



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Humangenetik

AG Dr. Georg Rosenberger

Analysen zur Funktion von RRAS bei der Talin- abhängigen Regulation der Integrine

Bachelorarbeit

vorgelegt von:

Christina Glashoff

Hamburg, November 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Claus – Dieter Wacker
2. Gutachter: Dr. Georg Rosenberger

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Hamburg, den 24.11.2014

Christina Glashoff

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VI
1 Forschungshypothesen und Ziele der Arbeit.....	1
2 Einleitung	3
2.1 Die Integrine-Funktion und Regulation	3
2.2 Die RAP1-GTPase – Funktion und Einbindung bei der Regulation der Integrine	4
2.3 Die GTPase RRAS – Funktion und Beteiligung bei der Integrinregulation sowie der Kontrolle fokaler Adhäsionen.....	5
3 Material und Methoden.....	7
3.1 Material.....	7
3.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme	7
3.1.2 Vektoren	7
3.1.3 Zur Verfügung gestellte Plasmide.....	8
3.1.3.1 Konstrukte für die Expression in Eukaryoten	8
3.1.3.2 Konstrukte für die Expression in Bakterien	8
3.1.4 Selbst hergestellte Plasmide.....	9
3.1.5 Oligonukleotide für PCRs und Sequenzierreaktionen	9
3.1.6 Antikörper	10
3.1.6.1 Primärantikörper	10
3.1.6.2 Sekundärantikörper	10
3.1.7 Chemikalien und Lösungsmittel	10
3.1.8 Kits, Enzyme und Standards.....	11
3.1.9 Medien und Zusätze	12
3.1.9.1 Anzucht und Kultivierung von Bakterien:	12
3.1.9.2 Zellkulturmedien und Antibiotika	12
3.1.10 Puffer und Lösungen	13
3.1.10.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli (Mini-Präparation)	13
3.1.10.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli (Maxi-Präparation)	13
3.1.10.3 Agarose-Gelelektrophorese	13

3.1.10.4	Zellyse.....	14
3.1.10.5	GTPase- <i>Pull-Down</i> -Experimente.....	14
3.1.10.6	SDS-Page.....	14
3.1.10.7	Western-Blot.....	15
3.1.10.8	Zellkultur.....	15
3.1.11	Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien.....	15
3.1.12	Computerprogramme und Datenbanken.....	16
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	17
3.2.1	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid DNA.....	17
3.2.2	Anzucht von Bakterien.....	17
3.2.3	Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	17
3.2.4	Maxi Präparation von Plasmid-DNA.....	18
3.2.5	Bestimmung der DNA-Konzentration am NanoDrop.....	18
3.2.6	Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA.....	18
3.2.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	19
3.2.8	DNA-Sequenzierung.....	20
3.2.9	Polymerase Kettenreaktion.....	21
3.2.10	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	21
3.2.11	Klonierung mittels des In-Fusion HD Kits.....	21
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	22
3.3.1	Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen.....	22
3.3.2	GTPase- <i>Pull-Down</i> -Experimente.....	23
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	25
3.3.4	SimplyBlue™ SafeStain-Färbung.....	25
3.3.5	Western-Blot.....	26
3.3.6	Immunologische Detektion auf PVDF-Membran.....	26
3.4	Zellbiologische Arbeitstechniken.....	27
3.4.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	27
3.4.2	Passagieren von Zellen.....	27
3.4.3	Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA.....	28
4	Ergebnisse.....	29
4.1	RRAS als Aktivator von RAP1.....	29
4.1.1	Herstellung von rekombinanten GST-RaIGDS[RBD].....	29
4.1.2	Untersuchung der ektopischen Expressionseffizienz von RRAS und/oder RAP1 in COS7-, CHO- und stabil transfizierten CHO-Zellen.....	30

4.1.3	RAP1- <i>Pull-Down</i> in COS7-Zellen	31
4.2	RRAS als Rekrutor von RIAM.....	35
4.2.1	Subklonierung von RIAM cDNA in pEGFP-C1.....	35
4.2.2	In-Fusion Klonierung von RIAM in Stellar- und DH10B-Zellen.....	37
5	Diskussion	41
5.1	RRAS ^{G38V} könnte als Aktivator von RAP1A wirken	41
5.2	Rolle des RAP1 C-Terminus bei der unterschiedlichen Auswirkung von RRAS auf RAP1A und RAP1B.....	42
6	Zusammenfassung.....	44
7	Literaturverzeichnis	45
	Danksagung	47

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
B-Raf	B Isoform von <i>rapidly accelerated fibrosarcoma kinase</i>
bidest.	bidestilliert
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
CHO	Adhärente Fibroblasten aus dem Ovarium des Chinesischen Hamsters
COS7	Fibroblasten-ähnliche Nierenzellen (afrikanische grüne Meerkatze)
cm, mm, µm, nm	Centimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP, ddNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat, Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
et al.	<i>et altera</i> ; und andere
FBS	Fötales Rinderserum
FERM-Domäne	F für 4.1 Protein, E für Wzrin, R für Radixin und M für Moesin
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
G	Guanin
GAP	<i>GTPase activating proteins</i> ; GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i> ; Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
GTPase	GDP/GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität
HA	Hämagglutinin des humanen Influenzavirus
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> (Chromatographieverfahren)
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid

Km	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
kg, g, mg, µg, ng	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	<i>lysogeny broth</i>
M, mM	Molar, Millimolar
mA	Milliampere
min	<i>minute</i> ; Minute
MRL	Mig-10/Riam/Lamellipodin
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NP-40	Nichtionisches Detergenz P40
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
P-Loop	<i>phosphate-binding loop</i>
PI3K	<i>phosphoinositide-3-kinase</i>
PKA	Proteinkinase A
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RaIGDS	<i>ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>
RAF1	<i>rat fibrosarcoma kinase</i>
RAP1	<i>Ras-proximate-1</i> oder <i>Ras-related protein 1</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RNase	Ribonuklease
RBD	<i>RAS binding domain</i>
RIAM	<i>Rap1-interacting adapter molecule</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	<i>second</i> ; Sekunde
SDS	<i>Sodium-Dodecylsulfate</i> ; Natrium-Dodecylsulfat
SOC	<i>super optimal broth</i>
Std	Stunde
T	Thymin
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	<i>Terrific broth</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	<i>tris buffered saline</i> mit Tween
TCL	<i>total cell lysate</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
u. a.	unter anderem
v/v	<i>volume per volume</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: RRAS als Aktivator von RAP1	1
Abbildung 2: RRAS als direkter Bindungspartner von RIAM	2
Abbildung 3: Integrin Aktivierung	5
Abbildung 4: Der RAS GTPase Zyklus	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung der In-Fusion Cloning Reaktion	22
Abbildung 6: Darstellung eines RAP1 Pull-Down Komplexes	23
Abbildung 7: Kontrollgel für die Aufreinigung von RalGDS	29
Abbildung 8: Expression von RAP1 und RRAS in verschiedenen Zelllinien	30
Abbildung 9: Darstellung der Interaktion von aktivem RAP1 mit GST-RalGDS[RBD] mittels RAP1-Pull-Down und Western-Blot	32
Abbildung 10: Restriktionsverdau von RIAM Expressionskonstrukten	36
Abbildung 11: Restriktionsverdau von RIAM in pEGFP-C1 nach Transformation in Stellar-Zellen	37
Abbildung 12: Restriktionsverdau von RIAM in pEGFP-C1 nach Transformation in DH10B-Zellen	38
Abbildung 13: Vergleich der RIAM Sequenz nach Vermehrung des Expressionskonstrukts in Stellar- und DH10B-Zellen	39

Tabellenverzeichnis

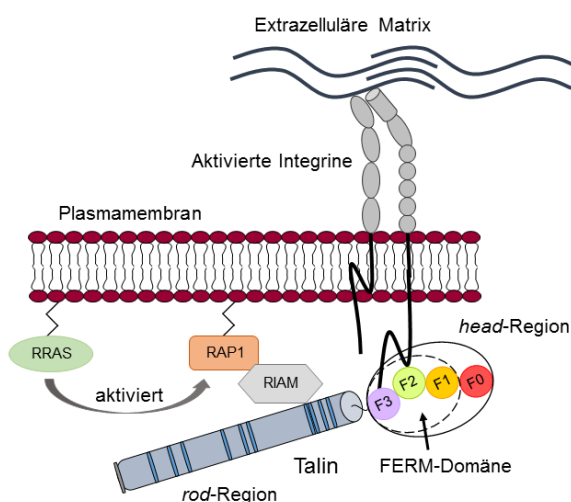
Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien	7
Tabelle 2: Verwendete Vektoren zur Herstellung neuer Konstrukte	7
Tabelle 3: Vorliegende Konstrukte für die Expression in Eukaryoten	8
Tabelle 4: Verwendete Konstrukte für die Expression in Bakterien	8
Tabelle 5: Selbst hergestellte Plasmide	9
Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide für durchgeführte PCRs sowie Sequenzierreaktionen	9
Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper	10
Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper	10

1 Forschungshypothesen und Ziele der Arbeit

Aus bisherigen Forschungsarbeiten geht hervor, dass RRAS Integrine aktivieren und die Bildung von fokalen Adhäsionen regulieren kann, wobei die genauen molekularen Mechanismen hierbei noch völlig unklar sind (Furuhjelm und Peränen, 2003). Diese Arbeit verfolgt daher das Ziel, die molekularen Zusammenhänge der Integrin-Aktivierung und der Bildung fokaler Adhäsionen durch RRAS genauer zu analysieren. Aufgrund dessen werden folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:

a. RRAS als Aktivator von RAP1, einem Signaling-Protein *upstream* von Talin

Für die kleine GTPase RAP1 konnte bereits eine aktivierende Wirkung auf die Talin-abhängige Regulation der Integrine nachgewiesen werden (Lafuente et al., 2004). Dabei wird ein sogenannter „Integrin-Aktivierungs-Komplex“ bestehend aus RAP1, dem RAP1-Effektor RIAM und Talin gebildet (Han et al., 2006). RIAM wird durch Interaktion mit RAP1 an die Zellmembran transloziert und rekrutiert anschließend über eine weitere Bindedomäne Talin an fokale Adhäsionen an der Zellmembran, wodurch die Aktivierung der Integrine initiiert wird (Shattil et al., 2010; Han et al., 2006). Die Interaktion von RAP1 mit RIAM ist jedoch nur im GTP-gebundenen Zustand von RAP1 möglich, weshalb dieses vorher aktiviert werden muss (Lafuente et al., 2004); wie diese Aktivierung erfolgt bleibt jedoch unklar. In meiner Arbeitshypothese wirkt RRAS



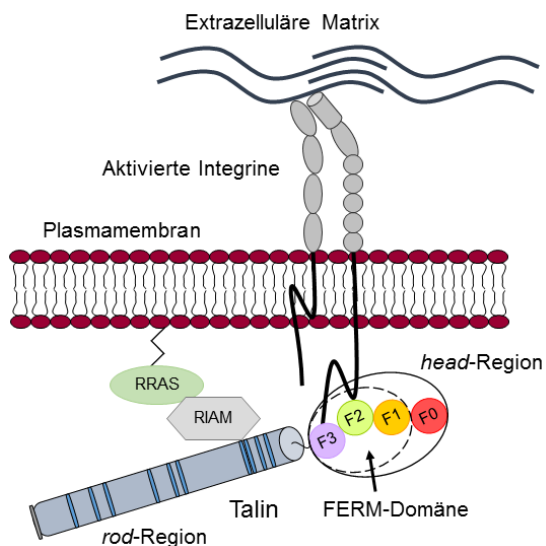
innerhalb einer GTPase-Kaskade als *upstream* Aktivator von RAP1, wobei wahrscheinlich weitere, derzeit unbestimmte Proteine, u.a. RAP1-spezifische GEFs, nötig sind (Abbildung 1). Diese RAP1-Aktivierung führt sodann nach dem o.g. Modell (Han et al. 2006) zur Bildung des „Integrin-Aktivierungs-Komplexes“ (Abbildung 1).

Abbildung 1: RRAS als Aktivator von RAP1

RRAS aktiviert an der Plasmamembran RAP1, welches dann RIAM rekrutiert. Dies führt zur Bildung von RAP1-, RIAM-, und Talin-haltigen Integrin-Aktivierungs-Komplexen und zur Aktivierung der Integrine durch Bindung von Talin-*head* (eingekreister Bereich) an die cytoplasmatischen Integrinmotive. Die darauf folgende Konformationsänderung der extrazellulären Integrindomänen ermöglicht schließlich die Bindung an Liganden in der extrazellulären Matrix. F0, F1, F2 und F3: Talin-(Sub)Domänen.

b. RRAS als direkter Rekrutator von RIAM, einem Talin Bindepartner

Auch die zweite Forschungshypothese baut auf der RIAM-abhängigen Bildung eines „Integrin-Aktivierungs-Komplexes“ auf (Han et al., 2006). Da nachgewiesen werden konnte, dass RRAS und RAP1 eine etwa 50%ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäurekomposition aufweisen und Analysen auch auf eine hohe strukturelle



Ähnlichkeit schließen lassen (Daten nicht gezeigt), könnte aktives RRAS auch direkt mit RIAM interagieren, dieses an die Membran rekrutieren und dort die Bildung von „Integrin-Aktivierungs-Komplexen“ auslösen (Abbildung 2).

Abbildung 2: RRAS als direkter Bindungspartner von RIAM

Aktiviertes RRAS rekrutiert RIAM an die Plasmamembran und stimuliert so die Bildung von „Integrin-Aktivierungs-Komplexen“: RIAM bindet an den Talin-rod, bringt Talin so in den intrazellulären Bereich von Integrinen, was schließlich durch Talin-head-Interaktion zur Aktivierung der Integrine und Ligandenbindung in der extrazellulären Matrix führt. F0, F1, F2 und F3: Talin-(Sub)Domänen.

Zusammengefasst sollen durch Überprüfung der beiden beschriebenen Arbeitshypothesen mittels geeigneter molekularbiologischer und biochemischer Methoden tiefere Einblicke in die letzten Schritte der Integrin-Aktivierung gewährt werden.

