcare (Freiburg) Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

## II. 4.3 Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten

### Zellkultur

10x PBS-/-	2 g	KCl
	2,4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	80 g	NaCl
	14,4 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	ad 1000 ml	Aqua dest.

### Biotinylierungsassays

1x PBS+/-	0,9 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,52 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,16 mM	MgSO <sub>4</sub>
	in	1x PBS-/-

HBSS	1,3 mM	CaCl <sub>2</sub>
	5,6 mM	Glucose
	5,4 mM	KCl
	0,4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,6 mM	MgSO <sub>4</sub>
	137 mM	NaCl
	4,2 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	0,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	pH	7,4

Wasch-HBSS	5 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	in	HBSS

Glutathion-Puffer	1 mM	EDTA
	50 mM	Glutathion
	75 mM	NaCl
	frisch dazu:	10% FBS (v/v)
	frisch dazu:	75 mM NaOH

## II. 5 Bakterienstämme und Zelllinie

	Name	Eigenschaften/Zelltyp	Herkunft
Bakterienstämme	<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 deoR recA1</i> <i>endA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU galK</i> $\lambda$ - <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
	<i>E. coli</i> TOP10	F- $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara,</i> <i>leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Zelllinie	COS-7	Adhärente Fibroblasten aus Nieren der Grünen Meerkatze	DSMZ (Braunschweig)

**Tab. 2: Verwendete Bakterienstämme und Zelllinie**

Angegeben sind jeweils der Name, die genetischen Eigenschaften bzw. der Zelltyp und die Herkunft. (DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

## II. 6 Vektoren und Expressionskonstrukte

### II. 6.1 Zur Verfügung gestellte Konstrukte

Name des Konstrukts	Name des Inserts (Genbank Eintragsnummer)	kodierte Amino- säuren	Herkunft
pcDNA3-DEST-c-Cbl	Wildtyp- <i>c-Cbl</i> (NM_005188.2)	1-906	AG Rosenberger
pcDNA3-DEST-c-CblC381A	<i>c-Cbl</i> mit Mutation C381A	1-906	AG Rosenberger

**Tab. 3: Vorliegende Konstrukte für die eukaryotische Expression**

Es sind jeweils der Name des Konstrukts, der Name des Inserts mit Genbank-Eintragsnummer, der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz sowie die Herkunft des Konstrukts angegeben.

### II. 6.2 Ausgangsvektoren für die Herstellung neuer Konstrukte

Zur Subklonierung verwendetes Konstrukt

Name des Konstrukts	Name des Inserts (Genbank Eintragsnummer)	kodierte Amino- säuren	Herkunft
pRK5-c-Cbl	Wildtyp- <i>c-Cbl</i> (NM_005188.2)	1-906	M. Schmidt, Frankfurt a. Main

**Tab. 4: Darstellung des bereits vorhandenen Konstrukts zur Herstellung neuer Konstrukte**

Angegeben ist der Name des Konstrukts, der Name des Inserts mit Genbank-Eintragsnummer, der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz sowie die Herkunft des Konstrukts.

Zielvektor für Klonierungen

	Name	Eigenschaften	Herkunft
<b>Gateway™-Vektoren</b>	pENTR/D-TOPO	Km <sup>r</sup>	Invitrogen (Karlsruhe)
	pcDNA3native-DEST	Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , ccdB	AG Kutsche, UKE, Hamburg

**Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Vektoren zur Herstellung neuer Konstrukte**

Es sind jeweils der Name des Vektors, die Eigenschaften und die Herkunft angegeben.

**II. 6.3 Hergestellte Konstrukte**

Mittels Topoisomerase-Reaktion hergestellte Gateway-Eingangskonstrukte

Name des Konstrukts	Herstellung			kodierte Aminosäuren
	Oligonukleotide	Template	Methode	
pENTR/D-TOPO-c-CblK382E	c-Cbl/pET/for c-CblK382E_rev c-CblK382E_for c-Cbl/pET/rev	pRK5-c-Cbl	PCR-vermittelte Mutagenese + Topoisomerase-Reaktion	1-906
pENTR/D-TOPO-c-CblD390Y	c-Cbl/pET/for c-Cbl_D390Y_rev c-Cbl_D390Y_for c-Cbl/pET/rev	pRK5-c-Cbl	PCR-vermittelte Mutagenese + Topoisomerase-Reaktion	1-906
pENTR/D-TOPO-c-CblR420Q	c-Cbl/pET/for c-Cbl_R420Q_rev c-Cbl_R420Q_for c-Cbl/pET/rev	pRK5-c-Cbl	PCR-vermittelte Mutagenese + Topoisomerase-Reaktion	1-906

**Tab. 6: Übersicht über die mit Hilfe einer Topoisomerase-Reaktion hergestellten Eingangsvektoren für die Gateway-Technologie**

Angegeben sind die Namen der Konstrukte, die für die PCR verwendeten Oligonukleotide und Templates, die Methodik der Herstellung der Konstrukte und der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz.

Mittels Gateway™-Technologie hergestellte Zielkonstrukte für die eukaryotische Expression

Name des Konstrukts	Herstellung	kodierte Aminosäuren
pcDNA3-DEST-c-CblK382E	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-c-CblK382E	1-906
pcDNA3-DEST-c-CblD390Y	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-c-CblD390Y	1-906
pcDNA3-DEST-c-CblR420Q	Rekombination aus pENTR/D-TOPO-c-CblR420Q	1-906

**Tab. 7: Übersicht über die mit Hilfe der Gateway™-Technologie hergestellten Konstrukte**

Es sind der Name der Konstrukte, die Methodik der Herstellung und der Umfang der vom Insert kodierten Proteinsequenz angegeben.

## II. 7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden, sofern nicht schon vorhanden, manuell entworfen und von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Vor der Verwendung wurden die entsalzten, lyophilisierten Oligonukleotide mit 1x TE auf eine Stocklösung mit einer Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Die Gebrauchslösungen der verwendeten Oligonukleotide entstanden durch eine 1:10-Verdünnung der Stocklösung mit Aqua bidest.

### II. 7.1 Oligonukleotide für Klonierungen

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Herkunft
c-Cbl/pET/for	CACCATGGCCGGCAACGTGAAGAAGAGCTC	AG Rosenberger
c-Cbl/pET/rev	CTAGGTAGCTACATGGGCAGGAGAAG	AG Rosenberger
c-CblK382E_for	CCACATTCCAACACTATGTGAAATATGTGCTGAAAATG	diese Arbeit
c-CblK382E_rev	CATTTTCAGCACATATTTTCACATAGTTGGAATGTGG	diese Arbeit
c-CblD390Y_for	GTGCTGAAAATGATAAGTATGTAAGATTGAGCCCTG	diese Arbeit
c-CblD390Y_rev	CAGGGCTCAATCTTTACATACTTATCATTTCAGCAC	diese Arbeit
c-CblR420Q_for	AGGGCTGTCCTTTCTGCCAATGTGAAATTAAGGT	diese Arbeit
c-CblR420Q_rev	ACCTTTAATTTACATTGGCAGAAAGGACAGCCCT	diese Arbeit

Tab. 8: Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen im Rahmen der PCR-vermittelten Mutagenese

### II. 7.2 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Herkunft
CBL_Ex 7F	AGAATGGAGAACTCCCAGATTCC	AG Kutsche
CBL_Ex 8R	AAGCCAGGCCACCCCTTGTATCAG	AG Kutsche
CBL_Ex 9F	GATGGGCTCCACATTCCAACACTATG	AG Kutsche
CBL_Ex 9R	GTAGTATGTACTCATAGGGCTGTAG	AG Kutsche

Tab. 9: Verwendete Oligonukleotide im Rahmen des CBL-Screenings



Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Herkunft
M13 uni	GTAAAACGACGGCCAGT	AG Kutsche, Hamburg
cDNAT7	TAATACGACTCACTATAGGG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_1for	CGTACTATCTTGTCAAGATATGAGG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_2for	GCTTTCGACAGGCTCTACATGAAG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_2rev	CGTCCTTCATGAGCCCAATCAGG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_3for	GTTACTGCTGATGGGAACATTCTCC	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_4for	CAGGGCTGTCCTTTCTGCCGATGTG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_5for	GCTGCTTCTGGCTCCCTTCATAAAG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_6for	ACCAGATGTGCCTAGGCTCGGAGC	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_7for	ATCTATCACCGAGAGCAGCACCTTTGG	AG Kutsche, Hamburg
Cbl_8for	GCTGTCAGCAAGGTAGTGGTCCTG	AG Kutsche, Hamburg

**Tab. 10: Verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen im Rahmen der PCR-vermittelten Mutagenese**

## II. 8 Antikörper

### II. 8.1 Primärantikörper

Antikörper	Antigen	hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
anti-c-Cbl (C-15)	humanes c-Cbl	Kaninchen	WB 1:400	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-EGFR (1005)	humanes EGFR	Kaninchen	WB 1:300	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-GAPDH	Kaninchen Muskel-GAPDH	Maus	WB 1:10000	Abcam (Cambridge, UK)
anti- $\alpha$ -Tubulin	humanes $\alpha$ -Tubulin	Maus	WB 1:10000	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

**Tab. 11: Übersicht über in dieser Arbeit verwendete Primärantikörper**

Es sind jeweils der Name des Primärantikörpers, das erkannte Antigen, der Wirtsorganismus für die Herstellung des Antikörpers und dessen Hersteller bzw. Vertriebsfirma angegeben. Außerdem ist die jeweilige Verdünnung des Antikörpers für die Anwendung im Western-Blot (WB) angegeben.

## II. 8.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Antigen	Konjugat	hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
ECL™ Esel-anti-Kaninchen-HRP	Kaninchen Immunglobulin G	Meerrettich-Peroxidase	Esel	WB 1:25000	GE Healthcare (Freiburg)
ECL™ Schaf-anti-Maus-HRP	Maus Immunglobulin G	Meerrettich-Peroxidase	Schaf	WB 1:10000	GE Healthcare (Freiburg)

**Tab.12: Übersicht über in dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper**

Angegeben sind die Namen der verwendeten Antikörper, die Antigene, die Antikörperkonjugate, die Wirtsorganismen und die Hersteller der Antikörper. Die in dieser Arbeit eingesetzten Verdünnungen für Western-Blot (WB) sind ebenfalls angegeben.

## II. 9 Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien

100 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Sarstedt (Nürnberg)
Agarplatten	Greiner (Essen)
Autoklav	Tecnomara (Fernwald)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
CO <sub>2</sub> Water-Jacketed Inkubator	Nuaire™ US AUTOFLOW (USA)
Digitalkamera	OLYMPUS (Hamburg)
Drucker <i>Digital Graphic Printer</i>	SONY (Japan)
Filmentwickler <i>OPTIMAX X-Ray Film Processor</i>	Protec® (Oberstenfeld-Gronau)
Gelelektrophoresekammer	BioRad (München)
Heizblock <i>Dri-Block</i>	Techne (USA)
Inkubationsschüttler <i>Multitron</i>	Infors (Schweiz)
Kühlzentrifuge <i>5417R</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
Kunststoff-Tubes (Falcon)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Magnetrührer <i>RET basic</i>	IKA Labortechnik (Staufen i. Br.)
PCR-Cycler <i>PTC 200</i>	MJ Research, Inc. (USA)
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik GmbH (Oldenburg)
Photometer <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten <i>Finnpipetten</i>	Thermo Labsystems (Mannheim)
Röntgenfilme ( <i>Cronex 5</i> )	Agfa (Berlin)
Semi-Dry <i>Fastblot B34</i>	Biometra (Göttingen)
Semi-Dry Elektroblotter <i>PerfectBlue</i>	Peqlab (Erlangen)
Sequenzierer <i>ABI Prism® 3500 Genetic Analyzer</i>	Applied Biosystems
Spannungsgeber <i>Power Pac 300</i>	BioRad (München)
Spannungsgeber <i>Electrophoresis power supply ST305</i>	Life Technologies (Karlsruhe)
Spannungsgeber <i>Electrophoresis power supply PS3002</i>	Life Technologies (Karlsruhe)
Spannungsgeber <i>Standard Power Pack P25</i>	Biometra (Göttingen)
Sterilwerkbank <i>HERA safe Typ 12/2, 1995</i>	Heraeus (Hanau)
Sterilwerkbank <i>Lamin Air Instruments</i>	Heraeus (Hanau)
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge <i>Biofuge Pico</i>	Heraeus (Hanau)
UV-Transilluminator	Bachofer (Reutlingen)
Vortex-Gerät <i>Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000</i>	Scientific Industries, INC. (USA)
Waage <i>Scout Pro</i>	Ohaus (Schweiz)
Wasserbad <i>GFL 1083</i>	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge <i>Megafuge 1.0</i>	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge <i>Labofuge GL</i>	Heraeus (Hanau)

## II. 10 Datenbanken und Software

### II. 10.1 Datenbanken

Name/Adresse	Daten
<b>NCBI</b> (National Center for Biotechnology Information)  <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Genom-Sequenzen, physikalische Darstellung der Organisation des Genoms, SNP-Datenbank
<b>Ensembl</b> (The European Bioinformatics Institute and Genome Research)  <a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>	Genom-Sequenzen, physikalische Darstellung der Organisation des Genoms, SNP-Datenbank

Tab. 10: Verzeichnis der verwendeten Datenbanken

### II. 10.2 Software

Software	Verwendung
<b>Sequence Pilot</b> (JSI GmbH, Medical Systems)	Auswertung von DNA-Sequenzelektropherogrammen.
<b>EditSeq</b> (Dnastar)	Editieren von DNA-Sequenzen
<b>SeqMan</b> (Dnastar)	Homologievergleiche multipler Sequenzen
<b>MapDraw</b> (Dnastar)	Ermittlung von Restriktionsschnittstellen in DNA-Sequenzen sowie Ermittlung der abgeleiteten Aminosäuresequenz einer cDNA-Sequenz
<b>Chromas</b> (Technelysium Pty Ltd)	Editieren von DNA-Sequenzchromatogrammen

Tab. 11: In dieser Arbeit verwendete Software

## II. 11 Molekularbiologische Methoden

### II. 11.1 Amplifikation von genomischer DNA

Um im Zuge der Mutationsanalyse die zu untersuchende DNA in ausreichender Menge verfügbar zu haben, wurde ggf. vor der PCR eine „whole genome amplification“ (WGA)-Reaktion mit dem *Illustra™ GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit* nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Schritte der WGA-Reaktion wurden im *PTC-200 Thermocycler* durchgeführt:

Reagenzien	Thermocycler-Programm
<u>WGA-Reaktion Ansatz</u> 1 µl DNA 9 µl „Sample Puffer“	1. 95°C / 3 min 2. 4°C / bis zum nächsten Schritt
<u>Zugabe von (auf Eis):</u> 9 µl „Reaction Buffer“ 1 µl <i>Enzyme Mix</i> (vorher vermischt)	1. 30°C / 90 min 2. 65°C / 10 min 3. 4°C / bis zur PCR

Die hierdurch vervielfältigte DNA fand daraufhin Eingang in die nachfolgend beschriebene PCR.

## II. 11.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR – *polymerase chain reaction*) dient der spezifischen *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten unter der Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der zyklischen Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts, der von zwei Oligonukleotiden (Primern) flankiert wird. In dieser Arbeit wurde die PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten (u.a. beim *CBL*-Screening), sowie zur Erzeugung von Punktmutationen in DNA-Konstrukten verwendet. Dabei wurden in der Regel 2-10 ng Template-DNA, je 10 pmol eines 5'- und 3'-Primers sowie 0,1 µl bis 0,2 µl (1-5 U) Polymerase eingesetzt und diese mit 10x PCR Puffer, Desoxynukleotiden (2,5 mM je Nukleotid) und Aqua bidest auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl gebracht.

Nach der Denaturierung des PCR-Ansatzes wurden Zyklen aus Denaturierung, Anlagerung der Primer (*annealing*) und Polymerisation (*elongation*) durchlaufen. Die Anlagerungstemperatur der Primer richtet sich dabei nach der Schmelztemperatur der vorliegenden Oligonukleotide und die Dauer der Elongation nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Templates, wobei DNA-Polymerasen 500 – 1000 Bp pro Minute polymerisieren können. Die optimalen PCR-Bedingungen für das *CBL*-Screening wurden an Kontroll-DNAs etabliert. Die genauen Einzelheiten werden im Folgenden beschrieben.

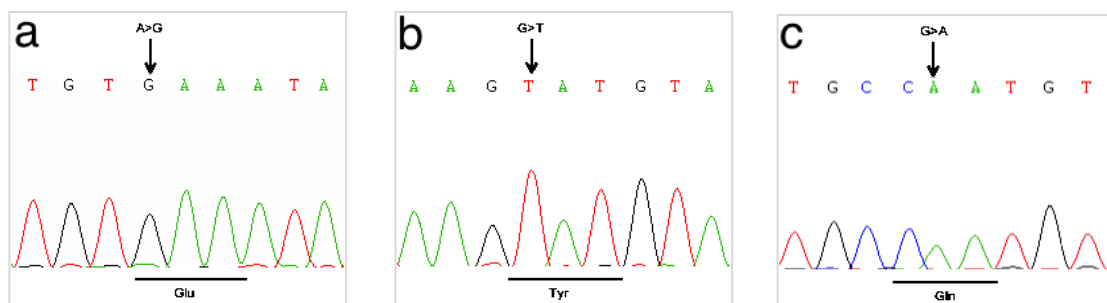
Reagenzien	Thermocycler-Programm
<u>PCR-Ansatz</u>	<u>TD-56</u>
1,0 µl DNA (ca. 100 ng/µl)	1. 95°C / 2 min.
2,5 µl 10x PCR-Buffer	2. 95°C / 20 sek.
1,0 µl Primer For (10 µM)	3. 56°C / 10 sek.
1,0 µl Primer Rev (10 µM)	4. 72°C / 1 min.
0,5 µl dNTPs	5. go to 2, 3 times
0,1 µl DNA-Polymerase (5 U/µl)	6. 95°C / 20 sek.
18,9 µl HPLC-H <sub>2</sub> O	7. 54°C / 10 sek.
	8. 72°C / 1 min.
25,0 µl Gesamtvolumen	9. go to 6, 3 times
	10. 95°C / 20 sek.
	11. 52°C / 10 sek.
	12. 72°C / 1 min.
	13. go to 10., 29 times
	14. 72°C / 3 min.
	15. end

### II. 11.3 PCR-vermittelte Mutagenese

Das gezielte Einführen von Punktmutationen in DNA-Sequenzen wurde durch PCR-vermittelte Mutagenese erreicht [Ito et al., 1991]. Zunächst wurden zwei überlappende DNA-Fragmente in zwei getrennten PCR-Reaktionen mit spezifischen Oligonukleotiden, die die Basenaustausche aufwiesen, generiert. Dabei wurde, wie auch in den nachfolgenden Klonierungen, eine DNA-Polymerasen mit 3'→5'-Exonuklease-Aktivität und somit Korrektüreigenschaft (*proofreading*) verwendet. Die beiden erzeugten PCR-Produkte enthielten nunmehr die gewünschte Mutation und wurden sodann nach Aufreinigung in einer weiteren PCR (*Megaprime-PCR*) als Template eingesetzt. Jeweils 1 µl einer 1:10-Verdünnung der beiden PCR-Produkte sowie Puffer, dNTPs und Polymerase wurden in den Reaktionsansatz gegeben und einem Drei-Zyklus-Programm unterworfen (Programm 1). Danach folgte die Zugabe der 5'- und 3'-Primer und das Durchlaufen von 19 weiteren Zyklen mit dem Ziel das Gesamtfragment zu amplifizieren (Programm 2). Das Produkt enthielt nun eine der gewünschten Punktmutationen (c.1144A>G, c.1168G>T, c.1259G>A) und wurde mit Hilfe der TOPO® Cloning-Technologie in den Vektor pENTR/D-TOPO (Invitrogen) überführt. Zur Überprüfung der Integrität der PCR-Produkte wurde die Plasmid-DNA sequenziert.