2 Einleitung

2.1 Die Integrine-Funktion und Regulation

Integrine sind Transmembranproteine, die aus heterodimeren Glykoprotein-Ketten bestehen. Durch Kombination von 18 unterschiedlichen α - und 8 unterschiedlichen β -Untereinheiten können 24 bisher bekannte Integrin-Dimere aufgebaut werden (Abram und Lowell, 2009). Integrine sind essentiell für viele biologische Prozesse der Zelle, wie beispielsweise Zellmigration und -adhäsion, Blutgerinnung, Kommunikation mit der extrazellulären Matrix sowie Immunantworten (Calderwood et al., 2002). Die größte Proteinportion der Integrine befindet sich extrazellulär und nur ein kleiner Teil ragt ins Cytoplasma. Die intrazellulär vorhandenen Domänen dienen zur Bindung von Multiproteinkomplexen. Diese stellen einerseits durch Kontakt mit dem intrazellulären Cytoskelett eine durchgängige Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix und intrazellulärem Cytoskelett her, wodurch der Zelle mechanische Stabilität ermöglicht wird. Andererseits können über diese Protein-Brücke Signale übermittelt werden. Beispielsweise reagieren Integrine mit einer Änderung der tertiären und quartären Struktur auf äußere Signale und induzieren so die Bildung oder den Umbau von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Adhäsionen (Campbell und Humphries, 2011; McHugh et al., 2010; Abram und Lowell, 2009). Diese hochdynamischen, sogenannten fokalen Adhäsionen bestehen demnach aus einer Anreicherung von Integrinen an der Zellmembran, dem darunterliegenden Substrat und intrazellulären Multiproteinkomplexen (Furuhjelm und Peränen, 2003). Die über fokale Adhäsionen prozessierten Signale können bidirektional sowohl von intrazellulär nach extrazellulär (*inside-out-signaling*) als auch von extrazellulär nach intrazellulär (*outside-in-signaling*) weitergeleitet werden (Abram und Lowell, 2009). Für den bidirektionalen Informationsweg sind sowohl extra- als auch intrazelluläre Interaktionspartner der Integrine notwendig. Zu den extrazellulären Liganden zählen beispielsweise Kollagen, Fibrinogen und Fibronectin, die über eine gewisse Aminosäuresequenz (RGD-Sequenz) mit den Integrinen interagieren (Plow et al., 2000). Ein sehr prominenter intrazellulärer Interaktionspartner von Integrin β -Untereinheiten ist Talin, welches eine C-terminale *rod*-Region und eine N-terminale *head*-Region - letztere bestehend aus der F0- und der FERM-Domäne (*band four-point-one/ezrin/radixin/moesin homology domain*) - aufweist (siehe Abbildungen 1, 2 und 3). Während die *rod*-Region eine

Interaktion mit dem Aktin-Cytoskelett ermöglicht, vermittelt die *head*-Region, im Detail die F2- und F3-Subdomänen, die Assoziation mit Integrinen (Roberts und Critchley, 2009; Elliott et al., 2010; Calderwood et al., 2002). Über diese Protein-Proteininteraktion verläuft auch die Integrin-Aktivierung (Calderwood et al., 2002): die Bindung von Talin an die intrazelluläre Integrin β -Untereinheit bewirkt eine Konformationsänderung der extrazellulären Domänen, wodurch die Affinität zu deren Interaktionspartnern erhöht und die Funktionsfähigkeit der Integrine ermöglicht wird (Tadokoro et al., 2003).

2.2 Die RAP1-GTPase – Funktion und Einbindung bei der Regulation der Integrine

Zwei unterschiedliche Gene kodieren für die beiden, zur RAS-Familie gehörenden RAP1-GTPasen, RAP1A und RAP1B. Diese können entweder im GTP-gebundenen, aktiven oder im GDP-gebundenen, inaktiven Zustand vorliegen. Während Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) den Austausch von GDP nach GTP stimulieren, verstärken GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die GTP-Hydrolyseaktivität von RAP1 (Lee et al., 2009). Im aktiven Zustand interagiert RAP1 mit Effektorproteinen, wie u.a. RapL, RaIGDS, Afadin, Arap3, Nore1B, RIAM, Raf-1, und B-Raf (Sabbatini, 2010). Wie alle RAS-GTPasen werden RAP1A und RAP1B posttranskriptionell mit Lipiden modifiziert, wodurch eine Verortung an der Zellmembran bewirkt wird (Chhatriwala, 2008). Obwohl RAP1A und RAP1B zu 95% identisch sind, wurde bei den jeweiligen Knockout-Mäusen ein unterschiedlicher Phänotyp festgestellt (Wittchen et al., 2011). Bemerkenswerterweise spielen RAP1-GTPasen eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung fokaler Adhäsionen und der Aktivierung der Integrine (Lafuente et al., 2004): Aktives RAP1 rekrutiert das RAP1-Effektor- und Adapterprotein RIAM („*RAP1-GTP interacting adaptor molecule*“) an die Zellmembran. RIAM zählt zur MRL (Mig-10/Riam/Lamellipodin) Protein-Familie und besitzt sowohl eine Bindedomäne für RAP1 als auch für die Talin *rod*-Domäne (Goult et al., 2013). Letztere Bindestelle ermöglicht RIAM das fokale Adhäsionsprotein Talin an die Membran innerhalb fokaler Adhäsionen zu bringen. Dort interagiert Talin mit Integrin β -Untereinheiten und es kommt durch Konformationsänderung zur Integrin-Aktivierung und einer Interaktion von Integrinen mit extrazellulären Liganden (Abbildung 3) (Lafuente et al., 2004; Han et al., 2006; Lee et al., 2009). In einem Modell wurden

daraufrin RAP1-induzierte „Integrin-Aktivierungs-Komplexe“, welche sowohl RIAM als auch Talin enthalten, postuliert (Han et al., 2006; Lee et al., 2009).

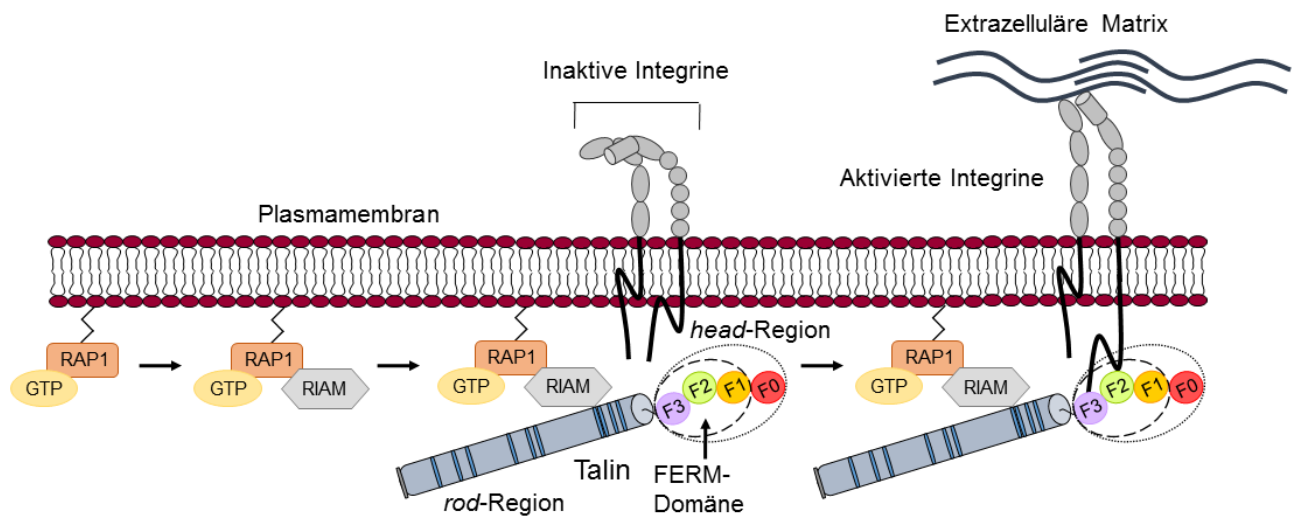


Abbildung 3: Integrin Aktivierung

Liegt RAP1 in GTP gebundener Form vor, kann RIAM rekrutiert werden. Anschließend kommt es zur Bindung von Talin an RIAM. Bindet die FERM Domäne Talins an die β -Untereinheit der Integrine, werden diese durch Konformationsänderung aktiviert und binden an die extrazelluläre Matrix.

2.3 Die GTPase RRAS – Funktion und Beteiligung bei der Integrinregulation sowie der Kontrolle fokaler Adhäsionen

Bei RRAS handelt es sich um eine kleine GTPase der Ras-Familie (Takaya et al., 2007). Diese membran-assoziierten RAS-Proteine wirken als molekulare Schalter für die Weiterleitung von zellulären Signalen (Furuhjelm und Peränen, 2003) und liegen entweder in einer GTP-gebundenen aktiven Form- oder in einer GDP-gebundenen inaktiven Form vor (Milburn et al., 1990). Die RAS GTPase Aktivität wird durch zwei Klassen von Proteinen, den GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) und den GAPs (*GTPase activating Proteins*), gesteuert. In diesem Zyklus bewirken GEFs die Freisetzung von GDP und das Anlagern von GTP, während GAPs die GTPase Aktivität der RAS-Proteine erhöhen und somit die Hydrolyse von GTP auslösen (Abbildung 4) (Kinbara et al., 2003). Je nach gebundenem Nukleotid – GDP oder GTP – ändern RAS-Proteine ihre Konformation. Diese Konformationsveränderung betrifft im Wesentlichen drei funktionelle Proteinmotive, den P-Loop, die Switch I Region und die Switch II Region. In der aktiven Konformation können RAS-GTPasen mit Effektorproteinen, wie beispielsweise Ral-spezifische Guaninnukleotid Austauschfaktoren (RalGDS), RAF-Kinasen, oder den katalytischen Untereinheiten

der PI3-Kinasen interagieren (Kinbara et al., 2003; Karnoub und Weinberg, 2008). Über diese Effektoren und die damit verbundenen Signalwege bzw. Proteinfunktionen regulieren RAS-GTPasen eine Vielzahl zellulärer Mechanismen und Eigenschaften, wie z.B. die differentielle Genexpression, das „*second-messenger-signaling*“, Zellfortbestand und -tod, Zytoskelett und Zellbewegung, den Zellzyklus sowie Vesikelgestütztes Trafficking (Mitin et al., 2005).

Für RRAS konnte eine Beteiligung an der Regulation von Zelladhäsion und Zellausbreitung nachgewiesen werden: RRAS kontrolliert die Integrine, die sich in den Adhäsionsstellen, den fokalen Adhäsionen, zwischen Zellen und dem darunterliegenden Substrat befinden. Im Detail führt aktives RRAS zu einer vermehrten Bildung von fokalen Adhäsionen und adhäsiven Strukturen (Furuhjelm und Peränen, 2003). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass RRAS im Vergleich zu den anderen RAS Proteinen 26 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus besitzt, deren Funktion bislang noch nicht vollständig geklärt werden konnte (Lowe und Goeddel, 1987). Allerdings scheinen diese Aminosäuren einen Einfluss auf bestimmte RRAS-Funktionen zu haben: der N-Terminus stimuliert die Ausbreitung von Zellen, während die RRAS-vermittelten Zellmigration inhibiert wird (Holly et al., 2005). Aber auch über den C-Terminus von RRAS ist für die Entstehung fokaler Adhäsionen wichtig (Furuhjelm und Peränen, 2003). Es wurde gezeigt, dass über diese Proteinregion RRAS an die Zellmembran rekrutiert wird (Milburn et al., 1990).

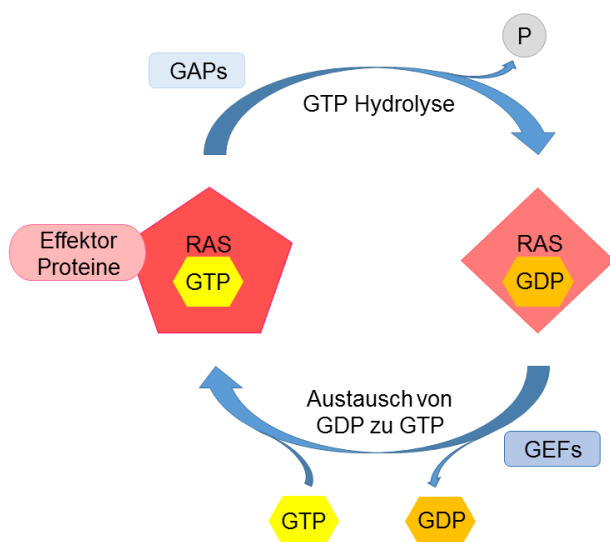


Abbildung 4: Der RAS GTPase Zyklus
RAS wechselt zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen Form und einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand. Den Austausch von GDP nach GTP stimulieren Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), die Hydrolyse von GTP zu GDP wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) potenziert. Aktives RAS interagiert hoch affin mit Effektorproteinen und stimuliert so verschiedene spezifische Effektor-Signalkaskaden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien

Angegeben ist jeweils die Bezeichnung, die Eigenschaft bzw. der Zelltyp und die Herkunft (DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

	Bezeichnung	Eigenschaften/Zelltyp	Herkunft
Bakterienstamm	<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR</i> <i>recA1 endA1 araD139 Δ(<i>ara,</i> <i>leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ- <i>rpsL</i> (Str^R) <i>nupG</i></i>	Life Technologies (Darmstadt)
	<i>E. coli</i> BL21	F- <i>ompT hsdS_B</i> ($r_B^+m_B^-$) <i>gal dcm</i> <i>rne131</i> (DE3)	Invitrogen (Karlsruhe)
	<i>E. coli</i> Stellar	F-, <i>endA1, supE44, thi-1, recA1,</i> <i>relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA - argF</i>) U169, Δ (<i>mrr - hsdRMS - mcrBC</i>), Δ <i>mcrA,</i> λ -	Clontech (Saint-Germain- en-Laye)
Zelllinie	COS7	Adhärenente Fibroblasten aus Nieren der grünen Meerkatze	DSMZ (Braunschweig)
	CHO	Adhärenente Ovarienzellen eines Chinesischen Hamsters	Life Technologies (Darmstadt)

3.1.2 Vektoren

Tabelle 2: Verwendete Vektoren zur Herstellung neuer Konstrukte

Es ist jeweils der Name, die Eigenschaft und die Herkunft des Vektors angegeben.

	Name	Eigenschaft	Herkunft
Vektor	pEGFP-C1	Km ^r	Clontech

3.1.3 Zur Verfügung gestellte Plasmide

3.1.3.1 Konstrukte für die Expression in Eukaryoten

Tabelle 3: Vorliegende Konstrukte für die Expression in Eukaryoten

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

Name des Konstrukts	Name des Inserts (Genbank Eintragsnummer)	Kodierte Aminosäuren	Herkunft
pmT2Sm-HA-RAP1A ^{WT}	Wildtyp RAP1A (A08691.1)	1-181	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pFlag-RAP1B ^{WT}	Wildtyp RAP1B (CR407689.1)	2-185	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pmT2Sm-HA-RRAS ^{WT}	Wildtyp RRAS (NM_006270.3)	2-218	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pmT2Sm-HA-RRAS ^{G38V}	RRAS mit Mutation p.G38V	2-218	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pmT2Sm-HA-RRAS ^{S43N}	RRAS mit Mutation p.S43N	2-218	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pFlag-RRAS ^{WT}	Wildtyp RRAS (NM_006270.3)	2-218	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pFlag-RRAS ^{G38V}	RRAS mit Mutation p.G38V	2-218	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pFlag-RRAS ^{S43N}	RRAS mit Mutation p.S43N	2-218	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)

3.1.3.2 Konstrukte für die Expression in Bakterien

Tabelle 4: Verwendete Konstrukte für die Expression in Bakterien

Dargestellt sind Name des Konstrukts, Name des Inserts mit entsprechender Eintragsnummer in der Genbank, Kodierte Aminosäuren und die Herkunft.

Name des Konstrukts	Name des Inserts (Genbank Eintragsnummer)	Kodierte Aminosäuren	Herkunft
pGEX -RALGDS	RALGDS (NM_001271776.1)	777-872	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)

3.1.4 Selbst hergestellte Plasmide

Tabelle 5: Selbst hergestellte Plasmide

Dargestellt sind Name des Konstrukts, Name des Inserts mit entsprechender Eintragsnummer in der Genbank, Kodierte Aminosäuren und die Herkunft.

Name des Ausgangskonstrukts	Name des Inserts (Genbank Eintragsnummer)	Name des Zielvektors	Oligonukleotide	Name des Zielkonstrukts
RIAM cDNA	Wildtyp RIAM (ABBA01034417.1)	pEGFP-C1	RIAM.pEGFP-C1.for RIAM.pEGFP-C1.rev	pEGFP-C1-RIAM

3.1.5 Oligonukleotide für PCRs und Sequenzierreaktionen

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide für durchgeführte PCRs sowie Sequenzierreaktionen
Angabe sind jeweils der Name, die Sequenz der Oligonukleotide sowie der Hersteller.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Herkunft
RIAM.pEGFP-C1.for	TCTCGAGCTCAAGCTATGGGTGAGTCAAGTGAAG	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
RIAM.pEGFP-C1.rev	GCAGAATTCGAAGCTCTAGGACACGTTGCCTCT	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Riam_F1	CCTTAAATGCACTGGAAGACC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Riam_F2	CGAGAAAACCTCATTGTGACTGC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Riam_F3	GAGATCTGGCGTGTTTTATAC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Riam_F4	CCAAGAGGCCAGAGACATGC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Riam_F5	GTACGCAGGGATCGCGGGCTC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Riam_R1	CTGAATGATGTTGATTCTGC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Riam_R2	CTGACATGAAATCTTGCTC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Primärantikörper

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper

Angegeben ist jeweils der Name des Primärantikörpers, das erkannte Antigen, der Wirtsorganismus für die Herstellung des Antikörpers und dessen Hersteller bzw. Vertriebsfirma. Außerdem ist die verwendete Verdünnung des Antikörpers im Western-Blot (WB) dargestellt.

Antikörper	Antigen	Hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
anti-Tubulin	Humanes α -Tubulin	Maus	WB 1:7500	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

3.1.6.2 Sekundärantikörper

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper

Aufgeführt ist der Name des Sekundärantikörpers, das erkannte Antigen, das Antikörperkonjugat, der Wirtsorganismus und der Hersteller bzw. die Vertriebsfirma. Außerdem ist die verwendete Verdünnung des Antikörpers im Western-Blot (WB) dargestellt.

Antikörper	Antigen	Konjugat	Hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
ECL™ Schaf-anti-Maus-HRP	Maus Immunglobulin G	Meerrettich-Peroxidase	Schaf	WB 1:7.500	GE Healthcare (Freiburg)
anti-HA-HRP	Hämagglutinin des humanen Influenza-Virus	Meerrettich-Peroxidase	Ratte	WB 1:15.000	Roche (Mannheim)
anti-Flag M2-HRP	Synthetisches Flag-Peptid	Meerrettich-Peroxidase	Maus	WB 1:7500	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

3.1.7 Chemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA 30%; 37,5:1)
 Agar
 Agarose
 Ammoniumpersulfat (APS)
 Ampicillin-Natriumsalz (C₁₆H₁₈N₃O₄S·Na)
 Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Milchpulver)
 Borsäure (H₃BO₃)
 Bovines Serumalbumin (BSA)
 Bromphenolblau
 Chlorwasserstoffsäure (HCl)
 Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten
 D-Glucose

Biorad (München)
 Invitrogen (Karlsruhe)
 Invitrogen (Karlsruhe)
 Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
 Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
 Biorad (München)
 Merck (Darmstadt)
 Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
 Merck (Darmstadt)
 Merck (Darmstadt)
 Roche (Mannheim)
 Merck (Darmstadt)

Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Epidermal Growth Factor (EGF), human	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	J.T. Baker (Griesheim)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
10x FastDigest Green Buffer	Thermo Scientific (Bonn)
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Roth (Karlsruhe)
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Invitrogen (Karlsruhe)
Immobilon™ Western- <i>Chemiluminescent HRP-substrate</i>	Merck (Darmstadt)
Isopropanol (C ₄ H ₁₀ O)	Merck (Darmstadt)
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Lipofectamin™2000 Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck (Darmstadt)
Methanol (CH ₃ OH)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker (Griesheim)
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED; C ₆ H ₁₆ N ₂)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nonidet P40 / Igepal (C ₃₀ H ₅₄ O ₁₂)	ICN (Eschwege)
Orange-G	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim)
Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Restore™ Western-Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific (Bonn)
Saccharose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trizma® Base (Tris; C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg)
Turbofect	Thermo Scientific (Bonn)
Wasser für Chromatographie (HPLC)	Merck (Darmstadt)

3.1.8 Kits, Enzyme und Standards

NucleoBond® Xtra Maxi	Macherey/Nagel (Düren)
In-Fusion HD	Clontech(Saint-Germain-en-Laye)
Gene Jet Gel Extraction	Thermo Scientific (Bonn)
JETQuick PCR Product Purification Spin Kit	Genomed (Löhne)
Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
<i>Bgl</i> II	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Hind</i> III	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Nhe</i> I	Fermentas (St. Leon-Rot)
PageRuler™ Plus Prestained Protein 1 kB DNA-Leiter	Fermentas (St. Leon-Rot) Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.9 Medien und Zusätze

3.1.9.1 Anzucht und Kultivierung von Bakterien:

LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g Natriumchlorid ad 1000 ml Aqua dest. pH 7,0
Agar für Festmedien	+ 15 g/l
Ampicillin:	1 ml/l LB-Medium von Stocklösung 250 mg/ml (in
SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g Natriumchlorid ad 970 ml Aqua dest. 10 ml steril filtriertes 1M MgSO ₄ 10 ml steril filtriertes 1M MgCl ₂ 10 ml steril filtrierte 40% Glucose
Lösung 1 zur Herstellung von TB-Medium	12 g Bacto Tryptone 24 g Hefeextrakt 4 ml Glycerol
Lösung 2 zur Herstellung von TB-Medium	2,31 g KH ₂ PO ₄ 12,54 g KH ₂ HPO ₄

Vor Versuchsbeginn Lösung 1 und 2 zusammen geben und Ampicillin 1:1000 hinzufügen

3.1.9.2 Zellkulturmedien und Antibiotika

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

Vollmedium
10% FBS
1% Penicillin/Streptomycin
in DMEM

3.1.10 Puffer und Lösungen

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

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

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

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

3.1.10.3 Agarose-Gelelektrophorese

10x TBE	890 mM 20 mM 890 mM pH	Borsäure EDTA Tris 8
---------	---------------------------------	-------------------------------

10x Ladepuffer	25 ml	Glycerin
	25 ml	1x TBE
	20 mg	Orange-G
Ethidiumbromid	0,05%	(w/v, in Aqua dest.)

3.1.10.4 Zellyse

„Anja-Lysepuffer“	50mM	Tris-HCl, pH 8
	150mM	NaCl
	1%	NP - 40

3.1.10.5 GTPase-Pull-Down-Experimente

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

3.1.10.6 SDS-Page

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

10x SDS-Laufpuffer	288,4 g 40 g 60,6 g ad 2000 ml pH	Glycin SDS Tris Aqua bidest. 8,3
Trenngel (15%)	1,23 ml 1,25 ml 2,5 ml 3,15 µl 62,5 µl	Aqua dest. 4x Trenngelpuffer Acrylamid/Bisacrylamid TEMED 10%-iges APS in Aqua dest.
Sammelgel (5%)	0,975 ml 0,425 ml 0,3 ml 1,575 µl 31,25 µl	Aqua dest. 4x Sammelgelpuffer Acrylamid/Bisacrylamid TEMED 10%-iges APS in Aqua dest.

3.1.10.7 Western-Blot

Transferpuffer	150 mM 25 mM 10% pH	Glycin Tris Methanol (v/v) 8,3
10x TBST	1,5 M 200 mM 1%	NaCl Tris-HCl, pH 7,4 Tween 20 (v/v)
Antikörperlösung für Antikörper von : GE Healthcare, Roche, Sigma-Aldrich	0,5%	Milchpulver in 1x TBST (w/v) (TBST/M)
<u>Ausnahme:</u> anti-Flag M2-HRP		1x TBST w/o Milchpulver

3.1.10.8 Zellkultur

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

3.1.11 Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien

100 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Sarstedt (Nürnbrecht)
Agarplatten	Greiner (Essen)
Autoklav	Tecnomara (Fernwald)

Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Filmentwickler <i>OPTIMAX X-Ray Film Processor</i>	Protec® (Oberstenfeld-Gronau)
Gelelektrophoresekammer	BioRad (München)
Heizblock (Typ:52526101)	Liebisch (Bielefeld)
Kühlzentrifuge <i>5417R</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
Kühlzentrifuge „Sorvall superspeed RC2-B“	Thermo Scientific
Kunststoff-Tubes (Eppi)	Eppendorf AG (Hamburg)
Kunststoff-Tubes (Falcon)	Becton Dickinson GmbH
Laserscanmikroskop DMIRE2	Leica (Mannheim)
Magnetrührer <i>RET basic</i>	IKA Labortechnik (Staufen i. Br.)
Membranen	Roche (Mannheim)
Mini-Protean® Tetra Cell Apparatur für	BioRad (München)
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
PCR-Cycler <i>MJ Research PTC 200</i>	MJ Research, Inc. (Watertown,
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik GmbH
pH-Meter	WTW (Weilheim)
Photometer <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences
Pipetten <i>Finnpipetten</i>	Thermo Labsystems (Mannheim)
PVDF (Polyvinylidendifluorid) Western Blotting	Roche (Mannheim)
Röntgenfilme (<i>Cronex 5</i>)	AGFA (Berlin)
Schüttelapparat 3006	GFL (Burgwedel)
Schüttelapparat „Centromat R“	B. Braun Biotech International
Schüttelautomat „Rocky“	Fröbel Labortechnik (Lindau)
Semi-Dry <i>Fastblot B34</i>	Biometra (Göttingen)
Spannungsgeber <i>Standard Power Pack P25</i>	Biometra (Göttingen)
Sterilwerkbank <i>HERA safe Typ 12/2, 1995</i>	Heraeus (Hanau)
Sterilwerkbank <i>Lamin Air Instruments</i>	Heraeus (Hanau)
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge <i>Biofuge Pico</i>	Heraeus (Hanau)
Überkopprotator <i>RS-60 Tube Rotator</i>	BioSan (Riga, Lettland)
Ultraschallgerät	Hielscher (Teltow)
Vortex-Gerät <i>Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000</i>	Scientific Industries, INC. (USA)
Waage „Sartorius ISO 9001“	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad <i>GFL 1083</i>	GFL (Burgwedel)
Whatman-3mm-Chromatographie-Papier	Whatman (Dassel)
Zentrifuge <i>Labofuge GL</i>	Heraeus (Hanau)

3.1.12 Computerprogramme und Datenbanken

Datenbank	Anwendung
NCBI PubMed	Literaturrecherche
Software	Anwendung
Chromas	DNA Sequenz Analyse
SeqMan (DNA Star)	Homologievergleich multipler Sequenzen
MapDraw (DNA Star)	Suche nach Schnittstellen für Restriktionsenzyme

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid DNA

Die Transformation der verwendeten *E.coli* Bakterien mit Plasmid DNA erfolgte mithilfe der Hitzeschock-Methode. Hierfür wurden die kompetenten Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 µl der Zellen mit 1 µl DNA zusammengegeben und vorsichtig vermischt. Für eine verbesserte Aufnahme der DNA folgte nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C. Danach wurde eine erneute Inkubation auf Eis für 5 min durchgeführt. Während dieses Schrittes wurden 700 µl SOC-Medium zu den Bakterien hinzugefügt. Daraufhin folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttelinkubator. Um die Bakterien nun von dem größten Teil des Mediums zu trennen, wurden sie für 5 min bei 8000 Upm abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. In dem verbliebenen Medium wurden die Bakterien resuspendiert und mit einem 3-Ösen-Ausstrich auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert. Über Nacht wurde die Agarplatte bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.2 Anzucht von Bakterien

Für eine Mini-Präparation wurde eine 2 ml Kultur mit Antibiotikum-haltigem LB-Medium mit einer Einzelkolonie der *E.coli* Bakterien angeimpft. Bei der Maxi-Präparation diente die 2 ml Kultur als Vorkultur, mit der eine 200 ml Kultur Antibiotikum-haltigen LB-Mediums angeimpft wurde. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte über Nacht bei 37°C und 200 Upm im Inkubationsschüttler

3.2.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die von den den *E.coli* Bakterien vervielfältigte Plasmid-DNA wurde zunächst aus analytischen Grunde mithilfe einer Minipräparation, die auf der alkalischen Lyse basiert, isoliert. Dafür wurden die Bakterien aus einer 2 ml Übernachtkultur für 5 min bei 8.000 Upm abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 100 µl der Lösung I durch vortexen resuspendiert. Durch das Hinzufügen von 200 µl Lösung II wurde die Zellyse eingeleitet und die Suspension nach mehrmaligem Invertieren für 5 min bei RT inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch die Zugabe von 300 µl Lösung III. Nach

einer gründlichen Durchmischung wurde die Suspension 10 min auf Eis inkubiert. Um anschließend die Zelltrümmer zu entfernen, folgte ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 14.000 Upm. Der Überstand wurde in ein neues Eppi überführt, die darin enthaltene Plasmid-DNA mit 350 µl Isopropanol gefällt und danach bei 14.000 Upm für 5 min bei RT abzentrifugiert. Damit eventuell mitgefällte RNA abgebaut wird, wurden 100 µl RNase A-haltiger TE-Puffer hinzugefügt und die Suspension für 20 min bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 125 µl 88% Isopropanol/0,2 M KAc und 10-minütiger Inkubation bei RT wurde die gewonnene Plasmid-DNA-Lösung gereinigt. Daraufhin wurde die Plasmid DNA durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 14.000 Upm pelletiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl Aqua dest. gelöst und bei -20°C gelagert.