Reagenzien	Thermocycler-Programm
<u>PCR-Ansatz</u> 3,0 µl DNA-template 2,5 µl 10x PfuUltra PCR-Puffer 1,0 µl Primer For (10 µM) 1,0 µl Primer Rev (10 µM) 0,5 µl dNTPs 0,2 µl PfuULTRA™ HF DNA Polymerase (5 U/µl) 16,8 µl HPLC-H <sub>2</sub> O  25,0 µl Gesamtvolumen	<u>PCR-50 (Megaprime-PCR)</u> 1. 95°C / 2 min. 2. 95°C / 20 s 3. 50°C / 10 s 4. 72°C / 3 min. 5. Go to 2, 33 times 6. 72°C / 3 min. 7. end
<u>Megaprime PCR-Ansatz</u> 1 µl PCR Produkt 1 → 1:10-Verdünnung 1 µl PCR Produkt 2 → 1:10-Verdünnung 0,5 µl dNTP's 2,5 µl 10x PCR-Puffer 0,2 µl Polymerase ad 25 µl Aqua bidest.	<u>Programm 1</u> 1. 95°C / 3 min 2. 95°C / 15 s 3. 40°C / 20 s 4. 72°C / 3-5 min 5. go to 2 / 2 times 6. end
<u>Zugabe der Primer</u> (direkt in PCR Reaktion) +1 µl Primer 1 (10 pmol/µl) +1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)	<u>Programm 2</u> 1. 95°C / 3 min 2. 95°C / 15 s 3. 55°C / 10 s 4. 72°C / 4 min 5. go to 2 / 19 times 6. 72°C / 10 min 7. end

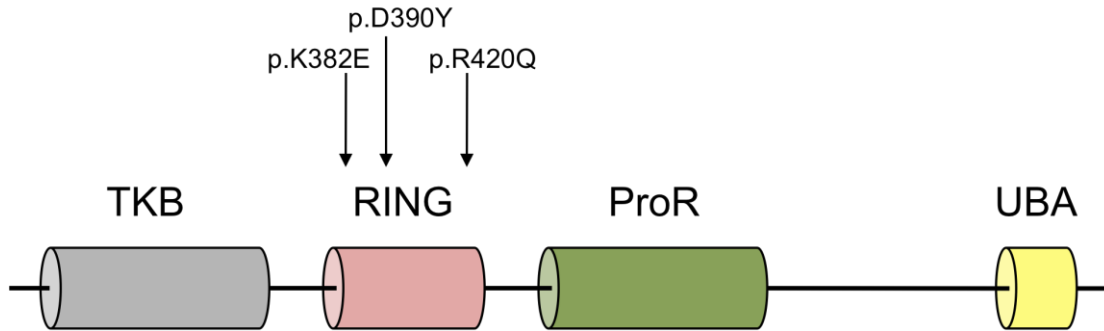
Mithilfe der PCR-vermittelten Mutagenese konnten auf cDNA-Ebene Konstrukte mit den in der Einleitung vorgestellten humanpathogenen *CBL*-Mutationen (c.1144A>G, c.1168G>T, c.1259G>A) nachgebaut werden. Die eingefügten Mutationen wurden zur Kontrolle mittels DNA-Sequenzierung nachgewiesen (Abb. 6). In Proteinen exprimiert resultieren die o.g. Mutationen in den drei Aminosäureaustauschen p.K382E, p.D390Y, p.R420Q in c-Cbl (Abb. 7).



**Abb. 6: Ausschnitte aus den Sequenzchromatogrammen der drei hergestellten *CBL*-Konstrukte**

Dargestellt ist jeweils derjenige Abschnitt der *CBL*-Sequenz, in dem der erfolgreiche Basenaustausch ersichtlich ist. Die ursprüngliche Base an der jeweiligen Position ist direkt über dem Pfeil benannt. Die Aminosäure, die durch die Basenabfolge kodiert wird, ist jeweils im unteren Bildabschnitt genannt. Die vier Basen sind jeweils durch eine andere Farbe dargestellt (A grün, T rot, C blau und G schwarz) und jeder Peak repräsentiert eine Base der Sequenz.

a: c.1144A>G, b: c.1168G>T, c: 1259G>A



**Abb. 7: Proteindomänen von c-Cbl und die Position der Aminosäuresubstitutionen**

Die in Abb. 6 geschilderten Mutationen verursachen Aminosäureaustausche, die sich in der RING-Domäne von c-Cbl befinden. TKB, Tyrosinkinase-Bindedomäne; RING, Ring-Domäne; ProR, Prolinreiche Region; UBA = Ubiquitin-assoziierte Domäne

## II. 11.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Bevor die beim *CBL*-Screening erzeugten PCR-Produkte der DNA-Sequenzierung zugeführt wurden, erfolgte die Aufreinigung mit dem Enzymmix *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> der Firma USB. Dieser Mix, bestehend aus der Exonuklease I und der Shrimp Alkali-Phosphatase, dient dem Entfernen von einzelsträngiger DNA (Primern).

Reagenzien	Thermocycler-Programm
<u>ExoSAP-Ansatz:</u> 1 µl PCR-Produkt 1 µl ExoSAP-IT 5 µl HPLC-H <sub>2</sub> O 7 µl Gesamtvolumen	1. 37°C / 15 min. 2. 80°C / 15 min. 3. end

Die im Rahmen der PCR-vermittelten Mutagenese erzeugten Produkte wurden jeweils vor und nach der Megaprime-PCR mithilfe des *Jetquick PCR Product Purification Spin Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt. Diese Maßnahme entfernt störende Oligonukleotide, kleinere DNA-Fragmente und Enzymreste aus den PCR-Ansätzen.

## II. 11.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Darstellung von PCR-Produkten und der Auftrennung fragmentierter DNA bei der Restriktionsanalyse. Die Laufstrecke eines Fragments im Agarosegel, das je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente einen Agarosegehalt von 0,8% - 2% (w/v) aufweist, ist dem Logarithmus seines

Molekulargewichts umgekehrt proportional, d.h. kleinere Fragmente wandern schneller durch die Gelporen als größere. Da DNA aufgrund von Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat eine negative Gesamtladung aufweist, wandert DNA in einem angelegten elektrischen Feld von der Kathode zur Anode.

Für die Herstellung eines Agarosegels wurde zunächst die entsprechende Agarosemenge in 1x TBE-Puffer aufgekocht, anschließend auf etwa 50°C abgekühlt, in einen mit Probenkammern bestückten Gelschlitten gegossen und nach dem Auspolymerisieren in eine mit TBE befüllte Gelelektrophoresekammer gegeben und mit einer Mischung aus  $\frac{1}{4}$  Volumen Ladepuffer (Orange G) und  $\frac{3}{4}$  Volumen Probe beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei ca. 140-160 V für eine Laufzeit von 30-60 min. Abschließend wurde das Gel in eine 0,05%-ige Ethidiumbromid-Lösung überführt und dort für mindestens 15 min angefärbt. Der in die große Furche der DNA interkalierende Farbstoff wurde anschließend durch Anregung mit UV-Licht (312 nm) auf einem Transilluminator-Tisch sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit dem *DIGI CAM Digital Camera Control*-Programm.

## II. 11.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden mit dem BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit und dem ABI 16-Kapillar-Sequenzierer (ABI Prism® 3500 Genetic Analyzer) der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf der Didesoxy-Methode nach Sanger [Sanger et al., 1977], wobei neben 2'-Desoxyribonukleotiden (dNTPs) auch fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) in die zyklische Sequenzierreaktion eines spezifischen PCR-Produktes eingesetzt werden. Wird während der Amplifizierungsreaktion ein solches ddNTP in den entstehenden DNA-Strang eingebaut, kommt es zum Abbruch der Sequenzierreaktion. Die so entstehenden DNA-Stränge sind aufgrund des zufälligen Einbaus von ddNTPs unterschiedlicher Länge und je nach Didesoxynukleotid mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der bei der nachfolgenden Kapillarelektrophorese mittels Laser detektiert wird. Daher kann aus der Größe der PCR-Fragmente und deren Fluoreszenzmarkierung das Sequenzchromatogramm einer Probe abgeleitet werden.



Reagenzien	Thermocycler-Programm
<u>Sequenzierungs-Ansatz:</u> 2,5 µl ExoSAP-Produkt bzw. 1 µl von Mini- oder Maxiprep 1 µl Primer (10 pmol/µl) 2 µl BigDye® Terminator Mix 4 µl 5 x Sequenzing Buffer 10,5 µl HPLC-H <sub>2</sub> O  20 µl Gesamtvolumen	1. 96°C / 5 min. 2. 96°C / 50 s. 3. 50°C / 30 s. 4. 60°C / 4 min. 5. Go to 2, 30 <i>times</i> 6. end

Im Anschluss an diese Sequenzier-Reaktion erfolgte die Aufreinigung der Sequenzierprodukte mithilfe einer Natriumacetat-Fällung.

Fällungsansatz:

20 µl Sequenzierprodukt  
 30 µl HPLC-H<sub>2</sub>O  
 5 µl 3M Na-Acetat  
 125 µl Ethanol (abs.)

Der Fällungsansatz wurde nach kurzem Vortexen bei 14.000 rpm und Raumtemperatur für 20 min zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgezogen. Das verbleibende DNA-Pellet wurde daraufhin in 300 µl 70% Ethanol (v/v) gewaschen, erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert und der Überstand wiederum vorsichtig abgezogen. Schließlich wurde das Pellet bei 37°C für ca. 10 min getrocknet und bis zur Vorbereitung für die elektrophoretische Auftrennung im *ABI Prism® 3500 Genetic Analyzer* bei -20°C gelagert.

## II. 11.7 Transformation kompetenter *E.coli* mit Plasmid-DNA

Kompetente *E.coli* wurden auf Eis aufgetaut und 100 µl der Suspension mit ca. 100 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde für die optimale Aufnahme der DNA ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s durchgeführt. Nach 5-minütiger Abkühlung auf Eis wurden die Zellen mit 700 µl SOC-Medium versetzt, für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen.

## II. 11.8 Anzucht von Bakterien

Für die Anzucht von *E.coli* wurden für eine Minipräparation 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie, für eine Maxipräparation 200 ml LB-Medium mit der 2 ml-Vorkultur beimpft und über Nacht bei 220 Upm und 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert.

## II. 11.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

### II. 11.9.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA mittels Minipräparation auf Grundlage der alkalischen Lyse isoliert. Dazu wurden die Bakterien aus einer Übernachtskultur für 5 min bei 6800 g pelletiert und in 100 µl der Lösung I resuspendiert. Die basische Lyse der Zellen wurde durch die Zugabe von 200 µl Lösung II initiiert und nach 5-minütiger Inkubation durch Neutralisation mit 300 µl Lösung III gestoppt. Nach sorgfältigem Schütteln wurde die Suspension für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 21000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Zentrifugationsröhrchen überführt und die darin enthaltene DNA mit 350 µl Isopropanol gefällt. Die gefällte DNA wurde bei 21000 g für 5 min abzentrifugiert und anschließend in 100 µl RNase -haltigem TE-Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert, um eventuell mitgefällte RNA abzubauen. Die gewonnene DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 125 µl 88% Isopropanol/0,2 M KAc gereinigt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die DNA bei 21000 g für 5 min pelletiert und das getrocknete DNA-Pellet in 30-50 µl Aqua dest. gelöst.

### II. 11.9.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA zum Zwecke der Transfektion von eukaryotischen Zellen bedarf einer höheren Menge und eines höheren Reinheitsgrades als sie mithilfe der oben beschriebenen Minipräparation erzielt werden kann. In dieser Arbeit verwendete Plasmid-DNA wurde nach alkalischer Lyse durch Anionenaustausch-Chromatographie mit dem NucleoBond® Xtra Maxi Kit der Firma Macherey/Nagel gewonnen. Die gefällte DNA wurde in Aqua bidest. gelöst und bei -20°C gelagert.

## II. 11.10 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der Qualität und der Quantität der isolierten DNA wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen

spezifische, meist palindromische 4 bis 8-stellige Nukleotidsequenzen und hydrolysieren die Phosphorsäurediester-Bindungen der vorliegenden DNA in unmittelbarer Nähe zu dieser Erkennungssequenz. Es entstehen dabei enzymabhängig doppelsträngige, glatte Enden (*blunt ends*). Die Hydrolyse der DNA wurde nach Angaben der jeweiligen Enzymhersteller Promega, NEB oder Fermentas durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz ca. 0,1 – 1 µg Plasmid-DNA und 0,5 – 1 U Enzym in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Analyse der Restriktionsspaltung erfolgte in einer horizontalen Agarosegelelektrophorese.

### II. 11.11 Klonierung mittels TOPO® Cloning-Technologie

Die TOPO®-Klonierungs-Technologie ist eine schnelle und effiziente Klonierungsstrategie, die der direkten Insertion eines PCR-Produkts in einen Plasmidvektor dient. Die TOPO-Technologie nutzt dabei die Eigenschaft der Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus, welche sowohl DNA spalten als auch ligieren kann. Sie bindet zunächst spezifisch an die doppelsträngige Vektor-DNA und spaltet das Phosphodiester-Rückgrat eines Strangs [Shuman, 1991], wobei ein einzelsträngiger 3'-Überhang entsteht. Dieses einzelsträngige Ende dringt in das doppelsträngige PCR-Produkt ein, ersetzt einen Teil des unteren Strangs und wird an das PCR-Produkt ligiert. Mithilfe dieser Reaktion kann u.a. ein sogenannter Eingangsvektor (*entry vector*) zur Klonierung eines bestimmten DNA-Fragments (Inserts) in verschiedene Zielvektoren (*destination vector*) des GATEWAY™-Systems generiert werden. Die TOPO-Cloning-Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers Invitrogen durchgeführt.

### II. 11.12 Klonierung mittels GATEWAY™-Technologie

Die GATEWAY™-Technologie ist eine universelle Klonierungsmethode und basiert auf lokusspezifischer Rekombination. Grundlage dieser Technologie sind Eigenschaften des Bakteriophagen Lambda, welcher im Rahmen des lysogenen Zyklus in das Genom eines Bakteriums integrieren kann. Das zu klonierende DNA-Fragment wird von zwei spezifischen kurzen DNA-Sequenzen, den so genannten Att-Stellen (*attachment sites*), flankiert. Das Einfügen des DNA-Fragments (Inserts) zwischen die Att-Stellen kann mittels der TOPO-Technologie erfolgen. Der so entstandene Eingangsklon mit Insert wird in einer enzym-vermittelten LR-Reaktion mit einem Zielvektor und dessen äquivalenten Att-Stellen eingesetzt. Bei dieser

Reaktion erfolgt eine Rekombination zwischen den Att-Stellen des Eingangsklons und des Zielvektors, sodass schließlich das Insert in den Zielvektor gelangt. Um einen gewöhnlichen Plasmidvektor in einen Gateway-kompatiblen Zielvektor zu überführen, wird einfach eine Gateway-Leserahmen-Kassette (*Gateway Reading Frame Cassette*) mit Att-Stellen eingebaut. Die GATEWAY™-Reaktionen in dieser Arbeit wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### II. 11.13 Photometrische Quantifizierung von DNA

Die Quantifizierung von DNA erfolgte photometrisch im Spektralphotometer *BioPhotometer* der Firma Eppendorf durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm. Eine optische Dichte von 1 bei dieser Wellenlänge entspricht dabei einer DNA-Konzentration von ca. 50 µg/ml. Proteine zeigen im Gegensatz zu DNA ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, so dass der Quotient A der Absorption beider Wellenlängen ( $A_{260/280}$ ) als ein Maß für die Reinheit der DNA angesehen werden kann. Der Quotient sollte für reine DNA zwischen 1,8 – 2,0 liegen.

## II. 12 Proteinbiochemische Methoden

### II. 12.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels der eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [Laemmli, 1970]. Um eine Trennung der Proteine nach ihrer Größe zu erreichen, wird als Trägermedium für das Gel Polyacrylamid, dessen Konzentration den Vernetzungsgrad des Gels bestimmt, verwendet. Außerdem wird dem Proteingemisch SDS in sättigender Konzentration zugesetzt. SDS bewirkt zum einen eine Zerstörung aller nicht-kovalenten Wechselwirkungen und damit der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur nativer Proteine; zum anderen kommt es zur Ausbildung von SDS-Protein-Komplexen. Da SDS negativ geladen ist und die Proteine mit diesem gesättigt sind, wird die spezifische Ladung der Proteine vernachlässigbar und das Ladung/Masse-Verhältnis für jedes Protein annähernd gleich. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines speziellen Proteins im SDS-Gel wird damit durch dessen Molekulargewicht und durch die Porengröße des Gels bestimmt. Zur Gelelektrophorese wurde die Trenngel-Polyacrylamid-Lösung nach der unten angegebenen Rezeptur hergestellt, zwischen zwei Glasplatten in eine Minigel-

Apparatur (BioRad) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach TEMED- und APS-katalysierter Polymerisation wurde das Isopropanol vollständig entfernt und ausgewaschen. Nachfolgend wurde auf das Trenngel ein Sammelgel gegossen und mit Probenkammern bestückt. Dieses dient der Fokussierung der SDS-Protein-Komplexe vor der eigentlichen Auftrennung im Trenngel. Die Proteinproben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer (Lämmli-Puffer) versetzt, für 3 - 5 min bei 95°C aufgeköcht, zentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese in 1x SDS-Laufpuffer erfolgte bei 100 V durch das Sammelgel und bei 150 V durch das Trenngel. Neben den Proteinproben wurde zur Überprüfung der molekularen Masse der Proteine stets ein Proteinmassenstandard aufgetragen.

	Trenngel	Sammelgel
	10%	5,0%
Aqua bidest. [ml]	4,2	3,9
4x Trenngelpuffer bzw. 4x Sammelgelpuffer [ml]	2,5	1,7
30% AA/BisAA (37,5:1) [ml]	3,4	1,2
TEMED [ $\mu$ l]	6,3	6,3
10% APS (w/v) [ $\mu$ l]	125	125

**Tab. 12: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel im Rahmen der SDS-PAGE**

## II. 12.2 Western-Blot

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen erfolgte auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF) Membran, wobei man sich die negative Ladung der SDS-Proteinkomplexe zunutze macht (Elektro-Blot). Zunächst wurde eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, für 30 s in 100%-igem Methanol aktiviert, für 1 min in Aqua bidest. gewaschen und für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Vier 1 mm dicke Whatman-Filterpapiere wurden ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer inkubiert. Die Polyacrylamidgele wurden aus der Gelelektrophoresekammer entnommen und kurz in Transferpuffer äquilibriert, um störende Salze zu entfernen. Das Western-Blot-Sandwich wurde folgendermaßen im Blotter luftblasenfrei aufgebaut (von unten nach oben):

- Anode
- zwei Whatman-Filterpapiere
- PVDF-Membran
- SDS-Gel
- zwei Whatman-Filterpapiere
- Kathode

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für ca. 50 min bei konstanter Stromstärke (3,5 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche). Danach wurden die auf der PVDF-Membran immobilisierten Proteine einer Immundetektion zugeführt.