3.2.4 Maxi Präparation von Plasmid-DNA

Um eine effektive Transfektion eukaryotischer Zellen zu gewährleisten, benötigt man eine größere Menge und einen höheren Reinheitsgrad an Plasmid-DNA, als bei der Mini-Präparation erzielt werden kann. Daher wurden die Plasmide durch eine Maxi-Präparation mit dem NucleoBond® Xtra Maxi Kit der Firma Macherey-Nagel gewonnen. Die gefällte Plasmid-DNA wurde zunächst in 200 µl TE-Puffer gelöst und anschließend auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Die DNA-Lösung wurde schließlich bei -20°C gelagert.

3.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration am NanoDrop

Mittels des NanoDrop ND-1000 Spektrophotometers wurde die DNA-Konzentration gemessen. Hierbei wurde nach Vorschriften des Herstellers vorgegangen.

3.2.6 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der Qualität und Quantität der gewonnenen DNA wurde ein Verdau mithilfe von Restriktionsenzymen durchgeführt. Restriktionsendonukleasen vom Typ II haben meist palindromische Erkennungssequenzen von 4 bis 8 Basenpaaren und scheiden durch Hydrolyse der Phosphodiester-Bindung der Plasmid-DNA. Das Ende

der geschnittenen Fragmente kann entweder glatt sein (engl. *blunt ends*) oder eine überhängende Form (engl. *sticky ends*) aufweisen. Für den Verdau wurden 2 µl 10x FastDigest Green Buffer, 2 µl 10x BSA mit 0,5 µl Restriktionsenzym vermengt. Zu dem Ansatz wurden entweder 2 µl Plasmid DNA von einer Mini-Präparation oder 1 µl Plasmid DNA von einer Maxi-Präparation hinzugefügt und mit HPLC Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37°C wurden die Proben mittels Gelelektrophorese analysiert.

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Dadurch ist es beispielsweise möglich, das korrekte Schnittmuster nach einem Restriktionsverdau zu kontrollieren und optisch darzustellen. Die Wanderung der DNA Fragmente durch die Agarose-Matrix ist abhängig von ihrer Größe. Größere Fragmente bewegen sich langsamer durch die Poren des Gels und werden stärker zurückgehalten als kleinere Fragmente. Der Agarosegehalt des Gels ist abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA Fragmente und liegt zwischen 0,8-2% (w/v). Durch Anlegen einer Gleichspannung wird die negativ geladene DNA im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Mitlaufen eines Größen-Standards ermöglicht es nach dem Färben des Gels die Fragmente ihrer Größe nach zuzuordnen.

Für die Herstellung des Gels wurde eine entsprechende Menge Agarose in einer bestimmten Menge an 1x TBE-Puffer aufgekocht, anschließend unter Rühren auf dem Magnetrührer auf ca. 50°C abgekühlt und in einen Gelschlitten mit eingebauten Probekämmen gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde es mit ausreichend viel 1x TBE-Puffer in die Gelelektrophoresekammer gelegt.

Die aufzutragenden Proben wurden vorher mit Ladepuffer versetzt (1/4 Volumen Ladepuffer (Orange G), 3/4 Volumen Probe) und in die Taschen des Gels pipettiert. Bei den Proben eines Restriktionsverdau wurde kein Ladepuffer hinzugefügt, da die Proben in diesem Fall bereits durch den 10x FastDigest Green Buffer angefärbt waren. Die Elektrophorese wurde bei 140 V für ca. 60 min durchgeführt. Danach folgte das Färben des Gels in einer 0,05%-igen Ethidiumbromid-Lösung für mindestens 15 min. Der Farbstoff interkaliert reversibel zwischen den Basen der DNA. Dadurch ist es möglich die angefärbten Fragmente durch Anregung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar zu machen. Die Detektion dieser Fluoreszenz erfolgt auf einem Transilluminator-Tisch.

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle wurden Proben mit dem richtigen Schnittmuster nach einer Restriktionsanalyse mit anschließender Gelelektrophorese sequenziert. DNA-Sequenzierungen wurden in dem 16-Kapillar-Sequenzierer (ABI Prism® 3500 Genetic Analyzer) der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Dieser Methode liegt die Kettenabbruchreaktion nach Sanger zu Grunde (Sanger *et al.*, 1977), bei der nicht nur 2'-Desoxyribonukleotiden (dNTPs), sondern auch fluoreszenzmarkierte 2',3'-Dideoxyribonukleotide (ddNTPs) in die zyklische Sequenzierreaktion eingebaut werden. Wird nun während der Amplifizierung ein ddNTP eingebaut, kommt es zum Abbruch der Sequenzierreaktion. Durch den zufälligen Einbau der ddNTPs entstehen DNA-Stränge unterschiedlicher Länge, die je nach Dideoxynukleotid mit einem anderen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff versehen sind. Mit einer Kapillarelektrophorese mittels Laser kann der spezifische Farbstoff detektiert werden. Nun ist es möglich, durch Kombination aus Größen der PCR-Fragmente und deren Fluoreszenzmarkierung, das Sequenzchromatogramm einer Probe zu erschließen.

Sequenzieransatz für Plasmide:	Sequenzierprogramm:		
2 µl 5x Sequenzierpuffer	96°C	5 min	} 30 Zyklen
1,1 µl BDT	96°C	50 s	
0,5 µl Primer (1:10)	50°C	30 s	
0,5 µl Maxi- bzw. 1 µl Mini-Präparation	60°C	4 min	
<i>Auf 10 µl mit HPLC-Wasser auffüllen</i>			

Nach der Sequenzierung erfolgte die Aufreinigung mittels einer Natriumacetat-Fällung. Nicht gebundene dNTPs und ddNTPs werden entfernt. Hierfür wurden 40 µl HPLC-Wasser, 5 µl NaAc (3 M, pH 5,2) und 125 µl Ethanol abs. zu dem Sequenzierungsprodukt hinzugegeben und gevortext. Anschließend wurde die DNA bei 14.000 Upm für 20 min abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Um das entstandene DNA-Pellet aufzureinigen, wurden 250 µl 70% Ethanol (v/v) dazugegeben und für 5 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut dekantiert wurde, folgte die Trocknung des DNA-Pellets bei 37°C für ca. 15 min.

3.2.9 Polymerase Kettenreaktion

Bei der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) handelt es sich um ein *in vitro* Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Die Reaktion wird in fünf Schritte unterteilt, bei der sich drei Schritte zyklisch wiederholen:

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	} 30-35 Zyklen
Denaturierung	95°C	15 s	
Annealing	45-65°C	10 s	
Elongation	72°C	30-40 s	
Finale Elongation	72°C	5 min	

Durch die Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Bei der Annealing Reaktion kommt es durch komplementäre Hybridisierung zum Anlagern verwendeter Oligonukleotid-Primer. Die Schmelztemperatur des Primers bestimmt die Temperatur dieses Schrittes. Anschließend folgt die Elongation, bei der die angelagerten Oligonukleotide mit Desoxynukleotiden komplementär zur Ausgangs-DNA mithilfe einer *Taq*-Polymerase verlängert werden. Durch den zyklischen Verlauf dieser drei Reaktionen ist eine annähernd exponentielle Vervielfältigung der Ausgangs-DNA zu erreichen.

3.2.10 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung produzierter PCR-Produkte wurden mit dem *JETQuick PCR Product Purification Spin Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt und dadurch von Oligonukleotiden, Nukleotiden und Enzymen getrennt.

3.2.11 Klonierung mittels des In-Fusion HD Kits

Die Verwendung des In-Fusion HD Cloning Kits ermöglicht eine effiziente Klonierung eines PCR Produkts in einen linearisierten Vektor in einer einzigen 15-minütigen Reaktion. Für die Klonierung müssen zunächst PCR Produkte des Inserts hergestellt werden. Dafür werden Primer designt, die eine komplementäre 15 Bp lange Frequenz zum Zielvektor aufweisen und das PCR Produkt flankieren. Durch diese komplementäre Sequenz des Inserts zum Zielvektor wird die Integration des Inserts in den zuvor linearisierten Vektor während der In-Fusion- Reaktion ermöglicht. Die Klonierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

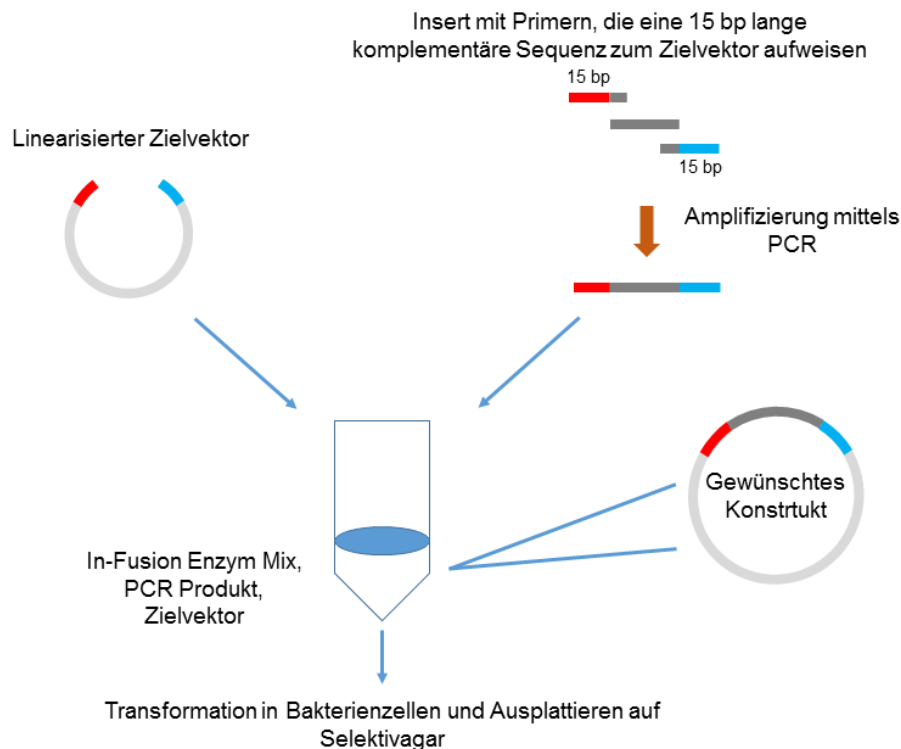


Abbildung 5: Schematische Darstellung der In-Fusion Cloning Reaktion

Das durch PCR amplifizierte Insert wird mittels des In-Fusion Enzym Mixes in den linearisierte Vektor integriert. Die verwendeten Primer haben 15 Bp lange Überhänge, die komplementär zum Zielvektor sind. Dadurch wird die Reaktion ermöglicht.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen

Die adhären wachsenden Zellen wurden zunächst auf Eis gestellt, 2x mit jeweils 5 ml eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 1 ml „Anja-Lysepuffer“ (+ *Complete mini* Proteaseinhibitoren und *PhosSTOP* Phosphataseinhibitoren) pro Zellkulturplatte versetzt. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen mechanisch von der Platte gelöst und die Zellsuspension in ein auf 4°C vorgekühltes Eppi überführt. Um die Zelltrümmer aus der Suspension zu entfernen, folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 14.000 Upm. Ein definiertes Volumen des Überstands wurde danach in ein neues vorgekühltes Eppi pipettiert, wovon 75 µl als Rohlysat (TCL, *total cell lysate*) entnommen- und zusammen mit 25 µl 4x Laemmi Ladebuffer in ein weiteres vorgekühltes Eppi gegeben wurden. Die Lagerung des Rohlysats erfolgte bei -20°C, während der Rest des Überstandes für den GTPase-Pull-Down zur Verfügung stand.

3.3.2 GTPase-Pull-Down-Experimente

Die sogenannten GTPase-Pull-Down-Experimente wurden in dieser Arbeit dazu verwendet, um die Aktivität der kleinen GTPase RAP1 nachzuweisen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Interaktion aktiver GTP-gebundener GTPasen mit einem Effektorprotein. Durch die Zugabe von einem zuvor in Bakterien aufgereinigten Fusionsprotein zwischen dem Effektorprotein und GST (Glutathion-S-Transferase) in ein Zellysate, kann die aktive Form der GTPase an das Fusionsprotein binden. Durch Bindung von GST an Glutathion-Sepharosekügelchen lassen sich die aktiven GTPasen präzipitieren. Für die Präzipitation von aktivem RAP1 wurde als Effektorprotein die RBD (*Rap-binding domain*) von RalGDS (*Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*) als GST-Fusionsprotein GST-RalGDS[RBD] verwendet.

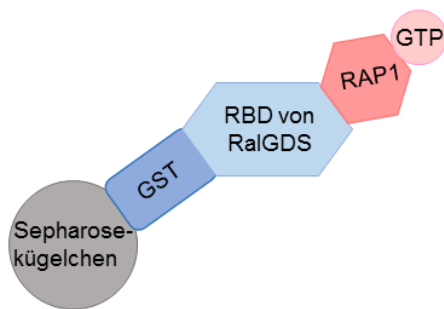


Abbildung 6: Darstellung eines RAP1 Pull-Down Komplexes

Das Fusionsprotein GST-RalGDS[RBD] ist durch die Bindung zwischen Glutathion von den Sepharosekügelchen und Glutathion-S-Transferase von dem Fusionsprotein an die Sepharosekügelchen gekoppelt. Über die RBD von RalGDS kann aktives RAP1 an den Komplex binden und präzipitiert werden.

Aufreinigung von GST-RalGDS[RBD]-Fusionsproteinen:

Die Möglichkeit der hochspezifischen Aufreinigung der in *E.coli* exprimierten GST Fusionsproteine mithilfe von Glutathion-Sepharosekügelchen ist durch die Affinität zwischen Glutathion und Glutathion-S-Transferase (GST) gegeben.

Zunächst wurde die Transformation von 50 μl *E.coli* BL21 mit 1 μl des pGEX-RalGDS[RBD]-Konstrukts durchgeführt. Nach dem Ausplattieren auf einer selektiven (Amp^r) LB-Agarplatte wurde diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden zwei Bakterienkolonien gepickt und in jeweils 2 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium über den Tag bei 37°C und 200 Upm geschüttelt. Am Abend wurden 50 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium mit einer der 2 ml Kulturen angeimpft und erneut über Nacht bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden 10 ml aus der 50 ml Vorkultur entnommen und in 1000 ml Ampicillin-haltiges TB-Medium überführt und für ca. 4 Std. bei 37°C und 200 Upm bis zu einer $\text{OD}_{600}=0,6$ kultiviert. Anschließend wurde die Expression des GST-RalGDS[RBD] Fusionsproteins durch Hinzufügen von IPTG (Endkonzentration von 0,1mM) eingeleitet. Nach einer Inkubation von 2 Std. bei

30°C und 200 Upm wurde die Kultur in 300 ml Zentrifugationsgefäße überführt und für 20 min bei 4.000 Upm abzentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet in 20 ml 50 mM Tris HCl (pH8) resuspendiert und erneut für 20 min bei 4000 Upm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnte das Pellet in Trockeneis schockgefroren- und über Nacht bei -80°C gelagert werden.

Am nächsten Tag wurde das Pellet bei 4°C im Kühlschrank aufgetaut und in 20 ml GTBL I-Puffer resuspendiert. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 4°C auf dem Rollinkubator wurden 8 ml GTBL II hinzugefügt. Es folgte eine erneute Inkubation für 10 min bei 4°C auf dem Rollinkubator. Anschließend wurde die Suspension auf Eis sonifiziert, um die bakterielle DNA zu scheren und in 50 ml Zentrifugengefäße überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 60 min bei 4°C und 10.000 Upm. Der Überstand wurde in ein weiteres 50 ml Zentrifugengefäß überführt und mit 1 ml gewaschenen *GST-Bind™ Resin* (Glutathion-Kügelchen) versetzt. Nach einer Inkubation von 60 min bei 4°C auf dem Überkoprotator folgte ein Zentrifugationsschritt bei 2.500 Upm und 4°C für 2 min. Darauffolgend wurde der Überstand verworfen und das Pellet 4x mit 5 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden schließlich 550 µl Lagerungspuffer hinzugefügt und die Suspension in 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurden vor und nach Zugabe der Glutathion-Kügelchen Proben entnommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde anschließend mit SimplyBlue™ SafeStain gefärbt und ausgewertet.

RAP1-Pull-Down:

Nach der in 3.3.1 beschriebenen Zellyse der adhärent wachsenden Zellen, wurden, nach Entnahme der 75 µl für das Rohlysat, 20 µl GST-RaIGDS[RBD]-Fusionsproteine zu dem restlichen Lysat hinzugegeben und für 45 min bei 4°C auf dem Überkoprotator inkubiert. Daraufhin wurden die Suspension für 2 min bei 2.500 Upm und 4°C abzentrifugiert und anschließend das Pellet 3x mit ca. 1 ml „Anja-Lysepuffer“ gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand verworfen und 20 µl des Lysepuffers zum Pellet hinzugefügt. Anschließend wurden ebenfalls 20 µl 4x Laemmli Ladepuffer dazugegeben und die Suspension bei -20°C gelagert.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde die eindimensionale und diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Zunächst werden die Proteine durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und entfaltet. Das anionische Detergenz SDS bindet mit großer Affinität an die Proteine und zerstört hierbei die physiologische Proteinfaltung. Durch die Anlagerung des negativ geladenen SDS wird die relativ geringe Eigenladung der Proteine überdeckt, wodurch die Ladung der Proteine die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel nicht mehr beeinflussen kann und die Auftrennung nur aufgrund der Proteinmasse und der Porengröße des Gels erfolgt. Die Polyacrylamid-Trenngellösung wurde wie unter 3.1.10.6 angegeben angesetzt und zwischen zwei Glasplatten in einer Minigel-Apparatur (BioRad) gegeben. Für einen geraden, blasenfreien Abschluss des Trenngels, wurde direkt eine Schicht aus Isopropanol auf das Trenngel gegossen. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol durch Waschen mit Wasser entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Bevor das Sammelgel polymerisierte, wurde es mit Probenkämmen bestückt. Das Sammelgel ist für die Fokussierung der Protein/SDS-Komplexe vor der eigentlichen Trennung verantwortlich. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel bei 95°C für 5 min aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren und nach dem *Pull-Down* von den Beads zu lösen. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 1 min bei 8600 Upm, wodurch sich die Beads im Pellet befanden und der proteinhaltige Überstand aufgetragen werden konnte. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Proteinstandard aufgetragen. Die SDS-Page wurde in 1x SDS-Laufpuffer bei 90 V im Sammelgel und bei 140 V im Trenngel durchgeführt.

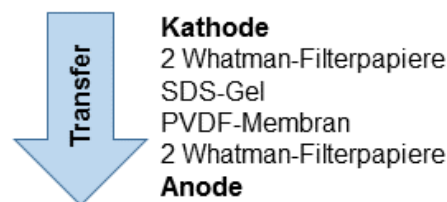
3.3.4 SimplyBlue™ SafeStain-Färbung

Zum Visualisieren von Proteinbanden in einem Polyacrylamid Gel wurde u.a. das Reagenz SimplyBlue™ SafeStain verwendet. Hierbei kommt es zu einer unspezifischen Anlagerung des Farbstoffes an die Aminosäuren der Proteine, wodurch alle in dem Gel enthaltenen Proteine sichtbar werden. Das Gel wurde zunächst 3x 5 min mit ca. 100 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde das Gel mit SimplyBlue™ SafeStain bedeckt und für 60 min unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Danach wurde das Gel so lange in Aqua dest. gewaschen, bis der

Hintergrund klar entfärbt war. Zur Auswertung und Dokumentation wurde das Gel in eine Plastikfolie gelegt und eingescannt.

3.3.5 Western-Blot

Bei einem Western-Blot werden die vorher aufgetrennten Proteine mittels *Semi-Dry-Blot*-Apparatur aus dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran transferiert. Durch Anlegen eines elektrischen Felds wandern die negativ geladenen SDS/Protein-Komplexe aus dem Gel auf die Membran und bleiben dort durch hydrophobe Wechselwirkungen haften. Vor der Durchführung des Western-Blots wurden pro Gel eine PVDF-Membran und vier 1 mm starke Whatman-Filterpapiere auf Gelgröße zugeschnitten. Die Membranen wurde für ca. 30 s in 100% Methanol aktiviert und anschließend für ca. 5 min in Transferpuffer inkubiert. Die Whatman-Filterpapiere wurden ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Um eventuell störende Salze zu entfernen wurden auch die SDS-Gele kurz im Transferpuffer geschwenkt. Die Western Blot-Apparatur wurde wie folgt aufgebaut:



Der Vorgang des Blottens wurde bei 500 mA für 120 min durchgeführt.

3.3.6 Immunologische Detektion auf PVDF-Membran

Die Immunreaktion von Proteinen auf einer PVDF Membran basiert auf der Bindung des primären Antikörpers an sein spezifisches Antigen. Ein mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horse radish peroxidase*) gekoppelter sekundärer Antikörper ist nun in der Lage mit dem Komplex aus dem primären Antikörper und seinem Antigen zu interagieren. In dieser Arbeit wurden zum Teil HRP gekoppelte Primärantikörper eingesetzt (anti-HA-HRP, anti-Flag M2-HRP), weshalb der Einsatz eines Sekundärantikörpers in diesen Fällen nicht nötig war. Wird ein geeignetes Substrat (Immobilon™ Western-Chemiluminescent HRP-substrate; ECL) auf die Membranen gegeben, katalysiert HRP eine Lichtreaktion, die mithilfe eines Röntgenfilms detektiert werden kann.

Nachdem die Proteine von dem SDS-Gel auf die PVDF-Membran transferiert wurden, müssen zunächst unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert werden. Dazu wird die Membran für ca. 60 min in 5% (w/v) Milchpulver in TBST inkubiert. Die darauffolgende Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper erfolgt über Nacht bei 4°C und unter leichtem Schwenken. Am nächsten Tag wurden noch ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1x TBST entfernt. Anschließend wurde ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper, der mit dem primären Antikörper spezifisch interagieren kann, für 60 min auf die Membran gegeben. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit 1x TBST gewaschen.

Zur optischen Darstellung der vom Antikörper erkannten Proteine auf der Membran, wurde diese ca. 3 min mit ECL-Substratlösung inkubiert und die entstandene Chemilumineszenz durch Auflegen eines Röntgenfilms visualisiert. Durch ein spezielles Entwicklergerät (*X-Ray Film Processor*) erfolgt die Entwicklung des Röntgenfilms.

3.4 Zellbiologische Arbeitstechniken

3.4.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Für die Experimente wurden COS7 Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um Fibroblasten aus dem Nierengewebe von grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*). Die Kultivierung der Zelllinie wurde in einem Begasungsbrutschrank bei konstanten 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ durchgeführt. Die Zellen wuchsen als Adhäsionskultur in 10 cm Zellkulturschalen in „Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium“ (DMEM) mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) (v/v) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) (v/v). Alle Versuche fanden unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank statt.

3.4.2 Passagieren von Zellen

Im Normalfall wurden die Zellen zur kontinuierlichen Kultivierung bei einer Konfluenz von 80-90% alle 3-4 Tage auf eine neue Zellkulturplatte überführt. Hierfür wurde zunächst das Vollmedium abgezogen und die Zellen danach einmal mit 3 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurden 2 ml vorgewärmtes 1x Trypsin-EDTA auf die

Zellkulturplatte gegeben und nach einer kurzen Inkubation von ca. 5 min erfolgte durch leichtes Klopfen das Lösen der Zellen von der Platte. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 8 ml vorgewärmten Vollmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendiert und im Verhältnis 1:10 mit Vollmedium auf ein Endvolumen von 10 ml auf eine neue 10 cm Zellkulturplatte ausgesät.

3.4.3 Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA

Die transiente Transfektion der COS7 Zellen erfolgte unter Verwendung von TurboFect, einem kationischen Polymer der Firma Fermentas. Durch die negative Ladung der zu transfizierenden DNA kommt es zur Bildung stabiler Komplexe mit einer positiven Gesamtladung, die von der Zelle aufgenommen werden können.

Vor Beginn der Transfektion wurden die am Vortag in Vollmedium ausgesäten Zellen auf eine für die Transfektion optimale Konfluenz von ca. 70% kontrolliert. Zunächst wurde der Transfektionsansatz vorbereitet. Bei einer Doppel-Transfektion bestand der Ansatz pro Zellkulturplatte aus 1 ml Opti-MEM[®], jeweils 3 µl der zu transfizierenden DNA und 12 µl TurboFect. Für eine Einfach-Transfektion bestand der Ansatz aus 1 ml Opti-MEM[®], 5 µl DNA und 10 µl TurboFect. Während der Inkubationszeit des Ansatzes von 15-20 Minuten bei RT wurden die am Vortag ausgesäten Zellen vorbereitet. Zunächst wurde das Vollmedium von der Platte entfernt und die Zellen einmal mit 3 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurden 9 ml vorgewärmtes Opti-MEM[®] vorgelegt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen pipettiert und danach vorsichtig geschwenkt. Nach einer Inkubationszeit von 6 Std. folgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden mit 10 ml Vollmedium überschichtet.

4 Ergebnisse

4.1 RRAS als Aktivator von RAP1

4.1.1 Herstellung von rekombinanten GST-RaIGDS[RBD]

Die Produktion von an Glutathion-Sepharosekügelchen (Beads) gekoppelten GST-RaIGDS[RBD] (RBD: RAS/RAP-Bindedomäne) Fusionsproteinen diente den nachfolgenden *Pull-Down*-Experimenten von aktivem RAP1. Nach Aufreinigung von GST-RaIGDS[RBD] in *E.coli* wie unter 3.3.2 beschrieben, wurde sowohl das aufgereinigte GST-RaIGDS[RBD] als auch das vor Zugabe der Beads entnommene Bakterienlysat auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Anschließend erfolgte die Färbung mit SimplyBlue™ SafeStain.

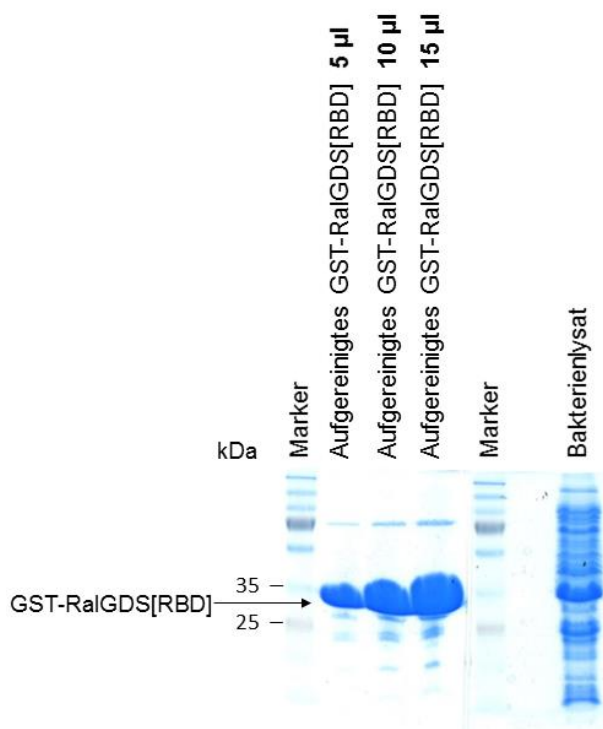


Abbildung 7: Kontrollgel für die Aufreinigung von GST-RaIGDS[RBD]

Das aufgereinigte GST-RaIGDS[RBD] wurde in drei verschiedenen Volumina (5 µl, 10 µl, 15 µl) auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Zum Vergleich wurde das Bakterienlysat aufgetragen. Links sind Molekulargewichte des Proteinstandards (Marker) angegeben.