### II. 12.3 Immunologische Detektion von auf PVDF-Membranen immobilisierten Proteinen

Die spezifische Detektion von auf PVDF-Membranen immobilisierten Proteinen beruht auf der Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes und der Bindung eines sekundären Antikörpers an diesen Komplex. Der zweite Antikörper ist mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert, welche in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) die Oxidation von Luminol katalysiert. Das instabile Intermediärprodukt dieser Reaktion befindet sich in einem angeregtem Zustand und fällt unter mit Röntgenfilmen detektierbarer Lichtemission in seinen Grundzustand zurück (Chemilumineszenz).

Nach dem Proteintransfer wurden zunächst freie Bindungskapazitäten auf der PVDF-Membran abgesättigt. Dies geschah je nach verwendetem Primärantikörper entweder mit 4% (w/v) Milchpulver in 1x TBST (für Antikörper von Abcam und Sigma-Aldrich) oder mit 10% (w/v) Milchpulver in 1x PBST (für Antikörper von Santa Cruz) für mindestens 30 min bei RT oder bei 4°C ü.N. Die Inkubation mit dem primären protein- oder peptidspezifischen Antikörper erfolgte wiederum je nach Antikörperhersteller in TBSTM oder PBSTM über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran mit 1x TBST bzw. 1x PBST für je 10 min entfernt. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte mit einem gegen diesen gerichteten HRP-konjugierten Sekundärantikörper. Nach ca. 1 Stunde Inkubation bei RT wurde die Membran dreimal für je 10 min mit 1x TBST bzw. 1x PBST gewaschen. Abschließend wurde die Membran für ca. 3 min mit einer ECL-Substratlösung (Immobilon™ Western – *Chemiluminescent HRP-substrate*) inkubiert und die entstehende Chemilumineszenz durch Exposition der Membran auf Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte in einem speziellen Entwicklergerät (X-Ray Film Processor). Mittels Inkubation mit dem Restore™ Western-Blot Stripping Puffer oder mit 0,2 M NaOH für ca. 20 min konnten die Antikörper, falls gewünscht, von den auf der Membran immobilisierten Proteinen gelöst und anschließend eine erneute Immundetektion mit einem anderen Antikörper durchgeführt werden.

## II. 13 Zellbiologische Methoden

### II. 13.1 Kultivierung von etablierten Zelllinien

#### II. 13.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die verwendete Zelllinie wurde im Begasungsbrutschrank bei konstanten 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank bearbeitet. Für Experimente wurde die Zelllinie in Form von Adhäsionskulturen auf 100 mm-Zellkulturschalen kultiviert.

Zelllinie	Medium	Zusätze
COS-7	D-MEM	10% FBS 1% PenStrep (v/v)

**Tab. 13: Für zellbiologische Arbeiten verwendete Zelllinie und dazugehöriges Kulturmedium mit Zusätzen**

#### II. 13.1.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich bei einer Konfluenz von ca. 90% auf neue Kulturschalen überführt. Dazu wurde das Vollmedium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 ml TrypLE™ Express von der Kulturschale gelöst. Nach Ablösen der Zellen wurden 9 ml frisches Vollmedium zugesetzt (um die Trypsinreaktion abzustoppen) und die Zellen sorgfältig durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Diese wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit frischem Vollmedium verdünnt und in ein neues Kulturgefäß überführt.

### II. 13.2 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Lipofectamin™ 2000

Die verwendete Transfektionsmethode mittels Lipofectamin™2000 beruht auf dem Prinzip der Lipofektion. Bei diesem Transfektionsreagenz handelt es sich um ein kationisches Lipid, welches aufgrund der negativen Ladungseigenschaften von DNA durch ionische Wechselwirkung Lipid-DNA-Komplexe bildet. Da diese Komplexe von Zellen durch Endozytose aufgenommen werden, kann so eine gewünschte Plasmid-DNA in Zellen eingebracht werden. Das optimale Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz wurde durch Tests auf ein Verhältnis von 1:2 (µg:µl) bestimmt. COS-7-Zellen wurden am Vortag der Transfektion mittels Neubauerzählkammer gezählt und in einer Konzentration von 1,2x10<sup>6</sup> Zellen/100 mm-Zellkulturschale (bzw.

9x10<sup>4</sup> Zellen/12-Loch für IF) ausgesät. Am Folgetag wurden Transfektionslösung I (400 µl Optimem + 5 µg Plasmid-DNA) und Transfektionslösung II (400 µl Optimem + 10 µl Lipofectamin™2000) hergestellt, 5 min bei RT inkubiert, vermischt und für weitere 20-30 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die zu transfizierenden Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen und mit 3,2 ml vorgewärmtem Optimem überschichtet. Der Transfektionsansatz wurde sodann tröpfchenweise auf die Zellen gegeben, die Kulturschalen zur Verteilung der Lösung vorsichtig geschwenkt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für ca. sechs Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium von der Kulturschale abgesaugt und 10 ml Hungermedium (D-MEM + 1% PenStrep + 0,1% FBS) zu den Zellen gegeben und für weitere 16-20 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### II. 13.3 Biotinylierungsassays

Als Biotinylierung bezeichnet man eine biochemische Methode mittels der Biotin - ein wasserlöslichen Vitamin - an eine Vielzahl von Makromolekülen wie z.B. Proteinen gebunden wird. Die geringe Größe des Biotins ermöglicht zum einen, dass ein Zielmolekül bei Vorhandensein von entsprechenden Bindestellen mehrfach biotinyliert werden kann, zum anderen bleiben durch die Biotinbindung die biologischen und chemischen Eigenschaften des Moleküls praktisch unverändert. Für die Experimente in dieser Arbeit wurde das thiol-spaltbare und amin-reaktive Biotinylierungsreagenz Sulfo-NHS-SS-Biotin verwendet, welches aufgrund der Ladung des gebundenen Succinimidyl-Rings die Zellmembran nicht durchdringen kann. Somit reagiert die Estergruppe dieser Substanz, solange die Zellmembran intakt ist, nur mit den primären Aminogruppen von Proteinen an der Zelloberfläche, d.h. mit der  $\alpha$ -Aminogruppe der ersten Aminosäure des Proteins sowie der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin in dem Protein. Um eine mit dieser Interaktion verbundene, sterische Hinderung des gebundenen Proteins zu reduzieren, werden in der Regel, so auch in dieser Arbeit, Biotinmoleküle mit verlängerten Verbindungsarmen (*spacer arm*) verwendet (Biotin-*crosslinker*). Das biotinylierte Zielprotein kann nach Zellyse durch Präzipitation mit Streptavidin-konjugierten Agarosekügelchen (in dieser Arbeit: EZview™ Red Streptavidin Affinitätsgel) isoliert werden. Streptavidin ist ein aus *Streptomyces avidinii* gewonnenes 66 kDa schweres Homotetramer, welches mit einer Affinität von mehr als 10<sup>15</sup> M<sup>-1</sup> von Biotin gebunden wird, was somit eine der stärksten natürlich vorkommenden Bindungen darstellt.



Die Methode der Zelloberflächen-Biotinylierung wurde in dieser Arbeit wie im Folgenden dargelegt zur Untersuchung der Rolle von c-Cbl bei der Internalisierung und beim Trafficking von EGFR genutzt.

## II. 13.4 Biotinylierung und Quantifizierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren

EGF-Stimulation von Zellen führt zur Abnahme der membranständigen EGFR, die auf Internalisierung zurückzuführen ist. Diese Abnahme lässt sich quantifizieren, indem man mithilfe der Biotinylierung die Menge von zelloberflächenständigen EGFR in EGF-stimulierten und unstimulierten Zellen vergleicht.

### Vorbehandlung der Streptavidin-Agarosekügelchen

Pro Ansatz wurden 40 µl der mit Streptavidin-gekoppelten Agarosekügelchen mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen überführt und nach Zugabe von 1000 µl RIPA-Lysepuffer (+ Complete mini Proteaseinhibitor-Tabletten) und vorsichtigem Invertieren bei 8000 g und 4°C für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dieser Waschschrift ein weiteres Mal wiederholt.

### Biotinylierung

Zur Quantifizierung der an der Zelloberfläche lokalisierten EGFR vor und nach EGF-Stimulation wurden die COS-7-Zellen 48 h vor der Biotinylierung in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/100 mm-Zellkulturschale ausgesät. Nach ca. 24 h wurden die Zellen mit den auserwählten *CBL*-Konstrukten transfiziert und ü.N. unter Serumentzug kultiviert. Weitere 18 h später wurden die Zellen mit vorgewärmten, 10 ng/ml EGF-haltigem Hungermedium (D-MEM + 1% PenStrep + 0,1% FBS) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C in einem Begasungsbrutschrank inkubiert. Pro transfiziertem *CBL*-Konstrukt wurde außerdem je eine Zellkulturschale zurückbehalten und mit Hungermedium ohne EGF versetzt (= 0 min-Wert). Nach der Inkubationsphase wurden die Zellkulturschalen zum Abstoppen der EGFR-Endozytose auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit eiskaltem 1x HBSS gewaschen, um störende Biomoleküle aus dem Medium zu eliminieren. Anschließend wurden die Zellen mit einer eiskalten, 0,5 mg/ml-haltigen Biotin-Lösung (in HBSS) überschichtet und die Schalen für 15 min unter leichtem

Schwenken im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Nach der Biotinbindung wurden die Zellen dreimalig mit 5 ml eiskaltem Wasch-HBSS auf Eis gewaschen, um ungebundenes Biotin zu entfernen.

#### Zellyse

Es folgte ein Waschschrift mit 5 ml eiskaltem 1x PBS+/, die Lyse der Zellen in 1 ml RIPA-Puffer (+ Complete mini Proteaseinhibitor-Tabletten) pro Schale durch Abschaben und das Überführen des Lysats in ein vorgekühltes Zentrifugationsröhrchen. Nach 10-minütiger Inkubation des Lysats auf Eis wurden Zelltrümmer bei 21000 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert.

#### Präzipitation mit Streptavidin

Vom Zentrifugationsüberstand wurden 75 µl als Rohlysats zurückbehalten, mit Lämmli-Puffer versetzt und bei -20°C weggefroren. Der Rest des Überstandes wurde auf die vorbehandelten Streptavidin-Agarosekügelchen gegeben und für mind. 2 h oder ü.N. bei 4°C auf einem Überkopffrotator (15-20 Upm) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 1 min bei 7600 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, zu dem Sediment 500 µl RIPA-Puffer gegeben und der Ansatz durch Invertieren vermischt. Nun wurde dieser bei 7600 g und 4°C für 30 s zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Nach einer Wiederholung des Waschschrifts mit 500 µl RIPA-Puffer und der Zentrifugation wurde der Überstand wiederum vollständig abgenommen und frische 20 µl RIPA-Puffer und 30 µl Lämmli-Puffer zu dem Sediment gegeben. Der Mix wurde durch Vortexen vermischt und das Präzipitat bis zur Analyse mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundetektion bei -20°C gelagert.

### **II. 13.5 Biotinylierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren und Quantifizierung der EGF-Rezeptor Endozytose**

Diese Methode hat zum Ziel, die Anzahl von endozytierten EGFR zum Zeitpunkt 30-minütiger EGF-Stimulation zu quantifizieren. Dies wird durch folgende Versuchsabfolge erreicht: Zuerst werden die Zellen biotinyliert, dann erfolgt die Stimulation mit EGF und danach wird das restliche zelloberflächengebundene Biotin

abgewaschen. Dadurch wird gewährleistet, dass nach der Präzipitation mit Streptavidin nur endozytierte EGFR dedektiert werden.

#### Vorbehandlung der Streptavidin-Agarosekügelchen

Siehe zellbiologische Methoden, *II.13.4 Biotinylierung und Quantifizierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren*

#### Biotinylierung

Die am Vortag mit verschiedenen *CBL*-Konstrukten transfizierten Zellen wurden auf Eis gestellt und dreimal mit 5 ml eiskaltem HBSS gewaschen, um störende Biomoleküle zu entfernen. Die Biotinylierung der an der Zelloberfläche befindlichen EGFR erfolgte mit einer 0,5 mg/ml-haltigen Biotin-Lösung (in HBSS) für 15 min unter leichtem Schwenken im Kühlraum. Anschließend wurden die Zellkulturschalen wieder auf Eis gestellt, um eine zu diesem Zeitpunkt ungewollte Endozytose der biotinylierten Rezeptoren weiterhin zu vermeiden. Danach wurden die Zellen dreimal mit 5 ml eiskaltem Wasch-HBSS gewaschen, um ungebundenes Biotin zu entfernen.

#### Endozytose

Um die Endozytose der membrangebundenen, biotinylierten EGFR zu induzieren, wurden die Zellen mit 37°C-warmem 10 ng/ml EGF-haltigem Hungermedium versetzt, für 30 min in einem Begasungsbrutschrank inkubiert und nach dieser Stimulationsperiode direkt auf Eis gestellt, um eine weitere Endozytose zu stoppen. Die Zellen wurden anschließend einem zweimaligen 25-minütigen Waschschrift mit 5 ml Glutathion-Puffer bei 4°C und Schwenken auf einem Horizontalschüttler unterzogen, um das an der Zelloberfläche verbliebene Biotin zu entfernen. Um die Effektivität der Glutathion-Waschschriffe zu überprüfen, blieb pro transfiziertem *CBL*-Konstrukt je eine Schale unstimuliert und wurde direkt nach der Biotinylierung und dem HBSS-Waschschrift mit dem Glutathion-Puffer behandelt.

#### Zellyse und Präzipitation mit Streptavidin

Siehe zellbiologische Methoden, *II.13.4 Biotinylierung und Quantifizierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren*

## II. 13.6 Biotinylierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren und Analyse der EGF-Rezeptor Trafficking-Kinetik

Diese Methode soll Aussagen über den zeitlichen Verlauf des EGFR-Traffickings erlauben. Dazu wird nach EGF-Stimulation die Anzahl von endozytierten EGFR zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert (wie in II.13.5 beschrieben) und die Resultate werden zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Vorbehandlung der Streptavidin-Agarosekügelchen

Siehe zellbiologische Methoden, II.13.4 *Biotinylierung und Quantifizierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren*

Biotinylierung

Siehe zellbiologische Methoden, II.13.5 *Biotinylierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren und Quantifizierung der EGF-Rezeptor-Endozytose.*

Endozytose

Um die Endozytose der membrangebundenen, biotinylierten EGFR zu induzieren, wurden die Zellen mit 37°C-warmem 20 ng/ml EGF-haltigem Hungermedium versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 20, 50 oder 90 Minuten in einem Begasungsbrutschrank inkubiert und nach der jeweiligen Stimulationsperiode direkt auf Eis gestellt, um eine weitere Endozytose zu stoppen. Die Zellen wurden anschließend einem zweimaligen 25-minütigen Waschschrift mit 5ml Glutathion-Puffer bei 4°C und Schwenken auf einem Horizontalschüttler unterzogen, um das an der Zelloberfläche verbliebene Biotin zu entfernen. Um die Effektivität der Glutathion-Waschschriffe zu überprüfen, blieb pro transfiziertem CBL-Konstrukt je eine Schale unstimuliert und wurde direkt nach der Biotinylierung und dem HBSS-Waschschrift mit dem Glutathion-Puffer behandelt.

Zellyse und Präzipitation mit Streptavidin

Siehe zellbiologische Methoden, II.13.4 *Biotinylierung und Quantifizierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren*

## II. 13.7 Quantifizierung der lysosomalen EGF-Rezeptor Degradierung bei inhibierter Proteinbiosynthese

Mittels dieser Experimente sollte der zeitliche Verlauf des Abbaus von EGFR nach EGF-Stimulation untersucht werden. Die dabei zu erwartende Abnahme der Gesamt-EGFR-Menge wurde auf lysosomalen Abbau zurückgeführt. Als Nullwert wurde die Menge an EGFR in unstimulierten Zellen bestimmt. Um die Proteinbiosynthese von EGFR zu unterdrücken, wurde der Translationshemmer Cycloheximid eingesetzt.

### Vorbehandlung der COS-7-Zellen

Die am Vortag mit ausgewählten *CBL*-Konstrukten transfizierten COS-7-Zellen wurden 30 Minuten vor EGF-Stimulation mit 20 ng/ml Cycloheximid inkubiert, um eine Proteinbiosynthese während des Experimentes zu unterbinden.

### Stimulation

Die vorbehandelten Zellen wurden mit 37°C-warmen 20 ng/ml EGF-, und 10 ng/ml Cycloheximid-haltigem Hungermedium versetzt. Im Anschluss folgte eine Inkubation in einem Begasungsbrutschrank für 60, 120 oder 240 Minuten. Nach der jeweiligen Stimulationsperiode wurden die Zellen lysiert. Pro transfiziertem *CBL*-Konstrukt blieb eine Zellplatte unstimuliert und wurde sofort lysiert. Da hier keine lysosomale Degradierung von EGFR stattfinden sollte, diente dieser Ansatz zur Bestimmung des Nullwertes (Referenzwert).

### Zellyse

*Siehe zellbiologische Methoden, II.13.4 Biotinylierung und Quantifizierung von zelloberflächenständigen EGF-Rezeptoren.*

Vom Zentrifugationsüberstand wurden 75 µl mit 25 µl Lämmli-Puffer versetzt und bis zur Analyse mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundetektion bei -20°C weggefroren.

## III Ergebnisse

### III. 1 Mutationsanalyse des *CBL*-Gens bei mutationsnegativen Patienten mit Noonan-Syndrom bzw. einem Noonan-Syndrom ähnlichen Krankheitsbild

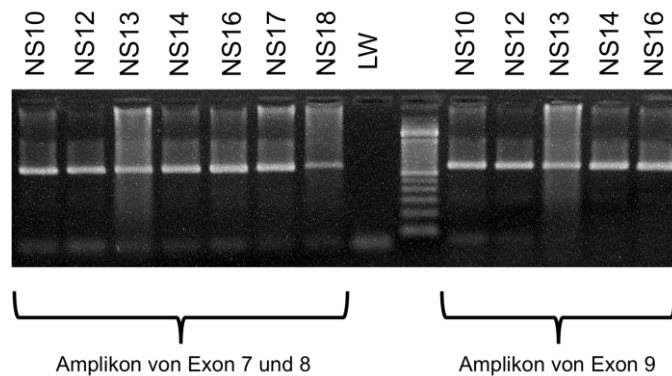
#### III. 1.1 Vorbemerkung

Mutationen im *CBL*-Gen verursachen das Noonan-Syndrom bzw. ein Noonan-Syndrom ähnliches Krankheitsbild [Martinelli et al., 2010, Niemeyer et al., 2010, Perez et al., 2010]. Aufgrund dieser Erkenntnis wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit drei verschiedene Patientenkollektive hinsichtlich Mutationen in *CBL* untersucht. Zwei dieser Kollektive bestanden aus 97 bzw. 20 mutationsnegativen Patienten mit der Verdachtsdiagnose Noonan-Syndrom (Kohorte 1: N1-N11, N13-N16, N18, N20-N24, N26-N30, N32-N88, N90-N99, N105-N108. Kohorte 2: NS1-NS14, NS16-NS19, NS21, NS22). Das dritte Kollektiv beinhaltete 68 mutationsnegative Patienten mit Verdacht auf Noonan-Syndrom oder ein ähnliches Krankheitsbild, wie das Costello-Syndrom oder das CFC-Syndrom (Kohorte 3: S1-S6, S8-S20, S22-S31, S33-S35, S38-S48, S50-S57, S59-S75).

#### III. 1.2 PCR-Amplifikation ausgewählter Exons des *CBL*-Gens und anschließende DNA-Sequenzierung

Die bisher aufgedeckten Noonan-Syndrom assoziierten Mutationen in *CBL* liegen in den Exons 7, 8 oder 9 der insgesamt 16 Exons von *CBL* [Martinelli et al., 2010, Niemeyer et al., 2010, Perez et al., 2010]. Daher sollte in dieser Arbeit diese Region des Gens auf Sequenzabweichungen hin untersucht werden. Um eine Mutationsanalyse bei den o. g. Patienten durchführen zu können, wurde zunächst die Exon-Intron-Struktur des Gens ermittelt und exonflankierende Primer für die drei Exons abgeleitet. Da die Exons 7 und 8 sehr nahe beieinander liegen, wurden diese in einem Amplikon zusammengefasst. Weiterhin wurden die Primer so gelegt, dass zu beiden Seiten noch mindestens 40 Bp intronische Sequenz die Exons flankiert. Die Etablierung optimaler PCR-Bedingungen wurde an genomischen Kontroll-DNAs durchgeführt. Anschließend wurden die Exons aus der genomischen DNA der Patienten amplifiziert und die Produkte durch Agarosegelelektrophorese auf Qualität und Quantität hin überprüft. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 8) ist

exemplarisch ein Foto eines Agarosegels, das PCR-Produkte von verschiedenen Patienten beinhaltet, gezeigt.



**Abb. 8: Darstellung eines Agarosegels mit Amplikons von CBL**

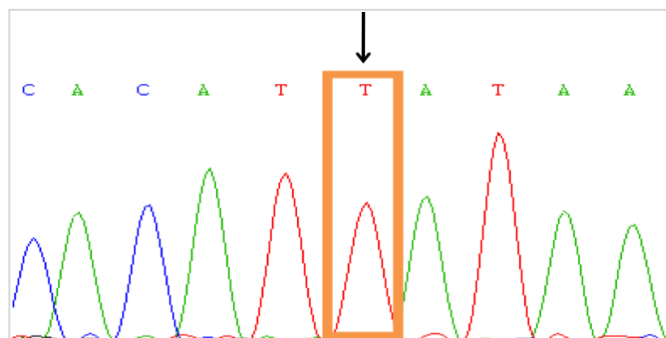
Das Bild zeigt ein 2%-iges Agarosegel, auf das einige Amplikons, die Exon 7 und 8 beinhalten, und einige Amplikons von Exon 9, jeweils aus genomischer DNA der angegebenen Patienten gewonnen, aufgetragen wurden. Der Leerwert (LW) ist ein Ansatz ohne DNA. Die PCR-Produkte haben eine Größe von 728 Bp (Amplikon von Exon 7 und 8) bzw. 729 Bp (Amplikon von Exon 9). Rechts neben dem Leerwert wurde ein Größenstandard (100 Bp-Leiter) aufgetragen.

Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und sequenziert. Alle Sequenzen der untersuchten Patienten zeigten nach Vergleich mit der entsprechenden Wildtypsequenz mithilfe der Software „Sequence Pilot“ keine Mutationen. Bei einem Teil der Patienten konnte allerdings eine bereits bekannte Sequenzvariante festgestellt werden, die in den internationalen Datenbanken als *single nucleotide polymorphism* (SNP) notiert ist (Tab. 14, Abb. 9).

Gen	Nukleotid-Austausch	Exon/Intron	dbSNP	Häufigkeit der Sequenzvariante
CBL	c.1095+19G>T	Intron 7	rs2510152	202/370 (71) <sup>c</sup>

**Tab. 14: Identifizierte Sequenzvariante in CBL**

Die Tabelle gibt an, mit welcher Häufigkeit die Sequenzvariante in den untersuchten Patientenkollektiven identifiziert wurde. Für diesen bekannten Polymorphismus ist die SNP-Referenznummer (rs) in der NCBI-Datenbank angegeben. dbSNP: Datenbank *single nucleotide polymorphism*; <sup>c</sup> Anzahl der homozygot vorliegenden Sequenzvariante.



**Abb.9: Sequenzchromatogramm von Patient N90**

Das Sequenzchromatogramm zeigt einen Ausschnitt aus Intron 7 von CBL. Erkennbar ist das homozygote Vorliegen der c. 1095+19G>T -Variante (mit Pfeil markiert).

Zusammengefasst konnte bei den Patienten aus den drei untersuchten Kollektiven keine krankheitsrelevante Mutation in CBL identifiziert werden.

## III. 2 Analyse der Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen im c-Cbl-Protein auf die Regulation des EGFR in COS-7-Zellen mittels Rezeptor-Biotinylierungsassays und Quantifizierung der Gesamt-EGFR-Menge

### III. 2.1 Vorbemerkung

Im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit sollten die funktionellen Auswirkungen der drei krankheitsassoziierten *CBL*-Keimbahnmutationen c.1144A>G, c.1168G>T und c.1259G>A auf die Internalisierung, das intrazelluläre Trafficking und die Degradierung von EGFR untersucht werden. Die drei zu analysierenden Mutationen führen im c-Cbl-Protein zu den Aminosäureaustauschen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q und beeinträchtigen möglicherweise das Ubiquitin-Ligase-Potential von c-Cbl, was Auswirkungen auf EGFR-Internalisierung und Degradierung haben könnte [Jiang et al., 2003, Lill et al., 2000, Thien et al., 2001, Waterman et al., 1999]. Nach transienter Transfektion der entsprechenden *CBL*-Konstrukte in COS-7-Zellen erfolgte die Analyse der Auswirkungen mithilfe von Biotinylierungsassays bzw. Quantifizierung der Gesamt-EGFR-Menge. In jedem Experiment wurden zudem Zellen mit Konstrukten für die Expression von c-Cbl<sup>WT</sup> und c-Cbl<sup>C381A</sup> transfiziert. c-Cbl<sup>C381A</sup> weist ein eingeschränktes Ubiquitylierungspotential auf [Thien et al., 2001] und eignet sich daher zusammen mit c-Cbl<sup>WT</sup> als Vergleich und zur internen Kontrolle.

### III. 2.2 Bestimmung der Menge an EGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche von transient transfizierten COS-7-Zellen mittels Rezeptor-Biotinylierungsassays

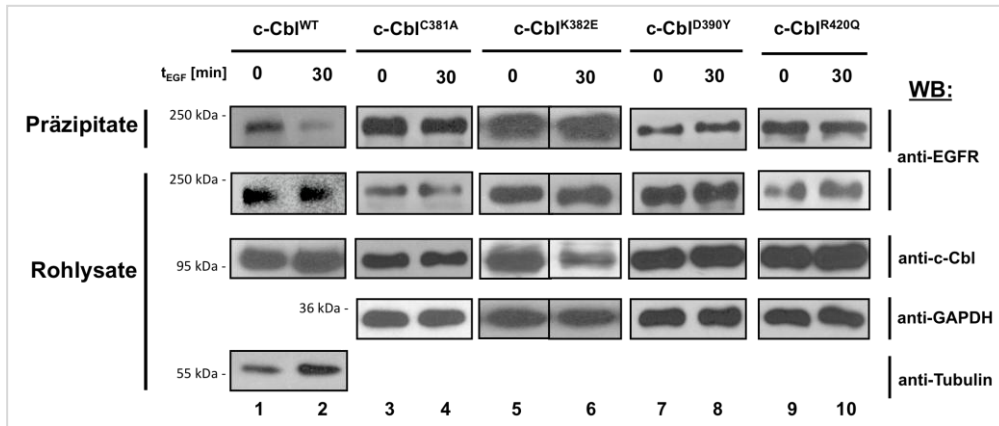
Um zu analysieren, ob die krankheitsassoziierten Aminosäureaustausche im c-Cbl-Protein (p.K382E, p.D390Y, p.R420Q) Auswirkungen auf die EGF-induzierte Internalisierung von EGFR haben, wurde zunächst der EGF-induzierte EGFR-Abtransport von der Zelloberfläche untersucht. Hierzu wurde als Referenzwert zur Normalisierung (= 0 min. Wert) jeweils die Anzahl der an der Zelloberfläche befindlichen EGFR in unstimulierten Zellen ermittelt. Diese Anzahl wurde mit der Menge an zelloberflächenständigen EGFR nach 30-minütigem EGF-Stimulus verglichen. Serumentzogene, mit c-Cbl<sup>WT</sup>-, c-Cbl<sup>C381A</sup>-, c-Cbl<sup>K382E</sup>-, c-Cbl<sup>D390Y</sup>- oder c-Cbl<sup>R420Q</sup>-Konstrukten transient transfizierte COS-7-Zellen wurden entweder vor oder



nach EGF-Stimulation mit einem nicht-membrangängigen Biotin-*crosslinker* versetzt. Somit wurden alle Zelloberflächenproteine markiert. Bereits internalisierte EGFR wurden nicht biotinyliert. Nach der Entfernung ungebundenen Biotins und anschließender Zellyse wurden alle biotingebundenen oberflächenständigen Proteine mittels Streptavidin-Agarose präzipitiert. Nach Western-Blotting wurde schließlich die Menge an EGFR, sowohl in den Präzipitaten (entspricht der Menge an oberflächenständigen EGFR) als auch in den Rohlysaten (entspricht der Gesamtmenge an EGFR), mittels Immundetektion festgestellt.

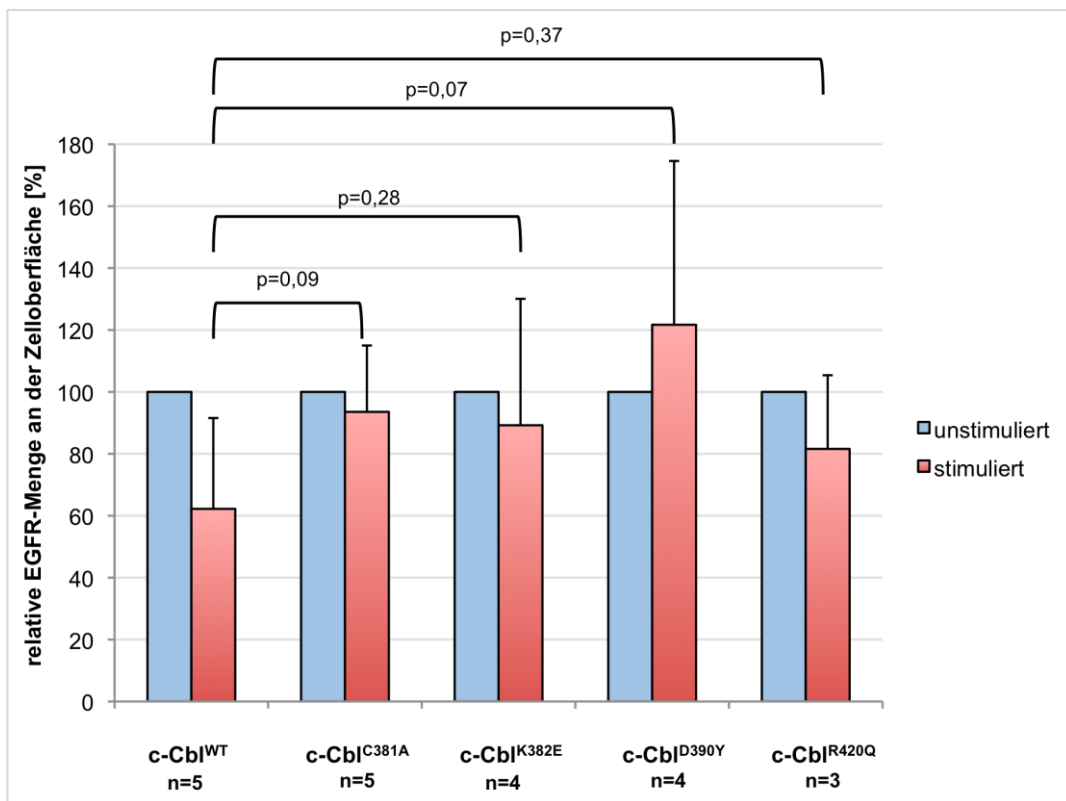
Abb. 10 zeigt, dass in Präzipitaten von c-Cbl<sup>WT</sup>-exprimierenden Zellen nach 30-minütiger EGF-Stimulation deutlich weniger EGFR detektiert wurde als in Präzipitaten, die aus entsprechenden unstimulierten Zellen gewonnen wurden (Abb. 10, Präzipitate, Spuren 1 und 2). In den Präzipitaten der die übrigen c-Cbl-Varianten exprimierenden Zellen dagegen war diese Differenz weniger ausgeprägt (Abb. 10, Präzipitate, Spuren 3 bis 10). Die Blots voneinander unabhängig durchgeführter Assays (c-Cbl<sup>WT</sup> n=5, c-Cbl<sup>C381A</sup> n=5, c-Cbl<sup>K382E</sup> n=4, c-Cbl<sup>D390Y</sup> n=4, c-Cbl<sup>R420Q</sup> n=3) wurden semi-quantitativ mittels densitometrischer Messung der Schwärzung auf den Autoradiogrammen ausgewertet. Die EGFR-Menge in den Präzipitaten (Abb. 10, Präzipitate) wurden ins Verhältnis zu der jeweiligen Gesamt-EGFR-Menge in den Rohlysaten (Abb. 10, Rohlysate) gesetzt. Nach Mittelung dieser Quotienten ließ sich die relative Menge an EGFR, die sich vor bzw. nach EGF-Stimulation an der Zelloberfläche befand, in einem Säulendiagramm darstellen (Abb. 11).

Während bei Expression von c-Cbl<sup>WT</sup> eine EGF-induzierte Abnahme der oberflächenständigen EGFR von durchschnittlich 38% beobachtet wurde, reduzierte sich die Menge dieser EGFR-Fraktion bei Expression der c-Cbl-Variante c-Cbl<sup>C381A</sup>, c-Cbl<sup>K382E</sup> bzw. c-Cbl<sup>R420Q</sup> nur um 6-18% (Abb.11). Die Expression von c-Cbl<sup>D390Y</sup> führte sogar zu einer Zunahme der relativen EGFR-Menge an der Zelloberfläche (Abb. 11).



**Abb. 10: EGF-induzierte Abnahme von zelloberflächenständigen EGFR**

Gehungerte, mit *c-Cbl*<sup>WT</sup>, *c-Cbl*<sup>C381A</sup>, *c-Cbl*<sup>K382E</sup>, *c-Cbl*<sup>D390Y</sup>- oder *c-Cbl*<sup>R420Q</sup>-Konstrukten transfizierte COS-7 Zellen wurden für 30 min. mit 10 ng/ml EGF stimuliert (30') oder blieben unbehandelt (0'). Sodann erfolgte auf Eis die Oberflächen-Biotinylierung, ein saurer Waschschrift zur Entfernung von ungebundenem Biotin, die Lyse der Zellen und die Präzipitation der biotinylierten Oberflächenproteine mit Streptavidin-Agarose. Präzipitate und Rohlysate wurden nach Western-Blot mittels Immundetektion mit einem anti-EGFR-Antikörper untersucht (1. und 2. Zeile). Ebenso wurde in den Rohlysaten c-Cbl mittels anti-c-Cbl-Antikörper detektiert, um die erfolgreiche Transfektion nachzuweisen. Als Ladekontrolle wurde in den Rohlysaten das Haushaltsprotein Tubulin (Spuren 1 und 2) bzw. GAPDH (Spuren 3 bis 10) mittels zweier verschiedener Antikörper nachgewiesen. Links der Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben. Die gezeigten Blots stellen repräsentative Ergebnisse von unabhängig voneinander durchgeführten Biotinylierungsassays dar (*c-Cbl*<sup>WT</sup> n=5, *c-Cbl*<sup>C381A</sup> n=5, *c-Cbl*<sup>K382E</sup> n=4, *c-Cbl*<sup>D390Y</sup> n=4, *c-Cbl*<sup>R420Q</sup> n=3). WB, Western-Blot.



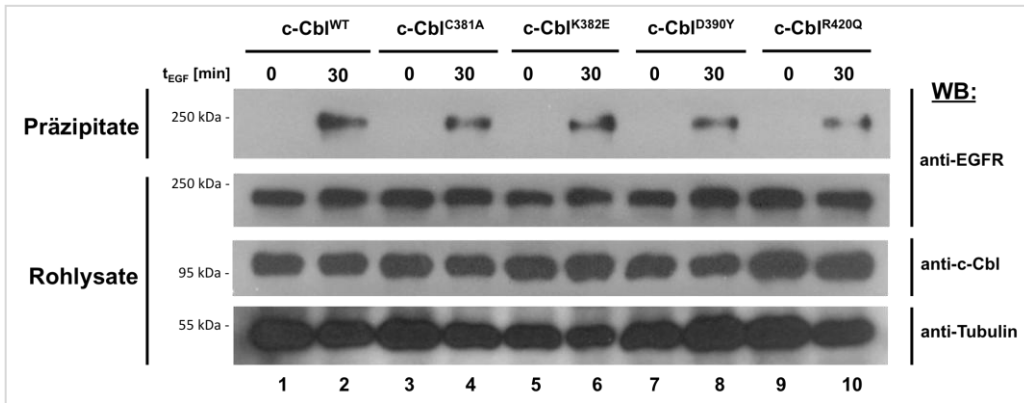
**Abb. 11: EGF-induzierte Abnahme von zelloberflächenständigen EGFR: Semi-quantitative Auswertung von unabhängigen Oberflächen-Biotinylierungsassays**

Das Balkendiagramm zeigt die relative EGFR-Menge an der Zelloberfläche im unstimulierten Zustand (blau) und nach EGF-Stimulation (rot) an. Dafür wurde die EGFR-Menge an der Zelloberfläche zur jeweiligen Gesamt-EGFR-Menge normalisiert. Die aus n unabhängigen Ansätzen gemittelte EGFR-Menge im unstimulierten Zustand wurde jeweils auf 100% gesetzt, und die EGFR-Menge nach 30-minütiger EGF-Stimulation wurde zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt. Angegeben ist der prozentuale Wert ± Standardabweichung. Über den Säulen sind die p-Werte aus dem Student'schen t-Test angegeben.