Durch die Färbung des Gels mit SimplyBlue™ SafeStain werden alle sich im Gel befindenden Proteine sichtbar. Während im Bakterienlysat eine Vielzahl an Proteinbanden erkennbar ist (Abb. 7), konnte durch Präzipitation mittels Glutathion Sepharosekügelchen eine deutliche Anreicherung von GST-RaIGDS[RBD] Fusionsproteinen (ca. 26 kDa) erreicht werden (Abb. 7). Es sind hier nur wenige unspezifisch gebundene Proteine in Form von weiteren schwachen Banden ersichtlich. Mit ansteigendem Probenvolumen nimmt auch die Menge an GST-RaIGDS[RBD] zu.

Diese Kontrollanalyse bestätigt somit eine erfolgreiche Aufreinigung der GST-RaIGDS[RBD] Fusionsproteine über Glutathion-Sephasrosekügelchen zur Verwendung für den folgenden RAP1-Pull-Down.

4.1.2 Untersuchung der ektopischen Expressionseffizienz von RRAS und/oder RAP1 in COS7-, CHO- und stabil transfizierten CHO-Zellen

Um die geeignetste Zelllinie für das Experiment zu ermitteln, wurde zunächst ermittelt, in welchen Zelllinien RRAS und/oder RAP1 am effektivsten ektopisch exprimiert werden können. CHO-Zellen lagen bereits in drei Varianten vor: Eine RRAS Wildtyp ($HA-RRAS^{WT}$)-, eine konstitutiv-aktives RRAS ($HA-RRAS^{G38V}$)- und eine dominant negatives RRAS ($HA-RRAS^{S43N}$) exprimierende Zelllinie. Bei konstitutiv aktivem RRAS wird die Hydrolyse von GTP verhindert, wodurch das Protein dauerhaft aktiviert ist. Dominant negatives RRAS liegt dagegen stabil GDP-gebunden und somit inaktiviert vor. Sowohl diese drei als auch die noch unmanipulierten COS7- und CHO-Zelllinien wurden mit $HA-RAP1^{WT}$ -Expressionskonstrukten transfiziert. Zusätzlich wurden die unmanipulierten COS7- und CHO-Zelllinien mit $HA-RRAS^{WT}$ transient ko-transfiziert.

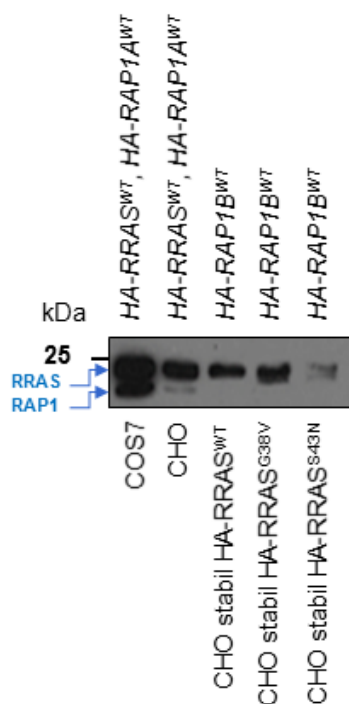


Abbildung 8: Expression von RAP1 und RRAS in verschiedenen Zelllinien

Die Zellen wurden mit $HA-RAP1^{WT}$ -Konstrukten transfiziert. Unmanipulierte COS7- und CHO-Zellen wurden zusätzlich mit $HA-RRAS^{WT}$ ko-transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate nach Western-Blot mittels Immundetektion mit anti-HA untersucht. Über dem abgebildeten Blot sind die transfizierten Konstrukte dargestellt, unter dem Blot die jeweilige Zelllinie.

$HA-RRAS$ (24 kDa) ist in allen Zelllinien exprimiert (Abb. 8). Am schwächsten exprimiert ist $HA-RRAS$ in den in den stabil transfizierten CHO $HA-RRAS^{S43N}$; in den COS7 Zellen ist die stärkste Expression zu beobachten.

Die Expression von HA-RAP1 (21 kDa) weist in den verschiedenen Zelllinien deutliche Differenzen auf: Erneut ist die stärkste Expression in den COS7 Zellen sichtbar. Im Vergleich dazu ist bei den transient transfizierten CHO-Zellen eine schwächere Bande von HA-RAP1 zu erkennen. In den stabilen CHO RRAS^{WT}-Zellen scheint HA-RAP1 nicht exprimiert zu werden und auch in der konstitutiv aktiven RRAS^{G38V} und dominant negativen RRAS^{S43N} Variante ist kein eindeutiges HA-RAP1 Signal erkennbar. Nachdem die stärkste Expression von HA-RAP1 somit eindeutig in den COS7 Zellen nachgewiesen werden konnte, wurden die weiteren Versuche mit dieser Zelllinie durchgeführt.

4.1.3 RAP1-Pull-Down in COS7-Zellen

Zur Untersuchung der möglichen Auswirkung von RRAS auf die Aktivierung von RAP1, wurden mehrere RAP1-Pull-Down-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde sich die Bindung von aktivem RAP1 an die RBD des bekannten RAP1 Effektor RalGDS zu Nutze gemacht. Über das unter 3.3.2 beschriebene Verfahren kann aktives RAP1 über die vorher an Glutathion-beschichteten Sepharosekügelchen gekoppelten GST-RalGDS[RBD] Fusionsproteine präzipitiert werden, während inaktives RAP1 keine Interaktion mit der RBD von RalGDS zeigt. COS7-Zellen wurden mit den verschiedenen RRAS-Konstrukten (*RRAS^{WT}*, *RRAS^{G38V}* und *RRAS^{S43N}*), die jeweils einmal HA- und einmal Flag-getaggt vorlagen, transfiziert. Die drei HA-getaggten RRAS-Konstrukte wurden mit einem *RAP1B^{WT}-Flag*-, die drei Flag-getaggten RRAS-Konstrukte mit *HA-RAP1A^{WT}*-Konstrukt ko-transfiziert. Die Zellen wurden anschließend lysiert. Zu den Zelllysaten wurde das an die Sepharosekügelchen gekoppelte GST-RalGDS[RBD] Fusionsprotein hinzugegeben. Sowohl Präzipitat als auch Rohlysat wurden mittels SDS-Page, Western-Blot und anschließender Immundetektion mit anti-HA- und anti-Flag-Antikörpern untersucht. Laut Arbeitshypothese a. „RRAS als Aktivator von RAP1“ ist bei der ko-transfizieren konstitutiv-aktiven RRAS^{G38V} Variante, im Vergleich zu *RRAS^{WT}* und *RRAS^{S43N}*, die größte Menge an aktivem RAP1 zu erwarten.

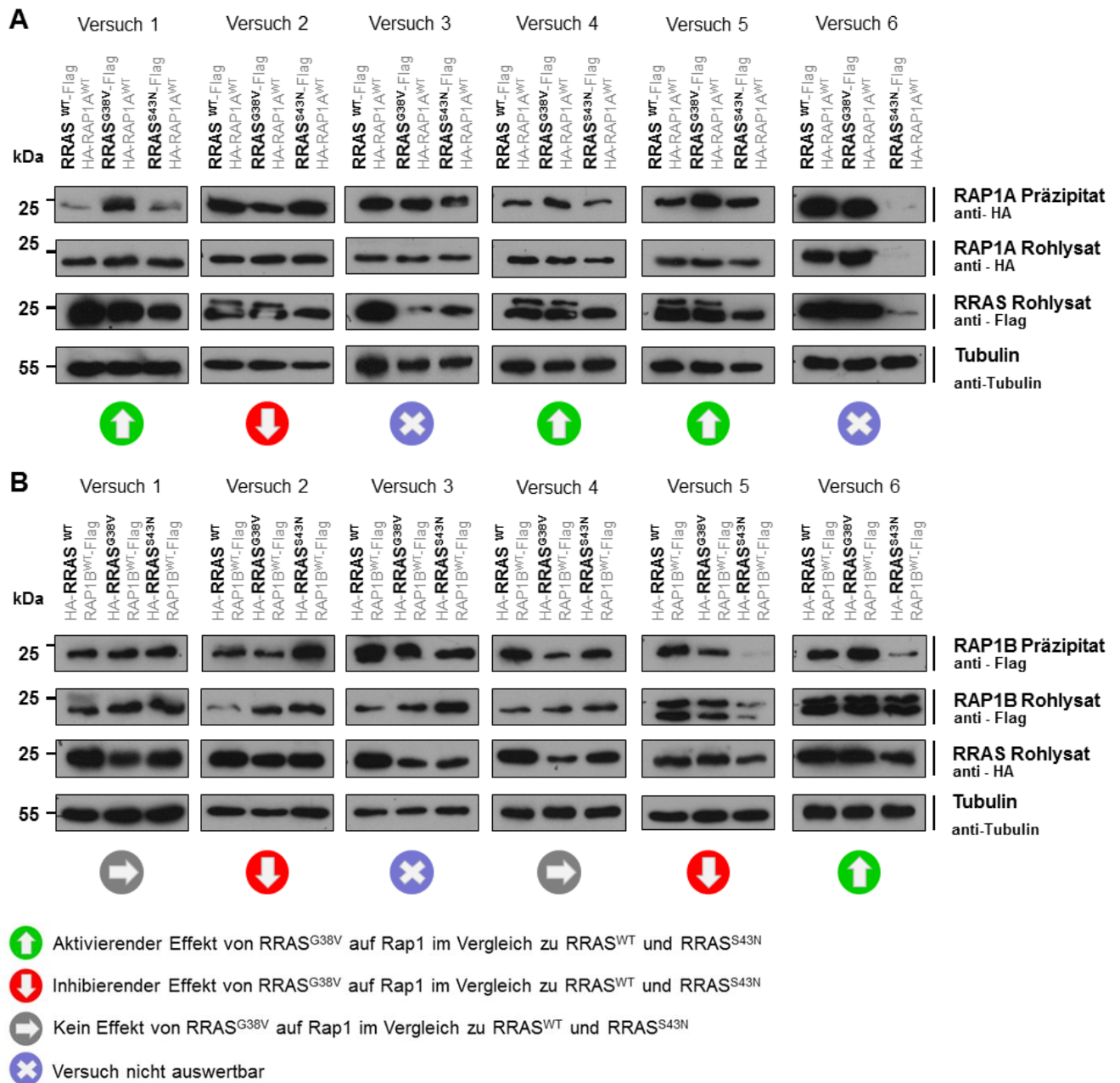


Abbildung 9: Darstellung der Interaktion von aktivem RAP1 mit GST-RalGDS[RBD] mittels RAP1-Pull-Down und Western-Blot

COS7-Zellen wurden mit (A) RRAS^{WT}-Flag-, RRAS^{G38V}-Flag-, RRAS^{S43N}-Flag- und HA-RAP1^{WT}-Konstrukten bzw. (B) HA-RRAS^{WT}-, HA-RRAS^{G38V}-, HA-RRAS^{S43N}- und RAP1^{BWT}-Flag-Konstrukten ko-transfiziert. Nach der 6-stündigen Transfektion und einem darauffolgenden Mediumwechsel wurden die Zellen lysiert und die Lysate einer Präzipitation mittels GST-RalGDS[RBD] zugeführt. Rohlysate und Präzipitate wurden nach dem Western-Blotting durch Immundetektion mit anti-HA- (unter (A): oberster Blot und zweiter Blot von oben, unter (B): dritter Blot von oben) oder anti-Flag-Antikörpern (unter (A): dritter Blot von oben, unter (B): oberster Blot und zweiter Blot von oben) analysiert. Als Ladekontrolle wurde die Menge an endogenem Tubulin mithilfe spezifischer Antikörper ermittelt ((A) und (B) unterster Blot). Links neben den Blots ist das Molekulargewicht des Proteinstandards und rechts die verwendeten Antikörper, sowie das auf diesem Blot zu analysierende Protein, angegeben. Über den Blots stehen die transfizierten Konstrukte.

Bei den in Abb. 9 gezeigten Versuchen weisen die Ladekontrollen aller Versuche eine gleichmäßige Menge an Protein auf. Zunächst werden die unter (A) dargestellten Versuche analysiert, wovon zwei nicht ausgewertet werden: Versuch 3 und Versuch 6. Bei diesen Versuchen liegen starke Schwankungen der Proteinexpression in den Rohlysaten bei den verschiedenen ko-transfizierten *RRAS-Flag* Varianten vor. Durch Differenzen der Expressionen in den Rohlysaten wird auch die Menge an aktivem HA-RAP1A im Präzipitat verfälscht. Der Versuch 3 zeigt kein gleichmäßiges Proteinlevel der verschiedenen ko-transfizierten *RRAS-Flag* Varianten im RRAS Rohlysat (Abb. 9 A, Versuch 3, 3. Blot von oben). Bei Versuch 6 sind bei den exprimierten RRAS-Flag Varianten quantitative Differenzen im HA-RAP1A Rohlysat (Abb. 9 A, Versuch 6, 2. Blot von oben) zu beobachten.

Die Auswertung der restlichen Versuche zeigt, dass bei Versuch 1, 4 und 5 eine erhöhte Menge an aktivem HA-RAP1A im Präzipitat von *RRAS^{G38V}-Flag* exprimierenden Zellen, im Vergleich zu den mit *RRAS^{WT}-Flag* und *RRAS^{S43N}-Flag* ko-transfizierten Zellen, zu detektieren ist (Abb. 9 A, Versuch 1, 4, 5, jeweils oberster Blot). Bei *RRAS^{WT}-Flag* und *RRAS^{S43N}-Flag* exprimierenden Zellen liegt eine nahezu gleiche Menge an aktivem HA-RAP1A im Präzipitat vor. Bei allen drei genannten Versuchen zeigen die Rohlysate ein konstantes Proteinlevel an HA-RAP1A (aktives und inaktives RAP1A) sowie RRAS-Flag bei allen Proteinvarianten (Abb. 9 A, Versuch 1, 4, 5, jeweils 2. und 3. Blot von oben).