### III. 2.3 Untersuchung der EGF-Rezeptor-Internalisierung in transient transfizierten COS-7-Zellen mittels Rezeptor-Biotinylierungsassays

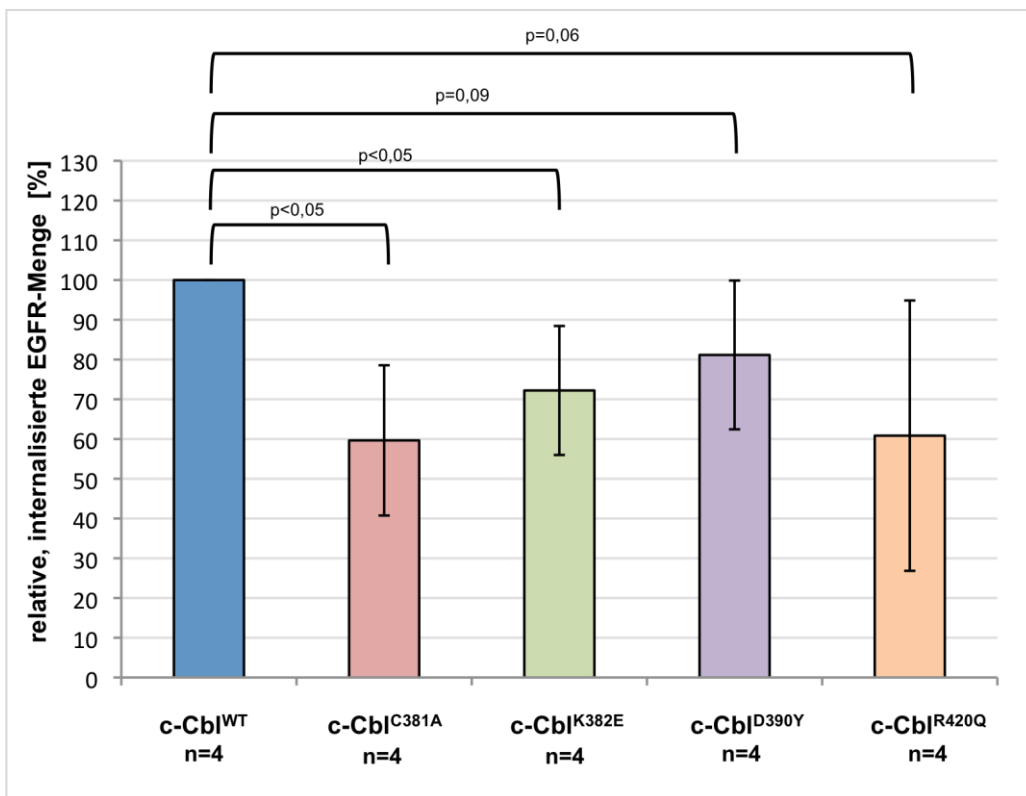
Um Veränderungen bei der EGFR-Internalisierung in *CBL*-Mutanten exprimierenden Zellen aufzudecken, wurden serumentzogene, mit *c-Cbl*<sup>WT</sup>-, *c-Cbl*<sup>C381A</sup>-, *c-Cbl*<sup>K382E</sup>-, *c-Cbl*<sup>D390Y</sup>- oder *c-Cbl*<sup>R420Q</sup>-Konstrukten transient transfizierte COS-7-Zellen Oberflächen-biotinyliert. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten mit 10 ng/ml EGF stimuliert, um eine Internalisierung der EGFR herbeizuführen. Zur Kontrolle blieb je ein Ansatz unstimuliert. Das Biotin von nicht endozytierten Rezeptoren wurde daraufhin durch Waschen mit einem reduzierenden Glutathion-Puffer entfernt, sodass letztendlich nur noch die internalisierten Rezeptoren biotinyliert waren. Nach Zellyse wurden diese mit Streptavidin-Agarose präzipitiert und die erhaltenen Präzipitate ebenso wie die Rohlysate mittels Western-Blot und Immundetektion analysiert. Die Menge an internalisierten EGFR ist demnach in den Präzipitaten, die Gesamtmenge der EGFR (= internalisierte und zellmembranständige EGFR) in den Rohlysaten ersichtlich. Abbildung 12 zeigt, dass ohne EGF-Stimulus nahezu keine EGFR-Internalisierung stattfand (Abb. 12, Präzipitate, Spuren 1, 3, 5, 7, 9). Nach 30-minütiger EGF-Stimulation war jeweils eine gewisse Anzahl an EGFR internalisiert worden (Abb. 12, Präzipitate, Spuren 2, 4, 6, 8, 10). Die Blots aus vier voneinander unabhängig durchgeführter Assays wurden semi-quantitativ mittels densitometrischer Messung der Schwärzung auf den Autoradiogrammen ausgewertet. Die EGFR-Menge in den Präzipitaten (Abb. 12, Präzipitate, Spuren 2, 4, 6, 8, 10) wurde jeweils ins Verhältnis zu der Gesamt-EGFR-Menge in den Rohlysaten (Abb. 12, 2. Zeile) gesetzt, und die arithmetischen Mittelwerte wurden bestimmt. Die Menge an internalisierten EGFR nach 30-minütiger EGF-Stimulation ist für alle untersuchten, die verschiedenen *c-Cbl*-Proteinvarianten exprimierenden Zellen als Balkendiagramm dargestellt (Abb. 13). Dabei wurde die Menge der internalisierten EGFR nach 30-minütiger EGF-Stimulation bei Expression von *c-Cbl*<sup>WT</sup> in jedem Durchgang als 100% gesetzt (Referenzwert).

Im Vergleich zu diesem Referenzwert führte die Expression von *c-Cbl*<sup>C381A</sup> und *c-Cbl*<sup>R420Q</sup> durchschnittlich zu einer um 40% verminderten Menge an intrazellulär lokalisierten EGFR nach 30-minütiger EGF-Stimulation. Wurde *c-Cbl*<sup>K382E</sup> exprimiert, waren 28% weniger EGFR im Cytosol nachweisbar, bei Expression von *c-Cbl*<sup>D390Y</sup> 19% weniger (Abb.13).



**Abb. 12: Internalisierung von EGFR nach 30-minütiger EGF-Stimulation**

Serumentzogene, mit *c-Cbl*<sup>WT</sup>-, *c-Cbl*<sup>C381A</sup>-, *c-Cbl*<sup>K382E</sup>-, *c-Cbl*<sup>D390Y</sup>- oder *c-Cbl*<sup>R420Q</sup>-Konstrukten transfizierte COS-7-Zellen wurden nach Biotinylierung der Oberflächenrezeptoren für 30 Minuten mit 10 ng/ml EGF stimuliert, um eine Internalisierung der EGFR zu induzieren, oder blieben nach Biotinylierung unstimuliert. Unter Abkühlung der Zellen auf Eis wurden an der Zelloberfläche verbliebene Rezeptoren mittels reduzierendem Glutathion-Puffer debiotinyliert und die Zellen daraufhin lysiert. Die Lysate wurden der Präzipitation mit Streptavidin-gekoppelter Agarose zugeführt und die Präzipitate (1. Zeile) sowie Rohlysate (2. Zeile) schließlich nach Western-Blot mittels Immundetektion mit anti-EGFR-Antikörpern analysiert. Ebenso wurde in den Rohlysaten c-Cbl detektiert, um die erfolgreiche Transfektion nachzuweisen. Als Ladekontrolle wurde in den Rohlysaten die Proteinmenge des Haushaltsproteins Tubulin mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die gezeigten Blots stellen repräsentative Ergebnisse aus n=4 unabhängig voneinander durchgeführten Biotinylierungsassays dar. Links neben den Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben. WB, Western-Blot.



**Abb. 13: Semi-quantitative Auswertung der EGFR-Internalisierung**

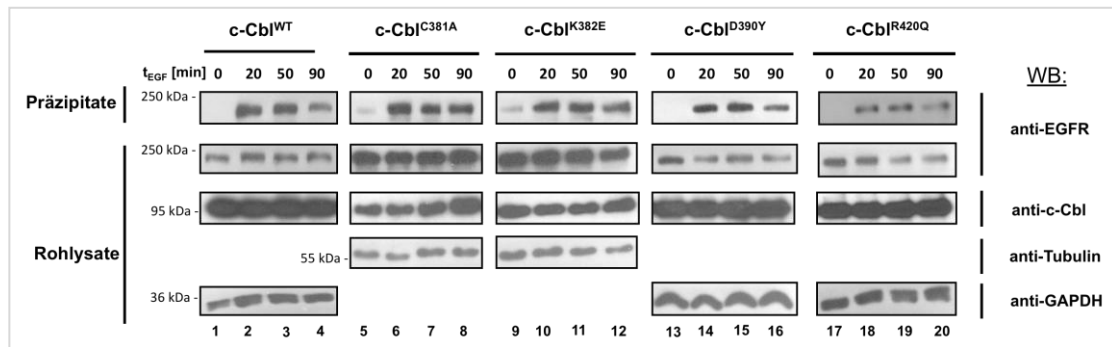
Das Balkendiagramm zeigt die relative endozytierte EGFR-Menge nach 30-minütiger EGF-Stimulation in mit den angegebenen *CBL*-Konstrukten transfizierten COS-7-Zellen. Dazu wurde die endozytierte EGFR-Menge zur jeweiligen Gesamt-EGFR-Menge normalisiert. Die Menge an endozytierten EGFR in *c-Cbl*<sup>WT</sup> exprimierenden Zellen wurde in jedem unabhängigen Experiment (n=4) als 100% gesetzt und die übrigen Werte wurden zu diesem Referenzwert verglichen. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte [in %] ± Standardabweichung angegeben. Über den Säulen sind die p-Werte aus dem Student'schen t-Test angegeben.

### III. 2.4 Analyse des zeitlichen Verlaufs der Internalisierung und Degradierung von EGFR in transient transfizierten COS-7-Zellen mittels Rezeptor-Biotinylierungsassays

Die Ergebnisse aus den Kapiteln III.2.2 und III.2.3 lassen vermuten, dass mutierte c-Cbl-Proteinvarianten in irgendeiner Weise den Prozess der EGFR-Internalisierung beeinflussen. Daher wurde als nächstes der zeitliche Verlauf der EGFR-Internalisierung einschließlich der sich anschließenden Degradierung untersucht.

Dazu wurden, wie im vorherigen Versuch, serumentzogene, mit *c-Cbl*<sup>WT</sup>-, *c-Cbl*<sup>C381A</sup>-, *c-Cbl*<sup>K382E</sup>-, *c-Cbl*<sup>D390Y</sup>- oder *c-Cbl*<sup>R420Q</sup>-Konstrukten transient transfizierte COS-7-Zellen Oberflächen-biotinyliert. Danach wurden die Zellen für 20, 50 oder 90 Minuten mit 20 ng/ml EGF stimuliert. Nach diesen Zeitintervallen wurde das Biotin von nicht endozytierten Rezeptoren durch Waschen mit einem reduzierenden Glutathion-Puffer entfernt, sodass letztendlich nur noch die internalisierten Rezeptoren biotingegeben waren. Zur Kontrolle blieb je ein Ansatz unstimuliert und wurde direkt mit dem Glutathion-Puffer behandelt. Nach anschließender Zelllyse wurden die biotingegebenen Rezeptoren mit Streptavidin-Agarose präzipitiert und die erhaltenen Präzipitate ebenso wie die Rohlysate mittels Western-Blot und Immundetektion analysiert. Die Menge an internalisierten EGFR ist demnach in den Präzipitaten, die Gesamtmenge der EGFR in den Rohlysaten ersichtlich.

Abbildung 14 verdeutlicht, dass ohne EGF-Stimulus nahezu keine EGFR-Internalisierung stattfand (Abb. 14, Präzipitate, Spuren 1, 5, 9, 13, 17). Unter Zugabe von 20 ng/ml EGF kam es zu einer Internalisierung von EGFR, wobei sich die Dynamik des anschließenden EGFR-Traffickings nach Expression der unterschiedlichen c-Cbl-Proteinvarianten als nicht homogen darstellte. Bei Expression von *c-Cbl*<sup>WT</sup>, wie auch von *c-Cbl*<sup>C381A</sup> und *c-Cbl*<sup>K382E</sup>, wurde jeweils nach 20-minütiger EGF-Stimulation die größte Menge an EGFR in den Präzipitaten gemessen (Abb. 14, Präzipitate, Spuren 2, 6, 10). Dagegen wurde bei Expression von *c-Cbl*<sup>D390Y</sup> und *c-Cbl*<sup>R420Q</sup> jeweils nach 50-minütiger EGF-Stimulation die größte EGFR-Menge präzipitiert (Abb. 14, Präzipitate, Spuren 15 und 19). Anschließend konnte in allen Fällen eine Abnahme der EGFR-Menge in den Präzipitaten beobachtet werden.

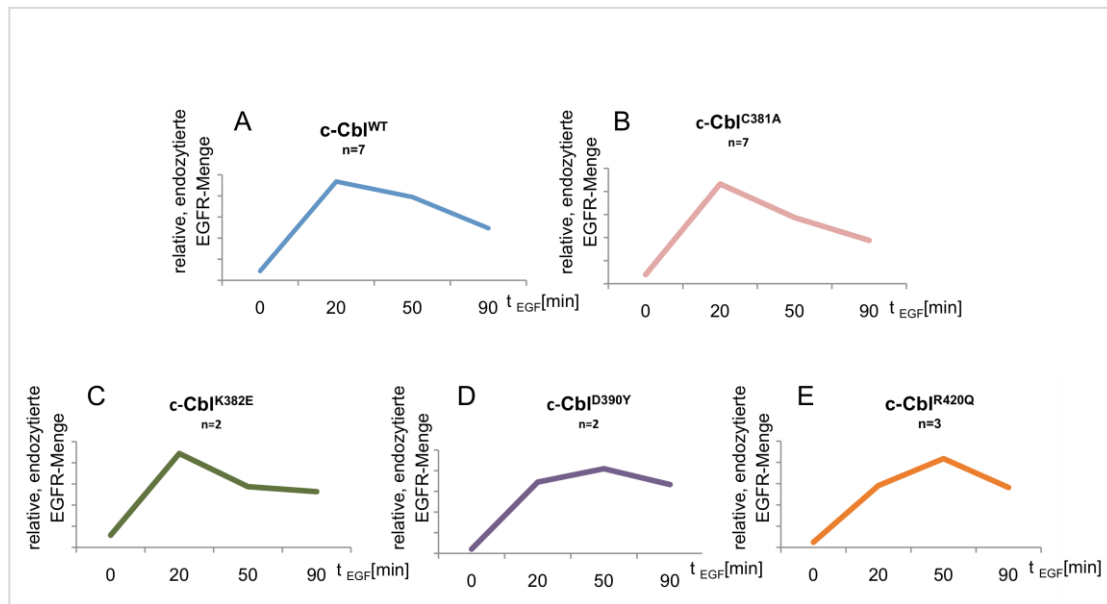


**Abb. 14: Anzahl endozytierter EGFR im Verlauf einer 90-minütigen EGF-Stimulation**

Serumentzogene, mit  $c\text{-Cbl}^{\text{WT}}$ -,  $c\text{-Cbl}^{\text{C381A}}$ -,  $c\text{-Cbl}^{\text{K382E}}$ -,  $c\text{-Cbl}^{\text{D390Y}}$ - oder  $c\text{-Cbl}^{\text{R420Q}}$ -Konstrukten transfizierte COS-7-Zellen wurde nach Biotinylierung der Oberflächenrezeptoren für 20, 50 oder 90 Minuten mit 20 ng/ml EGF stimuliert, um eine Internalisierung der EGFR zu induzieren, oder blieben nach Biotinylierung unstimuliert. Unter Abkühlung der Zellen auf Eis wurden an der Zelloberfläche verbliebene EGFR mittels reduzierendem Glutathion-Puffer debiotinyliert und die Zellen lysiert. Die Lysate wurden der Präzipitation mit Streptavidin-gekoppelter Agarose zugeführt und die Präzipitate (1. Zeile) sowie Rohlysate (2. Zeile) schließlich nach Western-Blot mittels Immundetektion mit anti-EGFR-Antikörpern analysiert. Ebenso wurde in den Rohlysaten c-Cbl detektiert, um die erfolgreiche Transfektion nachzuweisen. Als Ladekontrolle wurde in den Rohlysaten die Proteinmenge des Haushaltsproteins Tubulin bzw. GAPDH mit jeweils einem spezifischen Antikörper detektiert. Die gezeigten Blots stellen repräsentative Ergebnisse aus unabhängig voneinander durchgeführten Biotinylierungsassays dar ( $c\text{-Cbl}^{\text{WT}}$  n=7,  $c\text{-Cbl}^{\text{C381A}}$  n=7,  $c\text{-Cbl}^{\text{K382E}}$  n=2,  $c\text{-Cbl}^{\text{D390Y}}$  n=2,  $c\text{-Cbl}^{\text{R420Q}}$  n=3). Links neben den Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben. WB, Western-Blot.

Die Blots aus voneinander unabhängig durchgeführten Assays ( $c\text{-Cbl}^{\text{WT}}$  n=7,  $c\text{-Cbl}^{\text{C381A}}$  n=7,  $c\text{-Cbl}^{\text{K382E}}$  n=2,  $c\text{-Cbl}^{\text{D390Y}}$  n=2,  $c\text{-Cbl}^{\text{R420Q}}$  n=3) wurden semi-quantitativ mittels densitometrischer Messung der Schwärzung auf den Autoradiogrammen ausgewertet. Die EGFR-Mengen in den Präzipitaten (Abb. 14, Präzipitate) wurden ins Verhältnis zu den jeweiligen Gesamt-EGFR-Mengen in den Rohlysaten (Abb. 14, 2. Zeile) gesetzt und die arithmetischen Mittelwerte bestimmt. Die Menge an präzipitierten EGFR im Verlauf der 90-minütigen EGF-Stimulation ist für alle untersuchten, die verschiedenen c-Cbl-Proteinvarianten exprimierenden Zellen als Liniendiagramm dargestellt (Abb. 15).

Bei Expression von  $c\text{-Cbl}^{\text{WT}}$  war nach 20-minütiger EGF-Stimulation ein Maximum an cytosolischen EGFR nachweisbar. Ab diesem Zeitpunkt nahm im weiteren Verlauf des Experiments die Anzahl der endozytierten EGFR stetig ab, dabei zwischen 20 und 50 Minuten zunächst geringgradig und zwischen 50 und 90 Minuten ausgeprägter (Abb.15, A). Ebenso führte die Expression von  $c\text{-Cbl}^{\text{C381A}}$  bzw.  $c\text{-Cbl}^{\text{K382E}}$  zu einer maximalen Anzahl an intrazellulären EGFR nach 20-minütiger EGF-Stimulation. Jedoch verringerte sich die Menge anschließend zwischen 20 und 50 Minuten rapide, im Vergleich dazu hingegen zwischen 50 und 90 Minuten eher wenig (Abb.15, B und C). Wurde dagegen  $c\text{-Cbl}^{\text{D390Y}}$  oder  $c\text{-Cbl}^{\text{R420Q}}$  exprimiert, fand sich die größte Menge an cytosolischen EGFR erst nach 50-minütiger EGF-Stimulation. Erst ab diesem Zeitpunkt setzte eine erkennbare Abnahme ein (Abb. 15, D und E).



**Abb. 15: Semi-quantitative Auswertung des zeitlichen Verlaufs der EGFR-Internalisierung und Degradierung**

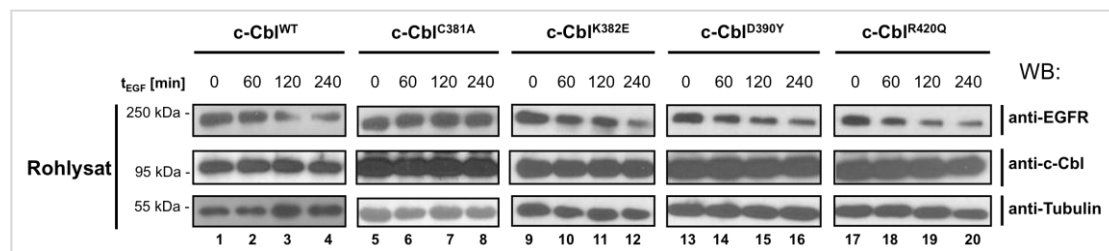
Das Liniendiagramm zeigt die relative endozytierte EGFR-Menge nach 20-, 50- und 90-minütiger EGF-Stimulation in mit den angegebenen *CBL*-Konstrukten transfizierten Zellen. Dazu wurde die endozytierte EGFR-Menge zur jeweiligen Gesamt-EGFR-Menge normalisiert. Die Daten aus *n* unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind als arithmetische Mittelwerte angegeben.

### III. 2.5 Untersuchung der EGF-Rezeptor-Degradierung in transient transfizierten COS-7-Zellen

Wie in der Literatur beschrieben, hängt die EGFR-Degradierung nach EGF-Stimulus stark von c-Cbl ab [Duan et al., 2003, Waterman et al., 1999]. Das abschließende Experiment sollte daher untersuchen, ob die drei pathogenen *CBL*-Mutationen die EGFR-Degradierung beeinflussen. Dafür wurden serumentzogene, mit *c-Cbl*<sup>WT</sup>-, *c-Cbl*<sup>C381A</sup>-, *c-Cbl*<sup>K382E</sup>-, *c-Cbl*<sup>D390Y</sup>- oder *c-Cbl*<sup>R420Q</sup>-Konstrukten transient transfizierte COS-7-Zellen zunächst 30 Minuten mit Cycloheximid inkubiert, um die Proteinbiosynthese während des nachfolgenden Experiments zu unterbinden. Anschließend wurden die Zellen 60, 120 oder 240 Minuten mit EGF- und Cycloheximid-haltigem Hungermedium versetzt. Das Versuchsdesign orientierte sich an dem von Pennock und Mitarbeitern [2008]. Hier war durch die gewählten Zeitpunkte eine Objektivierung der EGFR-Degradierung gut möglich. Nach den genannten Zeitintervallen wurden die Zellen lysiert. Jeweils ein Ansatz wurde nach der Vorbehandlung direkt lysiert. Nach Western-Blotting wurde schließlich die Gesamt-Menge an EGFR in den Rohlysaten mittels Immundetektion festgestellt.

Abbildung 16 zeigt, dass es nach Expression von *c-Cbl*<sup>WT</sup> zu einer stetigen Abnahme der Menge an EGFR nach EGF-Stimulus kam (Abb. 16, 1. Zeile, Spuren 1 bis 4).

Nach Expression von c-Cbl<sup>D390Y</sup> und c-Cbl<sup>R420Q</sup> nahm die EGFR-Anzahl in den Zellen ebenfalls erkennbar ab (Abb. 16, 1. Zeile, Spuren 13 bis 20). In mit c-Cbl<sup>C381A</sup>-Konstrukten transfizierten Zellen dagegen verringerte sich die Gesamt-EGFR-Menge nach EGF-Stimulus nur diskret (Abb. 16, 1. Zeile, Spuren 5 bis 8). In Zellen, die c-Cbl<sup>K382E</sup> exprimierten, nahm die Menge an EGFR im Vergleich zu c-Cbl<sup>WT</sup> verzögert ab (Abb. 16, 1. Zeile, Spuren 9 bis 12).

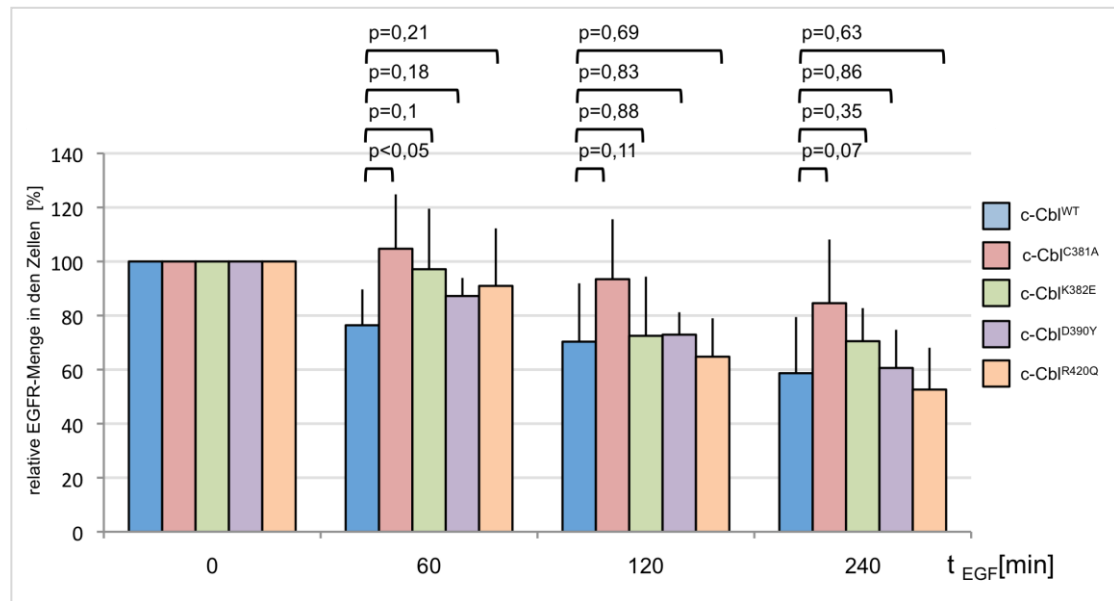


**Abb. 16: Untersuchung der EGF-Rezeptor-Degradierung**

Serumentzogene, mit c-Cbl<sup>WT</sup>-, c-Cbl<sup>C381A</sup>-, c-Cbl<sup>K382E</sup>-, c-Cbl<sup>D390Y</sup>- oder c-Cbl<sup>R420Q</sup>-Konstrukten transfizierte COS-7-Zellen wurden nach Vorbehandlung mit Cycloheximid für 60, 120 oder 240 Minuten mit 20 ng/ml EGF- und 10 ng/ml Cycloheximid-haltigem Hungermedium versetzt. Danach wurden die Zellen lysiert und die Lysate nach Western-Blot mittels Immundetektion mit anti-EGFR-Antikörpern analysiert. Ebenso wurde in den Rohlysaten c-Cbl detektiert, um die erfolgreiche Transfektion nachzuweisen. Als Ladekontrolle wurde in den Rohlysaten die Proteinmenge des Haushaltsproteins Tubulin mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die gezeigten Blots stellen repräsentative Ergebnisse aus n unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar (c-Cbl<sup>WT</sup> n=6, c-Cbl<sup>C381A</sup> n=6, c-Cbl<sup>K382E</sup> n=5, c-Cbl<sup>D390Y</sup> n=5, c-Cbl<sup>R420Q</sup> n=4). Links neben den Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben. WB, Western-Blot.

Die Blots voneinander unabhängig durchgeführter Experimente (c-Cbl<sup>WT</sup> n=6, c-Cbl<sup>C381A</sup> n=6, c-Cbl<sup>K382E</sup> n=5, c-Cbl<sup>D390Y</sup> n=5, c-Cbl<sup>R420Q</sup> n=4) wurden semi-quantitativ mittels densitometrischer Messung der Schwärzung auf den Autoradiogrammen ausgewertet. Die EGFR-Menge in den unstimulierten Zellen (Abb. 16, Spuren 1, 5, 9, 13, 17) wurde jeweils mit der dazugehörigen Tubulin-Menge ins Verhältnis gesetzt und der erhaltene Wert als 100% gesetzt (0-Minuten-Wert). Die nachfolgend gemessenen EGFR-Mengen in den stimulierten Zellen wurden ebenfalls mithilfe der Tubulin-Werte normiert und daraufhin mit dem 0-Minuten-Wert ins Verhältnis gesetzt. Die Gesamt-Menge an EGFR nach 60-, 120- und 240-minütiger EGF-Stimulation ist für alle untersuchten, die verschiedenen c-Cbl-Proteinvarianten exprimierenden Zellen als Balkendiagramm dargestellt (Abb. 17).





**Abb. 17: Quantitative Auswertung der Degradierung von EGFR nach EGF-Stimulation**

Das Balkendiagramm zeigt die relative Gesamt-EGFR-Menge nach 60-, 120- und 240-minütiger EGF-Stimulation in mit den angegebenen *CBL*-Konstrukten transfizierten Zellen. Dazu wurde die EGFR-Menge zur jeweiligen Tubulin-Menge normalisiert. Die Menge an EGFR in den unstimulierten Zellen wurde in jedem unabhängigen Experiment (c-Cbl<sup>WT</sup> n=6, c-Cbl<sup>C381A</sup> n=6, c-Cbl<sup>K382E</sup> n=5, c-Cbl<sup>D390Y</sup> n=5, c-Cbl<sup>R420Q</sup> n=4) als 100% gesetzt und die übrigen nachfolgenden Werte wurden mit diesem Referenzwert verglichen. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte [in %] ± Standardabweichung angegeben. Über den Säulen sind die p-Werte aus dem Student'schen t-Test angegeben.

Bei Expression von c-Cbl<sup>WT</sup> kam es in den Zellen unter EGF-Stimulation zu einer stetigen Abnahme an EGFR, sodass sich nach 240-minütiger EGF-Stimulation die Gesamtmenge um mehr als 40% gemindert hatte. Wurde c-Cbl<sup>C381A</sup> exprimiert, war erst nach 120-minütiger EGF-Stimulation eine diskrete Minderung der EGFR-Gesamtmenge erkennbar, die nach 240-minütiger EGF-Stimulation schließlich 15% betrug. Die Transfektion mit c-Cbl<sup>K382E</sup>-Konstrukten hatte zur Folge, dass die Anzahl an EGFR in den Zellen nach 60-minütiger EGF-Stimulation zunächst annähernd konstant blieb und erst bei den nachfolgenden Messzeitpunkten eine Minderung um 29% feststellbar war. In den Zellen, die c-Cbl<sup>D390Y</sup> und c-Cbl<sup>R420Q</sup> exprimierten, nahm die EGFR-Gesamtmenge anfänglich um 13 bzw. 9% ab und somit weniger als bei Expression von c-Cbl<sup>WT</sup> (24%). Jedoch kam es im Verlauf der weiteren EGF-Stimulation zu einer ähnlich starken EGFR-Degradierung wie bei c-Cbl<sup>WT</sup>, sodass die Gesamt-EGFR-Menge letztendlich um 39% (c-Cbl<sup>D390Y</sup>) bzw. 47% (c-Cbl<sup>R420Q</sup>) verringert wurde (40% bei c-Cbl<sup>WT</sup>).

## IV Diskussion

### IV. 1 Keine pathogene Mutation in *CBL* bei 185 Patienten mit Noonan-Syndrom bzw. dazu ähnlichem Krankheitsbild

Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte *CBL*-Sequenzierung wurde bei 185 Patienten mit Noonan-Syndrom bzw. dazu ähnlichem Krankheitsbild keine pathogene Mutation in Exon 7, 8 oder 9 identifiziert (Kap. III.1). Ursprünglich gerieten *CBL*-Mutationen in den Fokus, als mehrere Arbeitsgruppen genetische Ursachen der JMML erforschten. Dabei konnte gezeigt werden, dass JMML in ca. 10% der Fälle durch somatische Mutationen in Exon 8 oder 9 von *CBL* bedingt ist [Loh et al., 2009, Makishima et al., 2009]. In diesen Studien gab es noch keinen Anhalt für eine Verbindung zwischen Keimbahn-Mutationen in *CBL* und einem kongenitalen klinischen Phänotyp.

Kurz darauf berichteten Niemeyer und Mitarbeiter [2010] sowie Perez und Mitarbeiter [2010], dass ein kleiner Prozentsatz der an JMML erkrankten Personen (3/21 bzw. 3/65) Noonan-Syndrom typische Merkmale zeigt und die zwei entdeckten Keimbahnmutationen (c.1111T>C/p.Y371H, c.1150T>C/p.C384R) Exon 8 von *CBL* betreffen. Die phänotypischen Merkmale dieser Mutationsträger sind variabel und reichen von Hypertelorismus, Epikanthus, Ptosis und hoher prominenter Stirn bis hin zu tief ansetzenden Ohren und Kleinwuchs. Einige Autoren fassten diese Klinik unter dem Begriff *CBL syndrome* zusammen [Perez et al., 2010]. Bei einem weiteren *CBL*-Screening, das von Martinelli und Mitarbeitern [2010] durchgeführt wurde, konnten weitere *CBL*-Keimbahnmutationen ausfindig gemacht werden. Bei 4 von 365 (ca. 1%) Patienten mit Noonan-Syndrom bzw. einem dazu ähnlichen klinischen Bild wurden vier verschiedene Mutationen in Exon 8 (c.1100A>G/p.Q367R, c.1144A>G/p.K382E, c.1168G>T/p.D390Y) bzw. 9 (c.1259G>A/p.R420Q) von *CBL* entdeckt. Diese Patienten waren nicht an Leukämie erkrankt, zeigten aber eine Ausprägung von Merkmalen, die für das Noonan-Syndrom typisch sind: Hypertelorismus, Ptosis, Epikanthus, nach hinten rotierte Ohren, Pterigium colli, Kleinwuchs, Anomalien des Thorax und des Herzen.

In diesem Kontext wird deutlich, dass Mutationen in *CBL* einen sehr heterogenen Phänotyp bedingen können. Der Phänotyp einiger Mutationsträger überschneidet sich in vielerlei Hinsicht zwar mit dem des Noonan-Syndroms, allerdings wurden auch Keimbahn-Mutationen in Exon 8 oder 9 entdeckt, die nahezu keine Auswirkungen auf den Phänotyp haben [Niemeyer et al., 2010]. Diese starke

phänotypische Heterogenität bedeutet für ein *CBL*-Screening, dass eine klinisch sehr heterogene Gruppe gescreent werden sollte, da der Phänotyp von *CBL*-Mutationsträgern schwer eingegrenzt werden kann. Dieses Kriterium trifft für das in dieser Arbeit durchgeführte Screening auf die Kohorte 3 zu.

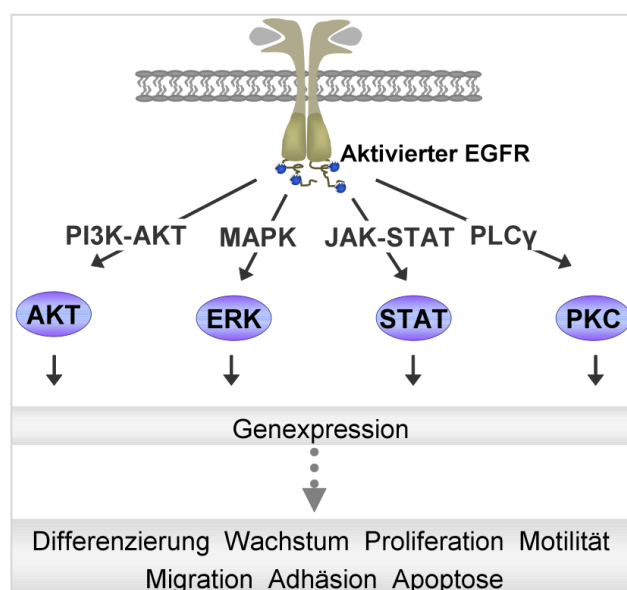
Gleichzeitig wird auch ersichtlich, dass Mutationen in *CBL* nur sehr selten gefunden werden, wenn das *CBL*-Screening sich nach klinischen Merkmalen richtet (Noonan-Syndrom bzw. ein dazu ähnliches klinisches Bild) [Martinelli et al., 2010]. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der Heterogenität dieser Erkrankungen. Für das Noonan-Syndrom kennt man aktuell sechs Krankheitsgene, in denen bei ca. 83% der Fälle Mutationen entdeckt werden [Tartaglia et al., 2010]. Diese Gene kodieren für Proteine aus dem RAS-MAPK-Signalweg. Man nimmt derzeit an, dass auch die restlichen 17% der Fälle auf Mutationen in weiteren Genen, welche für Proteine aus dem RAS-MAPK-Signalweg kodieren, zurückzuführen sind.

Daneben ist denkbar, dass die Patienten aus den hier untersuchten drei Kohorten pathogene Mutationen in anderen als den untersuchten Exons 7, 8 und 9 von *CBL* tragen und dass diese somit vom durchgeführten Screening nicht erfasst wurden. Diese drei Exons gelten als *hot spots*, da erstens krankheitsassoziierte *CBL*-Mutationen bisher überwiegend in diesen Exons gefunden wurden und zweitens diverse Mutationen in diesem Bereich die Aktivität von c-Cbl besonders drastisch herabsetzen, was zu erhöhter Signalweiterleitung führt [Martinelli et al., 2010, Niemeyer et al., 2010, Perez et al., 2010, Sargin et al., 2007, Thien et al., 2001]. Dennoch könnten auch Mutationen in den anderen der insgesamt 16 Exons, in intronischen oder regulatorischen Genabschnitten zu veränderter c-Cbl-Expression oder -Funktion führen. So konnten Aranaz und Mitarbeiter [2012] zeigen, dass somatische Mutationen in der Prolin-reichen Region (Exon 10) von c-Cbl ebenfalls myeloproliferative Neoplasien hervorrufen und erhöhtes *Downstream Signaling* bewirken [Aranaz et al., 2012].

Insgesamt sind Mutationen in *CBL* vermutlich auch bei intensiven Anstrengungen sehr selten bei Patienten mit Noonan-Syndrom bzw. dazu ähnlichem Krankheitsbild zu finden. Dennoch ist eine Analyse des *CBL*-Gens bei diesen Patienten zur möglichen Bestätigung einer klinischen Diagnose empfehlenswert. Es ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit untersuchten 185 Patienten eine andere, bisher nicht identifizierte genetische Veränderung aufweisen.

## IV. 2 Die CBL-Aminosäuresubstitutionen p.K382E, p.D390Y und p.R420Q vermindern die Internalisierung und Degradierung von EGFR nach EGF-Stimulus und haben Auswirkungen auf das intrazelluläre EGFR-Trafficking

EGFR, die zur Klasse der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) gezählt werden, kommen in nahezu allen humanen Zellen vor. Bei extrazellulärer Bindung von EGF generieren diese Rezeptoren innerhalb der Zellen unter anderem proliferative und anti-apoptotische Signale. Dies wiederum führt zu einer veränderten Genexpression, was letztendlich zelluläre Prozesse steuert. Am Anfang dieser Signaltransduktion steht die Liganden-induzierte Rezeptordimerisierung und -autophosphorylierung. Über spezifische Adaptorproteine und Enzyme werden sodann unterschiedliche Signalkaskaden in Gang gesetzt, u.a. der RAS-MAPK-Signalweg, der Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K-AKT)-Signalweg, die Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ )-Kaskade sowie der *Janus Kinase signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT)-Signalweg (s. Abb. 18) [Yarden et al., 2001]. c-Cbl terminiert diese Signalübertragung durch Rezeptor-Ubiquitylierung: Auf diese Weise markierte Rezeptoren, welche den Anfangspunkt des intrazellulären Signaltransduktionsprozesses darstellen, werden internalisiert, prozessiert und lysosomal degradiert. Im Folgenden werden die Auswirkungen der Aminosäureaustausche p.K382E, p.D390Y und p.R420Q in c-Cbl auf diesen empfindlichen Mechanismus der *receptor downregulation* diskutiert.