Interessant sind auch die teilweise auftretenden Doppelbanden im RRAS Rohlysat von *RRAS^{WT}-Flag* und *RRAS^{G38V}-Flag* (Abb. 9 A, Versuch 2, 4, 5, 3. Blot von oben). Vermutlich sind diese auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen, die durch eine zusätzliche Bande von höherem Molekulargewicht durch Western Blotting sichtbar werden. Bei RRAS bewirkt insbesondere posttranslationale Palmitoylierung die Assoziation des Proteins an die Zellmembran (Wurtzel et al., 2012). Da *RRAS^{S43N}* im Gegensatz zu *RRAS^{WT}* und *RRAS^{G38V}* kaum an der Plasmamembran lokalisiert ist (Wurtzel et al., 2012; Conklin et al., 2010), könnte dieses auf eine geringe Palmitoylierung schließen lassen, weshalb bei dieser Proteinvariante keine Doppelbande sichtbar ist.

Im Versuchsansatz 2 liegt im Präzipitat bei *RRAS^{G38V}-Flag* exprimierenden Zellen die geringste Menge an aktivem RAP1A im Vergleich zu *RRAS^{WT}-Flag* und *RRAS^{S43N}-Flag* exprimierenden Zellen vor, welche beide ein nahezu identisches Proteinlevel zeigen (Abb. 9 A, Versuch 2, oberster Blot). Die ausgeblichenen Banden im RRAS

Rohlysate von Versuch 2 sind auf Substratdeletion zurückzuführen (Abb. 9 A, Versuch 2, 3. Blot von oben). Verglichen zu den Ergebnissen von den mit *HA-RAP1A* ko-transfizierten Zellen weisen die mit *RAP1B-Flag* ko-transfizierten Zellen weniger konsistente Ergebnisse auf (Abb. 9 B). Die Expression von HA-RRAS und/oder RAP1B-Flag in den Rohlysaten ist innerhalb der einzelnen Versuche sehr unterschiedlich (Abb. 9 B, alle Versuche, jeweils 2. und 3. Blot von oben). Daher können im Präzipitat teilweise nur zwei ko-transfizierte RRAS Varianten ausgewertet werden.

Bei Versuch 1 zeigt sich eine minimal schwächere Expression von HA-RRAS^{G38V} im HA-RRAS Rohlysate im Vergleich zu HA-RRAS^{WT} und HA-RRAS^{S43N} (Abb. 9 B, Versuch 1, 3. Blot von oben), während das RAP1B-Flag Rohlysate eine nahezu konstante Proteinmenge bei allen ko-transfizierten *HA-RRAS* Varianten aufweist (Abb. 9 B, Versuch 1, 2. Blot von oben). Im Präzipitat ist ebenfalls eine gleichmäßige Menge an aktivem RAP1B-Flag zu erkennen (Abb. 9 B, Versuch 1, oberster Blot).

Bei dem 2. Versuch können auf Grund von ungleichmäßigen Expressionen von RAP1B-Flag im Rohlysate nur die mit *HA-RRAS*^{G38V} und *HA-RRAS*^{S43N} ko-transfizierten Zellen ausgewertet werden (Abb. 9 B, Versuch 2, 2. Blot von oben). Im Präzipitat aus HA-RRAS^{S43N} exprimierenden Zellen ist ein deutlich stärkeres Signal zu Erkennen als bei Expression von HA-RRAS^{G38V} (Abb. 9 B, Versuch 2, oberster Blot), was den Ergebnissen zu den unter (A) durchgeführten Versuchen widerspricht.

Versuch 3 zeigt unterschiedliche Mengen an Protein in den Rohlysaten von RAP1B-Flag (Abb. 9 B, Versuch 3, 2. Blot von oben) und HA-RRAS (Abb. 9 B, Versuch 3, 3. Blot von oben), weshalb dieser Versuch nicht auswertbar war.

Bei Versuch 4 ist zu erkennen, dass bei HA-RRAS^{G38V} exprimierenden Zellen im HA-RRAS Rohlysate weniger Protein als bei den anderen beiden HA-RRAS Varianten detektiert werden konnte (Abb. 9 B, Versuch, 3. Blot von oben), weswegen bei diesem Versuch im Präzipitat nur die HA-RRAS^{WT} - und HA-RRAS^{S43N} exprimierenden Zellen miteinander verglichen werden. Die Menge an aktivem RAP1B-Flag ist in beiden entsprechenden Präzipitaten ähnlich (Abb. 9 B, Versuch 4, oberster Blot).

Versuch 5 zeigt eine schwächer Expression von RAP1B-Flag im Rohlysate bei HA-RRAS^{S43N} exprimierenden Zellen im Vergleich zu HA-RRAS^{WT} und HA-RRAS^{G38V} exprimierenden Zellen (Abb. 9 B, Versuch 5, 2. Blot von oben). Dementsprechend werden im Präzipitat nur mit *HA-RRAS*^{WT} und *HA-RRAS*^{G38V} ko-transfizierte Zellen verglichen. Hier zeigt sich eine etwas schwächere Expression von aktivem RAP1B-

Flag für HA-RRAS^{G38V} exprimierende Zellen im Vergleich zu HA-RRAS^{WT} exprimierenden Zellen (Abb. 9 B, Versuch 5, oberster Blot).

Im Versuch 6 ist die Menge an HA-RRAS- und RAP1B-Flag-Protein in allen drei Ansätzen vergleichbar (Abb. 9 B, Versuch 6, 2. Und 3. Blot von oben), weshalb bei diesem Versuch alle drei Proteinvarianten ausgewertet werden können. Im Präzipitat zeigt sich eine größere Menge an aktivem RAP1B-Flag bei der ko-transfizierten konstitutiv aktiven HA-RRAS^{G38V} Variante im Vergleich zu den beiden anderen HA-RRAS Varianten (Abb. 9 B, Versuch 6, oberster Blot). Bei den HA-RRAS^{S43N} exprimierenden Zellen kann erstmals eine schwächere Expression von aktivem RAP1B-Flag als bei den HA-RRAS^{WT} exprimierenden Zellen beobachtet werden (Abb. 9 B, Versuch 6, oberster Blot).

Zusammengefasst kann bei drei von sechs Versuchen eine erhöhte Konzentration an aktivem HA-RAP1A in RRAS^{G38V}-Flag exprimierenden Zellen beobachtet werden, ein Versuch zeigt ein gegenteiliges Ergebnis und zwei Versuche sind nicht auswertbar.

Bei der Analyse der Aktivierung von RAP1B-Flag zeigten zwei von sechs Versuchen eine geringere Menge an aktivem RAP1B-Flag in HA-RRAS^{G38V} exprimierenden Zellen, bei einem Versuch ist ein gegensätzliches Ergebnis zu sehen, zwei Versuche zeigen keine Veränderung der Menge an aktivem RAP1B zwischen den drei unterschiedlichen Ansätzen und ein Versuch ist nicht auswertbar.

4.2 RRAS als Rekrutor von RIAM

4.2.1 Subklonierung von RIAM cDNA in pEGFP-C1

Die direkte Interaktion zwischen RRAS und RIAM sollte durch Expression der beiden Proteine in COS7 Zellen mit anschließender Koimmunpräzipitation untersucht werden. Hierfür sollten die HA-getaggtten Expressionskonstrukte für *RRAS^{WT}*, *RRAS^{G38V}* und *RRAS^{S43N}* zusammen mit einem GFP-getaggtten *RIAM* Expressionskonstrukt zunächst ko-transfiziert und anschließend über einen GFP-Trap aus den Zelllysaten präzipitiert werden. Ein GFP-Trap besteht aus einer GFP-Bindeproteinbeschichteten Matrix (Agarose oder magnetische Beads) über die GFP getaggtte Proteine, wie in diesem Fall RIAM, binden und präzipitiert werden können. Die Präzipitate und Rohlysate sollten abschließend mittels Western-Blotting und Immundetektion mit einem HA-Antikörper auf die Anwesenheit von HA-RRAS analysiert werden. Für das Experiment

wurden zwei verschiedene RIAM cDNA enthaltende Konstrukte untersucht. Nach der Transformation der beiden Plasmide mit der RIAM cDNA in DH10B-Zellen wurde mittels Mini-Präparation die Plasmid-DNA isoliert. Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau der DNA mit *Bgl*II, welches RIAM an den cDNA-Positionen 207 Bp und 1053 Bp schneidet, woraus sich ein 846 Bp großes Fragment ergibt.

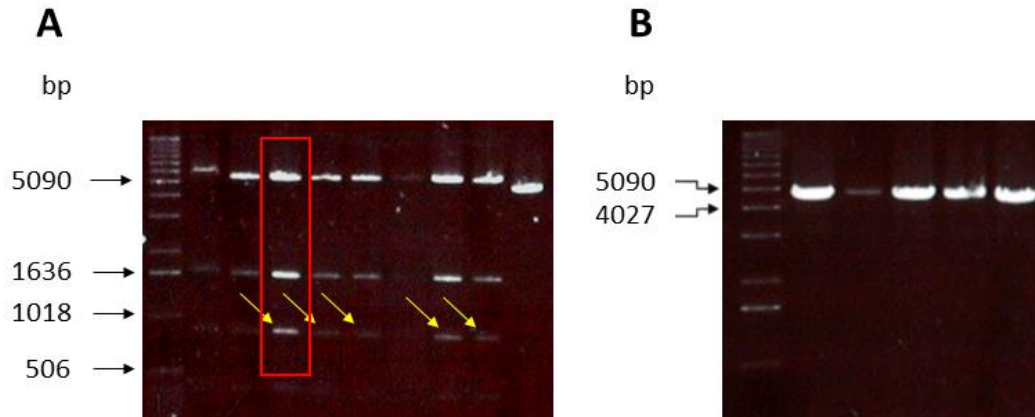


Abbildung 10: Restriktionsverdau von RIAM Expressionskonstrukten

Der Restriktionsverdau wurde mit *Bgl*II durchgeführt. Auf 0,8%ige Agarosegele, wurden 15µl Probe und 7µl Marker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 140V für ca. 1h durchgeführt. (A) Aufgetragene Restriktionsansätze des ersten RIAM enthaltenden Konstrukts, (B) aufgetragene Restriktionsansätze des zweiten RIAM enthaltenden Konstrukts. Links im Gel wurde jeweils ein 1kb DNA-Standard aufgetragen. Die gelben Pfeile deuten auf das gesuchte DNA-Fragment, das rote Rechteck markiert die Probe mit dem stärksten Signal.

Die Mehrheit der unter (A) aufgetragenen RIAM Restriktionsansätze besitzt ein DNA-Fragment in der korrekten Größe, woraus sich das Vorhandensein *RIAMs* in diesen Vektoren schlussfolgern lässt (Abb. 10 A). Die zusätzlichen Banden unter (A) sind auf Schnittstellen im Vektor zurückzuführen. Bei dem Analysegel unter (B) ist hingegen kein DNA-Fragment in der richtigen Größe zu erkennen; lediglich zwischen den Markerbanden 4027 Bp und 5090 Bp befindet sich eine Bande, die möglicherweise den geschnittenen Vektor darstellt. Auch nach mehrmaligem Wiederholen des Restriktionsverdaus mit den selben- und auch anderen Klonen konnte kein erfolgreiches Ergebnis erzielt werden, was auf das Fehlen von RIAM in diesem Vektor hindeutete. Schließlich bestätigte die Sequenzierung der beiden Konstrukte, unter Verwendung der Primer RIAM_F1, RIAM_F2, RIAM_F3, RIAM_F4, RIAM_F5, RIAM_R1 und RIAM_R2 (RIAM Sequenzierprimer), die Vermutung, dass RIAM nur im Vektor 1- nicht aber im Vektor 2 vorhanden war. Da für den geplanten GFP-Trap RIAM als GFP-Fusionskonstrukt nötig ist, wurde zunächst die Umklonierung von RIAM aus Vektor 1 in einen pEGFP Vektor durchgeführt.

4.2.2 In-Fusion Klonierung von RIAM in Stellar- und DH10B-Zellen

Für die Umklonierung von RIAM aus Vektor 1 in einen pEGFP Vektor, wurde das In-Fusion HD Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Zielvektor diente der Vektor pEGFP-C1, der zunächst mit *Hind*III linearisiert wurde. Der in Abbildung 10 markierte RIAM cDNA-Klon wurde aufgrund des Vorhandenseins des gesuchten DNA-Fragments, der hohen Intensität des nach der Elektrophorese detektierten Signals, welches auf eine hohe DNA-Konzentration schließen lässt und der fehlerlosen Sequenz von RIAM als Template für die Amplifizierung des Inserts mittels PCR ausgewählt. Für die Herstellung des PCR-Produkts wurden die Primer RIAM.pEGFP-C1.for und RIAM.pEGFP-C1.rev verwendet. Daraufhin wurden der linearisierte Vektor und das Insert über ein 0,8%iges Agarosegel auf die Richtigkeit ihrer Größen (pEGFP-C1 4,7 kb und RIAM 2 kb) kontrolliert und anschließend über das *JETQuick PCR Product Purification Spin Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Im Anschluss wurden sowohl der linearisierte Vektor als auch das Insert zur Kontrolle erneut auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Nanodrop die DNA Konzentration bestimmt (pEGFP-C1=20,9 $\frac{ng}{\mu l}$ und RIAM=12,8 $\frac{ng}{\mu l}$). Nach Integration des Inserts in den Vektor mithilfe des Infusion-HD Enzymmixes, wurde das klonierte Konstrukt zunächst in die zum In-Fusion Kit empfohlenen und mitgelieferten Stellar-Zellen transformiert. Die Plasmid-DNA mehrerer transformierter Bakterienklone wurde mittels Mini-Präparation isoliert und mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Nhe*I geschnitten (Abb. 11), wodurch DNA-Fragmente in Größen von 2732 Bp und 3968 Bp entstehen.