**Abb. 18: EGFR-abhängige Signalwege**

Aktivierter EGFR stellen den Ausgangspunkt mehrerer Signalkaskaden dar. Dazu zählen der PI3K-AKT-Signalweg, der zur Aktivierung der AKT-Kinase führt, die RAS-MAPK-Signalkaskade, die zur Aktivierung von ERK führt, der JAK-STAT-Signalweg, der in der Aktivierung von STAT resultiert, und die PLC $\gamma$ -Kaskade, die zur Aktivierung der PKC führt. Über diese Signalwege wird in erster Linie die Genexpression differenziell reguliert und so die Kontrolle vieler zellulärer Prozesse ermöglicht. PI3K, Phosphatidylinositol-3'-Kinase; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; JAK, Janus-Kinase; STAT, *signal transducer and activator of transcription*; PLC $\gamma$ , Phospholipase C $\gamma$ ; PKC, Proteinkinase C.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Menge von zelloberflächenständigem EGFR nach 30-minütiger EGF-Stimulation bei Expression von c-Cbl<sup>C381A</sup>, c-Cbl<sup>K382E</sup>, c-Cbl<sup>D390Y</sup> oder c-Cbl<sup>R420Q</sup> zu einem geringeren Prozentsatz abnimmt, als bei Expression von c-Cbl<sup>WT</sup> (Kap. III.2.2). Dementsprechend führte die Expression von c-Cbl<sup>C381A</sup>, c-Cbl<sup>K382E</sup>, c-Cbl<sup>D390Y</sup> oder c-Cbl<sup>R420Q</sup> zu einer Reduzierung der intrazellulären EGFR-Menge nach 30-minütiger EGF-Stimulation, verglichen mit Zellen, die c-Cbl<sup>WT</sup> exprimierten (Kap. III.2.3). Die bei Expression der c-Cbl-Mutanten beobachteten zellmembranständigen bzw. intrazellulären EGFR-Mengen sind entweder durch verminderte EGFR-Internalisierung zu erklären, oder die EGFR werden nach erfolgter Internalisierung verstärkt recycled. Letzterer Prozess, bei dem Rezeptoren zurück zur Zelloberfläche dirigiert werden, gilt als physiologisch [Sorkin et al., 1991]. Es ist bereits bekannt, dass gewisse c-Cbl-Varianten, darunter c-Cbl<sup>C381A</sup>, zu einem vermehrten Recycling führen [Thien et al., 2001]; diese Auswirkungen sind jedoch hauptsächlich erst später nach EGF-Stimulation messbar und nicht nach 30 min. EGF-Stimulation, wie in den hier durchgeführten Experimenten. Darüberhinaus wurde zudem gezeigt, dass Aminosäureaustausche in der RING-Domäne von c-Cbl (u.a. p.C381A und p.R420Q) die EGFR-Internalisierungsrate senken [Jiang et al., 2003, Sargin et al., 2007, Thien et al., 2001]. Daher deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass p.C381A, p.K382E, p.D390Y und p.R420Q zu einer verminderten EGFR-Internalisierung führen und stützen somit die These, nach der eine intakte RING-Domäne von c-Cbl für die effiziente EGFR-Internalisierung unabdingbar ist [Huang et al., 2005, Jiang et al., 2003]. Weitere Versuchsdurchläufe unter Einsatz von Recycling-Inhibitoren sollten durchgeführt werden, um den Effekt der c-Cbl-Aminosäureaustausche auf die EGFR-Internalisierung weiterführend zu analysieren.

Hinsichtlich der zugrundeliegenden Pathophysiologie gibt es unterschiedliche Befunde: Für c-Cbl<sup>C381A</sup> wurde gezeigt, dass die Ubiquitin-Ligase-Aktivität stark herabgesetzt ist, was sich in einer verminderten EGFR-Ubiquitylierung nach EGF-Stimulus äußert. Dies wurde zunächst von einigen Arbeitsgruppen als Grund für die beobachtete verminderte Internalisierungsrate angeführt [Marmor et al., 2004, Waterman et al., 1999]. Andererseits wurde nachgewiesen, dass eine Ubiquitylierung von aktivierten EGFR für die nachfolgende Internalisierung kaum von Bedeutung ist [Huang et al., 2007, Jiang et al., 2003]. c-Cbl vermittelt daher wohl vielmehr durch Ubiquitylierung spezieller Endozytose-assoziiierter Proteine, wie z.B. Eps15, Eps15R und epsin, die EGFR-Internalisierung. Diese Proteine gelten als Adaptorproteine und vermitteln nach EGF-induzierter Ubiquitylierung die Endozytose von ubiquitylierten Molekülen wie EGFR [Jiang et al., 2003, van Delft et al., 1997]. Eine

mutationsbedingt eingeschränkte Ubiquitin-Ligase-Aktivität der untersuchten c-Cbl-Mutanten (für c-Cbl<sup>C381A</sup> und c-Cbl<sup>R420Q</sup> bereits gezeigt [Sargin et al., 2007, Thien et al., 2001]) könnte den Prozess der EGFR-Internalisierung daher wie beobachtet beeinflussen. Eine andere Theorie besagt, dass die EGFR-Internalisierung von einer direkten Interaktion zwischen der RING-Domäne von c-Cbl und noch unbekanntem Proteinen abhängig ist [Huang et al., 2007, Jiang et al., 2003]. Die in der RING-Domäne gelegenen Aminosäuresubstitutionen könnten diese Protein-Protein-Wechselwirkung beeinträchtigen. Dass c-Cbl durch direkte Interaktion mit bestimmten Proteinen an der EGFR-Internalisierung beteiligt ist, konnte bereits mehrfach gezeigt werden: Wird eine Interaktion zwischen dem *Cbl-interacting protein of 85K* (CIN85) - ein endozytotisches Adaptorprotein - und c-Cbl inhibiert, ist eine verminderte EGF-stimulierte EGFR-Internalisierung zu beobachten [Soubeyran et al., 2002]. Ebenso bildet das *Scaffold*-Protein Intersectin einen Komplex mit c-Cbl. Kommt diese Interaktion nicht zustande, zeigt sich ebenfalls eine herabgesetzte EGFR-Internalisierung [Martin et al., 2006]. Diese Interaktionen werden jedoch nicht durch die RING-Domäne von c-Cbl vermittelt (CIN85 und Intersectin interagieren über die Prolin-reiche Domäne mit c-Cbl [Martin et al., 2006, Schmidt et al., 2005]).

Die EGFR-Internalisierung ist größtenteils ca. 15-20 min. nach EGF-Stimulus abgeschlossen [Roepstorff et al., 2009, Schmidt-Glenewinkel et al., 2009, Thien et al., 2001]. Die nach stattgefundenener Internalisierung in Endosomen befindlichen Rezeptoren werden entweder recycled oder lysosomal degradiert. Der schnelle Recycling-Weg führt ca. 10 min. nach EGF-Stimulus eine kleine Fraktion von internalisierten EGFR von frühen Endosomen zurück zur Zelloberfläche. Ein langsamer Recycling-Weg von späten Endosomen/MVBs, über den deutlich mehr EGFR zurück zur Zelloberfläche gelangen, ist ab ca. 30 min. nach EGF-Stimulus objektivierbar [Kornilova et al., 1996, Sorkin et al., 2008, Waterman et al., 2001, Wiley, 2003, Wiley et al., 2003]. Unter Berücksichtigung der Zeitdauer für intrazelluläres Trafficking sollte der Vorgang des Recyclings zwischen 20 und 50 min. nach EGF-Stimulus nachweisbar sein. Die lysosomale Degradierung setzt ca. 40-60 min. nach EGF-Stimulus ein [Waterman et al., 2001, Wiley, 2003, Wiley et al., 2003]. Aus diesen Überlegungen ergibt sich folgende Interpretationsmöglichkeit für die in Kap. III.2.4 beschriebenen Ergebnisse: Die Zunahme der cytosolischen EGFR-Konzentration 20 min. nach EGF-Stimulus hängt in erster Linie von der Rate der Internalisierung ab, eine Veränderung dieser Konzentration bis zum Zeitpunkt 50 min. nach Stimulus hängt größtenteils von der Recyclingrate ab, und die Abnahme bis 90 min. nach Stimulus ist auf lysosomale Degradierung zurückzuführen.

Bei Expression von c-Cbl<sup>WT</sup> zeigte sich nach 20-minütiger EGF-Stimulation ein Maximum an intrazellulärem EGFR. Die Menge nahm daraufhin bis zum Zeitpunkt 50-minütiger EGF-Stimulation nur minimal ab, was auf eine geringe Recycling-Rate schließen lässt. Diese Beobachtung wurde ebenso in anderen Studien gemacht, in denen die EGFR-Recycling-Rate in c-Cbl<sup>WT</sup> überexprimierenden Zellen untersucht wurde [Levkowitz et al., 1999, Levkowitz et al., 1998, Lill et al., 2000, Waterman et al., 1999]. Die im weiteren Verlauf beobachtete deutliche Abnahme an cytosolischen EGFR ist auf lysosomale Degradierung zurückzuführen [Waterman et al., 2001, Wiley, 2003, Wiley et al., 2003]. Bei Expression von c-Cbl<sup>C381A</sup> oder c-Cbl<sup>K382E</sup> war jeweils die Menge an intrazellulärem EGFR ebenfalls nach 20-minütiger EGF-Stimulation am größten. Zwischen 20 und 50 Minuten wurde jedoch eine markante Abnahme von cytosolischen EGFR beobachtet, was auf effizientes Recycling hindeutet. Effektives EGFR-Recycling wurde bereits in c-Cbl<sup>C381A</sup>-exprimierenden Zellen beschrieben [Thien et al., 2001]. Im anschließenden Zeitintervall zwischen 50 und 90 Minuten verringerte sich die Menge an intrazellulärem EGFR dagegen nur geringfügig, was auf eine verminderte EGFR-Degradierung hinweisen könnte. Die Expression von c-Cbl<sup>D390Y</sup> oder c-Cbl<sup>R420Q</sup> führte zu einer maximalen Anzahl an cytosolischen EGFR nach 50-minütiger EGF-Stimulation, was auf erniedrigte Recycling-Raten sowie eingeschränkte EGFR-Degradierung hindeuten könnte. Eine Verminderung der intrazellulären EGFR-Konzentration im weiteren Verlauf des Experiments lässt auf eine langfristig funktionierende lysosomale Degradierung in Zellen, welche c-Cbl<sup>D390Y</sup> oder c-Cbl<sup>R420Q</sup> exprimieren, schließen.

Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass die Expression von c-Cbl<sup>C381A</sup> oder c-Cbl<sup>K382E</sup> zu einer verminderten EGFR-Degradierung führt, während das Recycling erhöht zu sein scheint. Die Expression von c-Cbl<sup>D390Y</sup> oder c-Cbl<sup>R420Q</sup> dagegen führt zu einer erniedrigten Recycling-Rate, vermutlich in Kombination mit einer vorübergehend eingeschränkten EGFR-Degradierung. In weiterführenden Experimenten sollten Exozytose-Assays durchgeführt werden, um eine fokussierte Betrachtung des Recyclings zu ermöglichen.

Die Analyse der EGFR-Degradierung bei Expression der unterschiedlichen c-Cbl-Varianten ergab für c-Cbl<sup>WT</sup> eine effiziente EGFR-Degradierung. In c-Cbl<sup>C381A</sup> exprimierenden Zellen hingegen war die EGFR-Degradierung eingeschränkt, was auch schon anderswo berichtet wurde [Thien et al., 2001, Waterman et al., 1999]. Ähnliches war auch in c-Cbl<sup>K382E</sup>-exprimierenden Zellen erkennbar. Für c-Cbl<sup>D390Y</sup> und c-Cbl<sup>R420Q</sup> konnte gezeigt werden, dass die EGFR-Degradierung später einsetzt, langfristig jedoch effizient ist. Ursächlich für die beobachtete eingeschränkte bzw.

verzögerte EGFR-Degradierung in den Zellen ist wahrscheinlich eine reduzierte c-Cbl-abhängige EGFR-Ubiquitylierung als Voraussetzung für eine effiziente lysosomale Degradierung [Levkowitz et al., 1999, Levkowitz et al., 1998, Masson et al., 2006]. Eignet sich keine oder eine unzureichende Ubiquitylierung, schlägt die Sortierung dieser Rezeptoren durch den ESCRT-Komplex fehl, sodass die Rezeptoren nicht durch Invagination in intraluminale Vesikel (ILVs) der gereiften MVBs eingeschlossen werden und folglich nicht lysosomal degradiert werden. Neueste Studien zeigen, dass diese Sortierung auf einer Interaktion zwischen den ubiquitylierten Rezeptoren und der Ubiquitin-bindenden Domäne des ESCRT0-Komplexes Hrs/STAM beruht, die durch Unregelmäßigkeiten im Rezeptor-Ubiquitylierungsmuster gestört wird [Eden et al., 2012].

Ein erniedrigtes Ubiquitin-Ligase-Potential von c-Cbl<sup>C381A</sup> und c-Cbl<sup>R420Q</sup> wurde bereits nachgewiesen [Sargin et al., 2007, Thien et al., 2001]. Da auch viele weitere Aminosäuresubstitutionen in der RING-Domäne von c-Cbl das Ubiquitin-Ligase-Potential reduzieren können [Thien et al., 2001], ist auch im Fall von c-Cbl<sup>K382E</sup> und c-Cbl<sup>D390Y</sup> von einer abgeschwächten Ubiquitin-Ligase-Aktivität auszugehen. Die Durchführung von Ubiquitylierungsassays sollte zur Verifizierung angestrebt werden.

Zusammengefasst ergibt die vorliegende Arbeit deutliche Hinweise darauf, dass die untersuchten Mutationen in *CBL* jeweils zu verändertem EGFR-Trafficking nach EGF-Stimulus führen. Betroffen davon sind, wie in Abb. 19 veranschaulicht, die Internalisierung, das Trafficking und die Degradierung der Rezeptoren. Alle untersuchten c-Cbl-Varianten gingen mit einer verringerten EGFR-Internalisierung nach EGF-Stimulation einher. c-Cbl<sup>C381A</sup> und c-Cbl<sup>K382E</sup> führen vermutlich zu erhöhtem EGFR-Recycling, c-Cbl<sup>D390Y</sup> und c-Cbl<sup>R420Q</sup> scheinen das Recycling zu hemmen. Die EGFR-Degradierung war bei c-Cbl<sup>C381A</sup> und c-Cbl<sup>K382E</sup> über den gesamten Zeitraum eingeschränkt, bei c-Cbl<sup>D390Y</sup> und c-Cbl<sup>R420Q</sup> anfänglich verzögert. Es wird geschlussfolgert, dass die beobachteten funktionellen Auswirkungen durch einen Funktionsverlust von c-Cbl verursacht werden, den die Mutationen in *CBL* nach sich ziehen: Wie für c-Cbl<sup>C381A</sup> und c-Cbl<sup>R420Q</sup> bereits gezeigt wurde, ist auch im Fall von c-Cbl<sup>K382E</sup> und c-Cbl<sup>D390Y</sup> von einer mutationsbedingten erniedrigten Ubiquitin-Ligase-Aktivität auszugehen.

Der molekulare Grund dafür, dass sich dieser Effekt auf die Internalisierung auswirkt, könnte von einer inadäquaten Ubiquitylierung von endozytotischen Proteinen herrühren, was die EGFR-Internalisierung behindern könnte. Ein vermehrtes bzw. vermindertes Recycling könnte durch eine fehlerhafte Ubiquitylierung der EGFR selbst bedingt sein. Wenn dadurch deren ESCRT-vermittelte Prozessierung in MVBs





### IV. 3 Heterozygote Keimbahnmutationen in *CBL* erhöhen die intrazelluläre Signaltransduktion und prädisponieren für Leukämie

Die in IV.2 diskutierten Auswirkungen der untersuchten Aminosäureaustausche in c-Cbl auf das EGFR-Trafficking führen zu einem erhöhten Signalfuss über EGFR-abhängige Signalwege: Zellen, in denen die EGFR-Internalisierung verzögert abläuft, zeigen eine um ein Vielfaches erhöhte EGF-Sensitivität [Wells et al., 1990], und man konnte ein verstärktes Signaling über die Phospholipase Cy-Kaskade nachweisen [Vieira et al., 1996]. Analysen der Auswirkungen eines gesteigerten EGFR-Recyclings auf die intrazelluläre Signaltransduktion zeigten ein verstärktes Signaling über den RAS-MAPK-Signalweg [Babst et al., 2000]. In Zellen mit eingeschränkter EGFR-Degradierung wurden erhöhte Phosphorylierungslevel von Signalproteinen des RAS-MAPK-Signalweges sowie des PI3K-AKT-Signalweges gemessen [Shtiegman et al., 2007]. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Martinelli und Mitarbeitern [2010] sowie von Sargin und Mitarbeitern [2007], die nach Expression von c-Cbl<sup>D390Y</sup> bzw. c-Cbl<sup>R420Q</sup> erhöhte Phosphorylierungslevel von ERK und AKT fanden. Auch für c-Cbl<sup>K382E</sup> sollten Phosphorylierungsassays wichtiger Signalproteine EGFR-abhängiger Signalkaskaden (AKT, MEK1/2 und ERK1/2) in weiterführenden Experimenten durchgeführt werden, um diese Analysen zu komplettieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen somit die molekularen Mechanismen, die bei verschiedenen Mutationen in *CBL* zu einer erhöhten EGFR-abhängigen Signaltransduktion führen.

Dieser verstärkte Signalfuss führt bei den in dieser Arbeit untersuchten Mutationsträgern zu einem „Noonan-like syndrome“-Phänotyp. Über Erkrankungen des blutbildenden Systems wird nicht berichtet [Martinelli et al., 2010]. Dass die betroffenen Individuen jedoch für Leukämien prädisponiert sind, wird folgend deutlich: Bei Patienten, die an JMML, chronisch myelomonozytärer Leukämie (CMML), chronisch myeloischer Leukämie (CML) oder akuter myeloischer Leukämie (AML) erkrankt sind, wurden in einigen Fällen in den leukämischen Blasten homozygote *CBL*-Mutationen entdeckt, die in anderen somatischen Zellen der Erkrankten in heterozygotem Zustand vorliegen [Loh et al., 2009, Niemeyer et al., 2010, Perez et al., 2010]. Die Tumorgenese wird in diesen Fällen auf eine erworbene uniparentale Isodisomie (UPD) der Region 11q23 zurückgeführt, was den Verlust des gesunden *CBL*-Allels in den betroffenen hämatopoetischen Zellen zur Folge hatte [*copy-neutral loss of heterozygosity* (LOH)] [Dunbar et al., 2008, Grand et al., 2009, Loh et al., 2009, Sanada et al., 2009]. Somit muss davon ausgegangen werden, dass

heterozygote *CBL*-Keimbahnmutationen im Sinne der Knudson-Hypothese den *first hit* darstellen, der bestimmte Zellen gegenüber wachstumsfördernden Faktoren sensibilisiert. Die Folge können sehr variable phänotypische Merkmale sein. Kommt es jedoch zu weiteren Mutationsereignissen im Sinne eines *second hit*, steigt die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung der betroffenen Zellen, vermutlich durch deutliche Wachstumsvorteile [Knudson, 1971]. Dazu passt, dass heterozygote *CBL*-Mutationen, im Gegensatz zu homozygoten *CBL*-Mutationen, in der Minderheit der Fälle in Tumorzellen bei Leukämien entdeckt wurden. Auch *in vitro* Experimente zeigten, dass vielmehr das homozygote Vorliegen einer bestimmten *CBL*-Mutation zu einer gravierenden Wachstumshormon-Hypersensibilität von Zellen führt, während die Co-Expression von *c-Cbl*<sup>WT</sup> diese Sensibilität abschwächt [Sanada et al., 2009].

Die in dieser Arbeit gewonnenen Einblicke tragen dazu bei, die Auswirkungen von Mutationen in *CBL* auf den menschlichen Organismus besser zu verstehen. Durch Aufschlüsselung der zellulären Mechanismen kann jetzt besser nachvollzogen werden, wie die Mutationen eine verstärkte Signalweiterleitung über EGFR-abhängige Signalwege bewirken. Da *CBL*-Mutationen Leukämie hervorrufen können und heterozygote *CBL*-Keimbahnmutationen als Risikofaktor hierfür gelten, tragen die Ergebnisse dieser Arbeit unter Umständen zu therapeutischen Ansätzen bei.

## V Zusammenfassung

Beim Noonan-Syndrom handelt es sich um ein autosomal-dominant erbliches Fehlbildungssyndrom, das durch Kleinwuchs, typische faciale Dysmorphien, angeborene Herzanomalien, Lernschwierigkeiten und eine Prädisposition für hämatologische Tumorerkrankungen gekennzeichnet ist. Bisher sind sechs Krankheitsgene für das Noonan-Syndrom bekannt: *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *NRAS* und *SHOC2*. Heterozygote Mutationen in einem dieser Gene führen zu einer gesteigerten Signaltransduktion innerhalb des RAS (*rat sarcoma*)-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweges. Keimbahnmutationen in *CBL* [*Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence*] wurden mit einem zum Noonan-Syndrom ähnlichen klinischen Bild in Verbindung gebracht. *CBL* codiert für ein multivalentes Adaptorprotein (c-Cbl) mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, das an der Regulation des vesikulären Transports (Traffickings) vom epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-Rezeptor) beteiligt ist. Zum einen vermittelt c-Cbl über einen noch unbekanntem Mechanismus die Vesikel-gestützte Endozytose (Internalisierung) des EGF-Rezeptors, zum anderen markiert c-Cbl durch Ubiquitylierung aktivierte EGF-Rezeptoren für den Lysosomen-vermittelten Abbau (Degradierung). EGF-Rezeptoren können darüber hinaus auch zurück zur Zellmembran dirigiert werden (Recycling). Über diese regulatorischen Eigenschaften ist c-Cbl an der Kontrolle von EGF-Rezeptor-abhängigen proliferativen Signalkaskaden, wie etwa des RAS-MAPK-Signalweges, beteiligt.

Eine im ersten Teil der vorliegenden Arbeit durchgeführte DNA-Sequenzanalyse des *CBL*-Gens bei insgesamt 185 bisher mutationsnegativen Patienten mit Noonan-Syndrom bzw. dazu ähnlichem klinischem Bild ergab keine pathogene Mutation.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die funktionellen Auswirkungen der bereits beschriebenen krankheitsassoziierten *CBL*-Keimbahnmutationen c.1100A>C (p.K382E), c.1144A>G (p.D390Y) und c.1168G>T (p.R420Q) auf das EGF-Rezeptor-Trafficking analysiert. Hierfür wurden mithilfe PCR-vermittelter Mutagenese entsprechende *CBL*-cDNA-Konstrukte hergestellt und die entsprechenden Mutantenproteine in COS-7-Zellen transient exprimiert. In diesen Zellen wurde sodann das EGF-Rezeptor-Trafficking mithilfe von Rezeptor-Biotinylierungsassays untersucht. Dazu wurden vor oder nach EGF-Stimulation der Zellen die oberflächenständigen EGF-Rezeptoren biotinyliert, danach die internalisierte bzw. oberflächenständige EGF-Rezeptor-Fraktion durch Streptavidin-Präzipitation aufgereinigt und schließlich mittels Westernblot-Analysen quantifiziert. Es konnte

nachgewiesen werden, dass alle untersuchten mutanten c-Cbl-Proteine zu einer verminderten EGF-induzierten EGF-Rezeptor-Internalisierung führen. Darüber hinaus war nach erfolgter EGF-Rezeptor-Internalisierung das intrazelluläre Trafficking der EGF-Rezeptoren verändert: Während die Überexpression von c-Cbl<sup>K382E</sup> das Recycling fördert und die EGF-Rezeptor-Degradierung beeinträchtigt, führen die Proteinmutanten c-Cbl<sup>D390Y</sup> und c-Cbl<sup>R420Q</sup> höchstwahrscheinlich zu einem verminderten Recycling und einer kurzfristig verzögerten EGF-Rezeptor-Degradierung.

Zusammengenommen zeigt diese Studie, dass die untersuchten Mutationen in *CBL* markante Auswirkungen auf das EGF-Rezeptor-Trafficking haben, womit ein neuer molekularer Pathomechanismus zur Entstehung eines Noonan-Syndrom-ähnlichen Krankheitsbildes beschrieben werden kann.

## VI Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
BSA	bovine serum albumine
Bp	Basenpaare
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
COS-7	Fibroblasten ähnliche Nierenzellen (afrikanische grüne Meerkatze)
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium (Zellkulturmedium)
DNA	desoxyribonucleic acid
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP, ddNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat, Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	Escherichia coli
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	epidermal growth factor receptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
et al.	et altera (und Andere)
FBS	fetal bovine serum
g, mg, μg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
G	Guanin
GAP	GTPase activating protein (GTPase-aktivierendes Protein)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3'-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	GDP/GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität
HPLC	high pressure liquid chromatography (Chromatographieverfahren)
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
Kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l, ml, μl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria-Broth-Medium
cm, mm, μm, nm	Centimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
mA	Milliampere
M	Mol
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase
min	Minute(n)
mol, mmol, nmol	Mol, Millimol, Nanomol
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
PBS	phosphate buffered saline
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
ProR	proline rich (Proteindomäne)
Ras	rat sarcoma
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
SH3	Src homology (Proteindomäne)
Tab.	Tabelle
TKB	tyrosine kinase binding (Proteindomäne)

U	Units
UBA	ubiquitin-associated (Proteindomäne)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	volume per volume
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
w/v	weight per volume

## Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren:

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

## VII Literaturverzeichnis

1. Allanson, J.E., A. Bohring, et al., *The face of Noonan syndrome: Does phenotype predict genotype*. Am J Med Genet A, 2010. 152A(8): p. 1960-6.
2. Allanson, J.E., J.G. Hall, et al., *Noonan syndrome: the changing phenotype*. Am J Med Genet, 1985. 21(3): p. 507-14.
3. Almoguera, C., D. Shibata, et al., *Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes*. Cell, 1988. 53(4): p. 549-54.
4. Andoniou, C.E., C.B. Thien, and W.Y. Langdon, *Tumour induction by activated abl involves tyrosine phosphorylation of the product of the cbl oncogene*. EMBO J, 1994. 13(19): p. 4515-23.
5. Aranaz, P., C. Hurtado, et al., *CBL mutations in myeloproliferative neoplasms are also found in its proline-rich domain and in patients with the V617FJAK2*. Haematologica, 2012.
6. Babst, M., G. Odorizzi, et al., *Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking*. Traffic, 2000. 1(3): p. 248-58.
7. Bentires-Alj, M., M.I. Kontaridis, and B.G. Neel, *Stops along the RAS pathway in human genetic disease*. Nat Med, 2006. 12(3): p. 283-5.
8. Burner, G.C. and L.A. Loeb, *Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(7): p. 2403-7.
9. Caligiuri, M.A., R. Briesewitz, et al., *Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia*. Blood, 2007. 110(3): p. 1022-4.
10. Carta, C., F. Pantaleoni, et al., *Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype*. Am J Hum Genet, 2006. 79(1): p. 129-35.
11. Cirstea, I.C., K. Kutsche, et al., *A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome*. Nat Genet, 2010. 42(1): p. 27-9.
12. Conaway, R.C., C.S. Brower, and J.W. Conaway, *Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation*. Science, 2002. 296(5571): p. 1254-8.
13. Cordeddu, V., E. Di Schiavi, et al., *Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair*. Nat Genet, 2009. 41(9): p. 1022-6.
14. Dance, M., A. Montagner, et al., *The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway*. Cell Signal, 2008. 20(3): p. 453-9.
15. Davies, H., G.R. Bignell, et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. 417(6892): p. 949-54.
16. Duan, L., Y. Miura, et al., *Cbl-mediated ubiquitinylation is required for lysosomal sorting of epidermal growth factor receptor but is dispensable for endocytosis*. J Biol Chem, 2003. 278(31): p. 28950-60.
17. Dunbar, A.J., L.P. Gondek, et al., *250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous*



- mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies.* Cancer Res, 2008. 68(24): p. 10349-57.
18. Eden, E.R., F. Huang, et al., *The role of EGF receptor ubiquitination in regulating its intracellular traffic.* Traffic, 2012. 13(2): p. 329-37.
  19. Flotho, C., C.P. Kratz, and C.M. Niemeyer, *How a rare pediatric neoplasia can give important insights into biological concepts: a perspective on juvenile myelomonocytic leukemia.* Haematologica, 2007. 92(11): p. 1441-6.
  20. Fragale, A., M. Tartaglia, et al., *Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 mutants cause EGF-dependent prolonged GAB1 binding and sustained ERK2/MAPK1 activation.* Hum Mutat, 2004. 23(3): p. 267-77.
  21. Futter, C.E., A. Pearse, et al., *Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes.* J Cell Biol, 1996. 132(6): p. 1011-23.
  22. Garcia-Higuera, I., T. Taniguchi, et al., *Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway.* Mol Cell, 2001. 7(2): p. 249-62.
  23. Grand, F.H., C.E. Hidalgo-Curtis, et al., *Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms.* Blood, 2009. 113(24): p. 6182-92.
  24. Gremer, L., T. Merbitz-Zahradnik, et al., *Germline KRAS mutations cause aberrant biochemical and physical properties leading to developmental disorders.* Hum Mutat, 2011. 32(1): p. 33-43.
  25. Hoege, C., B. Pfander, et al., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO.* Nature, 2002. 419(6903): p. 135-41.
  26. Huang, F., L.K. Goh, and A. Sorkin, *EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(43): p. 16904-9.
  27. Huang, F. and A. Sorkin, *Growth factor receptor binding protein 2-mediated recruitment of the RING domain of Cbl to the epidermal growth factor receptor is essential and sufficient to support receptor endocytosis.* Mol Biol Cell, 2005. 16(3): p. 1268-81.
  28. Ito, W., H. Ishiguro, and Y. Kurosawa, *A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction.* Gene, 1991. 102(1): p. 67-70.
  29. Jiang, X. and A. Sorkin, *Epidermal growth factor receptor internalization through clathrin-coated pits requires Cbl RING finger and proline-rich domains but not receptor polyubiquitylation.* Traffic, 2003. 4(8): p. 529-43.
  30. Karnoub, A.E. and R.A. Weinberg, *Ras oncogenes: split personalities.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(7): p. 517-31.
  31. Katzmann, D.J., G. Odorizzi, and S.D. Emr, *Receptor downregulation and multivesicular-body sorting.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(12): p. 893-905.
  32. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. 68(4): p. 820-3.
  33. Kornilova, E., T. Sorkina, et al., *Lysosomal targeting of epidermal growth factor receptors via a kinase-dependent pathway is mediated by the receptor carboxyl-terminal residues 1022-1123.* J Biol Chem, 1996. 271(48): p. 30340-6.

34. Krauss, G., N. Schönbanner, and J. Cooper, *Biochemistry of signal transduction and regulation* 2003: Wiley Online Library.
35. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-5.
36. Langdon, W.Y., J.W. Hartley, et al., *v-cbl, an oncogene from a dual-recombinant murine retrovirus that induces early B-lineage lymphomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(4): p. 1168-72.
37. Leicht, D.T., V. Balan, et al., *Raf kinases: function, regulation and role in human cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1773(8): p. 1196-212.
38. Levkowitz, G., H. Waterman, et al., *Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1*. *Mol Cell*, 1999. 4(6): p. 1029-40.
39. Levkowitz, G., H. Waterman, et al., *c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor*. *Genes Dev*, 1998. 12(23): p. 3663-74.
40. Lill, N.L., P. Douillard, et al., *The evolutionarily conserved N-terminal region of Cbl is sufficient to enhance down-regulation of the epidermal growth factor receptor*. *J Biol Chem*, 2000. 275(1): p. 367-77.
41. Loh, M.L., D.S. Sakai, et al., *Mutations in CBL occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia*. *Blood*, 2009. 114(9): p. 1859-63.
42. Makishima, H., H. Cazzolli, et al., *Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies*. *J Clin Oncol*, 2009. 27(36): p. 6109-16.
43. Marmor, M.D. and Y. Yarden, *Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases*. *Oncogene*, 2004. 23(11): p. 2057-70.
44. Martin, N.P., R.P. Mohny, et al., *Intersectin regulates epidermal growth factor receptor endocytosis, ubiquitylation, and signaling*. *Mol Pharmacol*, 2006. 70(5): p. 1643-53.
45. Martinelli, S., A. De Luca, et al., *Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype*. *Am J Hum Genet*, 2010. 87(2): p. 250-7.
46. Masson, K., E. Heiss, et al., *Direct binding of Cbl to Tyr568 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation*. *Biochem J*, 2006. 399(1): p. 59-67.
47. Mautner, V.F., R. Nguyen, et al., *Neuro-kardio-fazio-kutane Syndrome*. *medizinische genetik*, 2010. 22(1): p. 10-19.
48. Miranda, M. and A. Sorokin, *Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms*. *Mol Interv*, 2007. 7(3): p. 157-67.
49. Niemeyer, C.M., M.W. Kang, et al., *Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia*. *Nat Genet*, 2010. 42(9): p. 794-800.
50. Niihori, T., Y. Aoki, et al., *Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia*. *J Hum Genet*, 2005. 50(4): p. 192-202.
51. Noonan, J.A., *Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associated congenital heart disease*. *Am J Dis Child*, 1968. 116(4): p. 373-80.

52. Nora, J.J., A.H. Nora, et al., *The Ullrich-Noonan syndrome (Turner phenotype)*. Am J Dis Child, 1974. 127(1): p. 48-55.
53. Pandit, B., A. Sarkozy, et al., *Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy*. Nat Genet, 2007. 39(8): p. 1007-12.
54. Perez, B., F. Mechinaud, et al., *Germline mutations of the CBL gene define a new genetic syndrome with predisposition to juvenile myelomonocytic leukaemia*. J Med Genet, 2010. 47(10): p. 686-91.
55. Pickart, C.M. and M.J. Eddins, *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2004. 1695(1-3): p. 55-72.
56. Pickart, C.M. and A.P. VanDemark, *Opening doors into the proteasome*. Nat Struct Biol, 2000. 7(11): p. 999-1001.
57. Quilliam, L.A., R. Khosravi-Far, et al., *Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins*. Bioessays, 1995. 17(5): p. 395-404.
58. Razzaque, M.A., T. Nishizawa, et al., *Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome*. Nat Genet, 2007. 39(8): p. 1013-7.
59. Roberts, A.E., T. Araki, et al., *Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome*. Nat Genet, 2007. 39(1): p. 70-4.
60. Rodriguez-Viciano, P., J. Oses-Prieto, et al., *A Phosphatase Holoenzyme Comprised of Shoc2/Sur8 and the Catalytic Subunit of PP1 Functions as an M-Ras Effector to Modulate Raf Activity*. Molecular Cell, 2006. 22(2): p. 217-230.
61. Roepstorff, K., M.V. Grandal, et al., *Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor*. Traffic, 2009. 10(8): p. 1115-27.
62. Sanada, M., T. Suzuki, et al., *Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms*. Nature, 2009. 460(7257): p. 904-8.
63. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7.
64. Sargin, B., C. Choudhary, et al., *Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML*. Blood, 2007. 110(3): p. 1004-12.
65. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. 103(2): p. 211-25.
66. Schmidt, M.H. and I. Dikic, *The Cbl interactome and its functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. 6(12): p. 907-18.
67. Schmidt-Glenewinkel, H., E. Reinz, et al., *Systems biological analysis of epidermal growth factor receptor internalization dynamics for altered receptor levels*. J Biol Chem, 2009. 284(25): p. 17243-52.
68. Schubbert, S., G. Bollag, et al., *Biochemical and functional characterization of germ line KRAS mutations*. Mol Cell Biol, 2007. 27(22): p. 7765-70.
69. Schubbert, S., M. Zenker, et al., *Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome*. Nat Genet, 2006. 38(3): p. 331-6.
70. Schwab, M. and M. Tyers, *Cell cycle. Archipelago of destruction*. Nature, 2001. 413(6853): p. 268-9.
71. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. FASEB J, 1995. 9(9): p. 726-35.
72. Shtiegman, K., B.S. Kochupurakkal, et al., *Defective ubiquitinylation of EGFR mutants of lung cancer confers prolonged signaling*. Oncogene, 2007. 26(49): p. 6968-78.

73. Shuman, S., *Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in Escherichia coli is sequence specific*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(22): p. 10104-8.
74. Sorkin, A. and L.K. Goh, *Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs*. Exp Cell Res, 2008. 314(17): p. 3093-106.
75. Sorkin, A., S. Krolenko, et al., *Recycling of epidermal growth factor-receptor complexes in A431 cells: identification of dual pathways*. J Cell Biol, 1991. 112(1): p. 55-63.
76. Soubeyran, P., K. Kowanetz, et al., *Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors*. Nature, 2002. 416(6877): p. 183-7.
77. Stoscheck, C.M. and G. Carpenter, *Down regulation of epidermal growth factor receptors: direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts*. J Cell Biol, 1984. 98(3): p. 1048-53.
78. Tam, I.Y., L.P. Chung, et al., *Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features*. Clin Cancer Res, 2006. 12(5): p. 1647-53.
79. Tartaglia, M. and B.D. Gelb, *NOONAN SYNDROME AND RELATED DISORDERS: Genetics and Pathogenesis*. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2005. 6(1): p. 45-68.
80. Tartaglia, M., E.L. Mehler, et al., *Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome*. Nat Genet, 2001. 29(4): p. 465-8.
81. Tartaglia, M., L.A. Pennacchio, et al., *Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome*. Nat Genet, 2007. 39(1): p. 75-9.
82. Tartaglia, M., G. Zampino, and B.D. Gelb, *Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis*. Mol Syndromol, 2010. 1(1): p. 2-26.
83. Thien, C.B. and W.Y. Langdon, *Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(4): p. 294-307.
84. Thien, C.B. and W.Y. Langdon, *c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses*. Biochem J, 2005. 391(Pt 2): p. 153-66.
85. Thien, C.B., F. Walker, and W.Y. Langdon, *RING finger mutations that abolish c-Cbl-directed polyubiquitination and downregulation of the EGF receptor are insufficient for cell transformation*. Mol Cell, 2001. 7(2): p. 355-65.
86. van Delft, S., R. Govers, et al., *Epidermal growth factor induces ubiquitination of Eps15*. J Biol Chem, 1997. 272(22): p. 14013-6.
87. van der Burgt, I., *Noonan syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2007. 2: p. 4.
88. Vieira, A.V., C. Lamaze, and S.L. Schmid, *Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis*. Science, 1996. 274(5295): p. 2086-9.
89. Waterman, H., G. Levkowitz, et al., *The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor*. J Biol Chem, 1999. 274(32): p. 22151-4.
90. Waterman, H. and Y. Yarden, *Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases*. FEBS Lett, 2001. 490(3): p. 142-52.

91. Wells, A., J.B. Welsh, et al., *Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor*. *Science*, 1990. 247(4945): p. 962-4.
92. Wiley, H.S., *Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling*. *Exp Cell Res*, 2003. 284(1): p. 78-88.
93. Wiley, H.S., S.Y. Shvartsman, and D.A. Lauffenburger, *Computational modeling of the EGF-receptor system: a paradigm for systems biology*. *Trends Cell Biol*, 2003. 13(1): p. 43-50.
94. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(2): p. 127-37.

## VIII Danksagung

Ich möchte insbesondere Professor Dr. Kerstin Kutsche und Dr. Georg Rosenberger für die ausgezeichnete Betreuung danken. Mir werden die angenehme Arbeitsatmosphäre, die konstruktiven Diskussionen und ein immer schnelles Feedback in Erinnerung bleiben.

Ebenso gilt mein Dank Inka Jantke, Fanny Kortüm, Marisol Heise und Stefani Meien für die Einarbeitung in die Laboratorien, Ratschläge und Gefälligkeiten.

Professor Dr. Andreas Gal danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Humangenetik.

Meinen Eltern Brigitte Bieler-Kentsch und Dr. Wolfgang Kentsch danke ich für die Ermöglichung meines Studiums, das Interesse daran sowie den stetigen Rückhalt.

Meiner Freundin Ronja möchte ich von Herzen für die gemeinsame Zeit und die treue Begleitung in den zurückliegenden Jahren danken.

Danke auch an Kristina und Matthias.

## IX Eidesstattliche Erklärung

### **Eidesstattliche Versicherung:**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....

Hendrik Kentsch