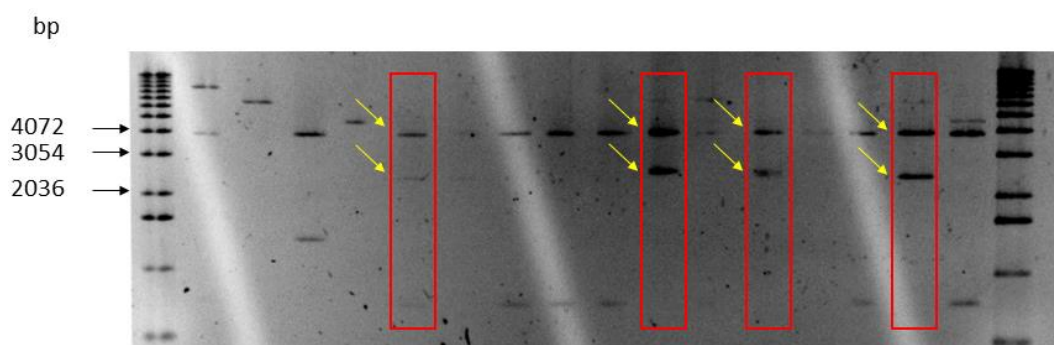


Abbildung 11: Restriktionsverdau von RIAM in pEGFP-C1 nach Transformation in Stellar-Zellen

Der Restriktionsverdau wurde mit *Hind*III und *Nhe*I durchgeführt. Von den Proben wurden 15 μ l auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 140V für ca. 1h durchgeführt. Links und rechts wurde jeweils 7 μ l eines 1kb DNA-Standards aufgetragen. Die Kästen markieren die positiven Klone. Die Pfeile deuten auf die DNA-Fragmente mit der gesuchten Größe.

Bei den markierten Klonen sind DNA-Fragmente in den gesuchten Größen zu erkennen. Daher wurde die DNA dieser Klone unter der Verwendung der RIAM Sequenzierprimer entschlüsselt. Da die Sequenzen allerdings fehlerhaft waren und an einigen Stellen Überlagerungen von mehreren Sequenzen auftraten (Abb. 13 B), konnte keine eindeutige Basenfolge erkannt werden. Auch nach mehrmaliger Durchführung der Sequenzierreaktion konnte keine saubere Sequenz erzielt werden. Das durch die In-Fusion-Reaktion hergestellte Expressionskonstrukt, bestehend aus dem pEGFP-C1 Vektor und dem integrierten RIAM Insert, wurde daraufhin zum Vergleich in DH10B Zellen transformiert. Dadurch wurde überprüft, ob die fehlerhaften Sequenzen bei der Transformation der Stellar-Zellen mit dem Expressionskonstrukt, oder aber bereits bei der Generierung dessen während der In-Fusion-Reaktion entstanden.

Erneut wurden die durch die Mini-Präparation isolierte DNA mehrerer transformierter DH10B-Bakterienklone mit *Hind*III und *Nhe*I geschnitten und auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 12).

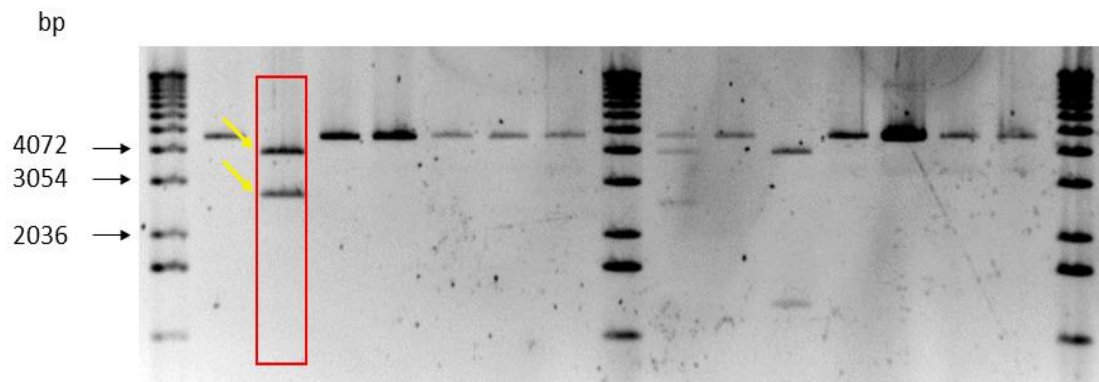


Abbildung 12: Restriktionsverdau von RIAM in pEGFP-C1 nach Transformation in DH10B-Zellen

Der Restriktionsverdau wurde mit *Hind*III und *Nhe*I durchgeführt. Von den Proben wurden 15 µl auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 140V für ca. 1h durchgeführt. Links rechts und in der Mitte wurden jeweils 7 µl eines 1kb DNA-Standards aufgetragen. Die Kästen markieren die positiven Klone. Die Pfeile deuten auf die DNA-Fragmente gesuchter Größe.

Bei dem markierten Klon sind die gesuchten Fragmente mit Größen von 2732 Bp und 3968 Bp zu erkennen, was für das Vorhandensein RIAMs in pEGFP in diesem transformierten Bakterienklon spricht. Zur Kontrolle wurde auch dieser Klon mit den RIAM Sequenzierprimern sequenziert (Abb. 13 A).

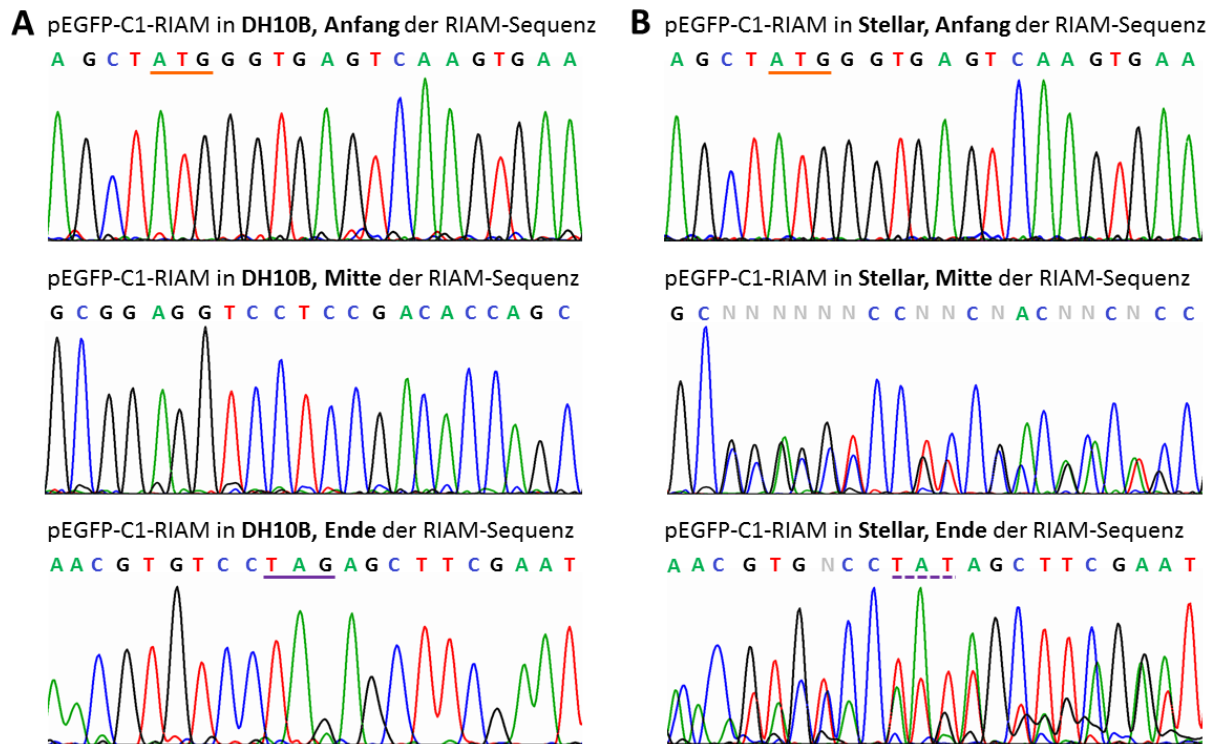


Abbildung 13: Vergleich der RIAM Sequenz nach Vermehrung des Expressionskonstrukts in Stellar- und DH10B-Zellen

Dargestellt sind Auszüge aus den Sequenzen von (A) pEGFP-C1-RIAM nach Vervielfältigung in DH10B-Zellen und (B) pEGFP-C1-RIAM nach Vervielfältigung in Stellar Zellen. Es sind jeweils der Übergang von dem Vektor in *RIAM*, eine mittlerer Teil der *RIAM* Sequenz und der Übergang von *RIAM* in den Vektor abgebildet. Das Start-Codon von *RIAM* ist orange unterstrichen; das Stopp-Codon wird durch eine lila Unterstreichung gekennzeichnet (gestrichelte Linie = falsch erkanntes Stopp-Codon).

Bei dem Übergang vom pEGFP-C1 Vektor in *RIAM* ist bei der in DH10B und Stellar-Zellen transformierten Plasmid-DNA eine saubere und eindeutige Sequenz zu sehen (Abb. 13 A und B, jeweils oberste Sequenz). Durch das Start-Codon 5'-ATG-3' wird der Anfang von *RIAM* dargestellt. In der Mitte der *RIAM* Sequenz zeigt sich bei der in Stellar-Zellen transformierten Plasmid-DNA Überlagerungen von mehreren Sequenzen (Abb. 13 B, mittlere Sequenz). Aufgrund einer Reihe unerkannter Basen, gekennzeichnet durch ein „N“, bilden sich große Lücken in der Sequenz. Bei der in DH10B-Zellen transformierten Plasmid-DNA ist hingegen eine saubere *RIAM* Sequenz zu erkennen (Abb. 13 A, mittlere Sequenz), die sich bis zum Ende des Gens fortsetzt (Abb. 13 A, untere Sequenz). Das in Stellar-Zellen transformierte *RIAM* zeigt auch am Übergang von *RIAM* in den Vektor Überlagerungen der richtigen Sequenz von mindestens einer weiteren Sequenz, wodurch erneut Lücken in der Basenfolge entstehen und teilweise falsche Basen erkannt werden (z.B. beim Stopp-Codon 5'-TAT-3' statt 5'-TAG-3') (Abb. 13 B, untere Sequenz).

Abschließend kann gesagt werden, dass die anfänglich fehlerhaften Sequenzen *RIAMs* auf die Transformation des *pEGFP-C1-RIAM* Konstrukts in die Stellar zurückzuführen waren, da eine Transformation des selben klonierten Expressionskonstrukts in den DH10B-Zellen eine saubere Sequenz lieferte.

Da die Umklonierung von *RIAM* aus dem Ursprungsvektor in den *pEGFP-C1* Vektor letztendlich mehr Zeit in Anspruch nahm als ursprünglich geplant, konnte die Transfektion der *COS7* Zellen mit den verschiedenen *HA-RRAS* Expressionskonstrukten und dem hergestellten *pEGFP-C1-RIAM* Konstrukt und der darauffolgende GFP-Trap nicht mehr durchgeführt werden.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war den Einfluss von RRAS auf die Talin-abhängige Aktivierung der Integrine zu untersuchen. Mechanistisch wurden zwei Hypothesen verfolgt: (i) RRAS wirkt als Aktivator von RAP1, einem Signaling-Protein *upstream* von Talin und (ii) RRAS ist ein direkter Rekrutator des Talin Bindeproteins RIAM. Während zur Überprüfung der ersten Hypothese in dieser Arbeit bereits biochemische Analysen durchgeführt wurden, liegt der Arbeitsfortschritt hinsichtlich der zweiten Hypothese bei molekularbiologischen Vorbereitungsarbeiten, nämlich Subklonierung der RIAM-cDNA.

In der Diskussion werden aufgrund der vorgestellten Versuchsergebnisse Rückschlüsse auf die Auswirkung von RRAS auf die Aktivierung von Rap1 gezogen. Außerdem werden strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Isoformen RAP1A und Rap1B als verantwortlich für divergierende Ergebnisse diskutiert.

5.1 RRAS^{G38V} könnte als Aktivator von RAP1A wirken

Für die kleinen GTPasen RRAS und RAP1 konnte jeweils im GTP-gebundenen Zustand eine Stimulation der Integrin-Aktivierung und der Bildung fokaler Adhäsionen nachgewiesen werden (Conklin et al., 2010; Lafuente et al., 2004). Eine Kooperation der beiden GTPasen bei diesem Mechanismus wurde bislang nicht untersucht.

Die in dieser Arbeit dargestellten RAP1-*Pull-Down* Experimente deuten auf eine stimulierende Wirkung von konstitutiv aktivem RRAS^{G38V} auf die Aktivität von RAP1A hin. Diese Aussage wird durch die erhöhte Menge an aktivem (präzipitierbarem) RAP1A in konstitutiv aktiven RRAS^{G38V} exprimierenden Zellen im Vergleich zu RRAS^{WT} und RRAS^{S43N} exprimierenden Zellen in drei von vier auswertbaren Versuchen gestützt. Unter der Annahme, dass GTP-gebundenes RRAS (RRAS^{G38V}) RAP1A aktiviert, könnte die von Furuholm und Peränen (2003) beschriebene vermehrte Bildung fokaler Adhäsionen durch konstitutiv aktives RRAS folgendermaßen zu erklären sein: GTP-gebundenes RRAS aktiviert über ein derzeit noch nicht identifiziertes Signalprotein die GTPase RAP1A. Aktives RAP1A wiederum führt zur Bildung von „Integrin-Aktivierungs-Komplexen“, die RIAM und Talin enthalten (Han et al., 2006). Diese Komplexe können durch Bindung von Talin an die Integrin β -Untereinheit die Aktivierung der Integrine bewirken (Tadokoro et al., 2003), wodurch

es zur vermehrten Bildung fokaler Adhäsionen kommt (Guan, 1997). Über eine derartige Signaltransduktionskette könnte demnach RRAS Integrin-abhängige biologische Prozesse der Zelle, wie etwa Zellmigration, Proliferation, Kommunikation mit der extrazellulären Matrix sowie Immunantworten, regulieren (Hynes, 2002).

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen RRAS und RAP1B konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden, da die Ergebnisse widersprüchlich sind. Allerdings kann aufgrund der sehr uneinheitlichen Ergebnisse spekuliert werden, dass RAP1B und RRAS nicht wie RAP1A und RRAS kooperieren.

5.2 Rolle des RAP1 C-Terminus bei der unterschiedlichen Auswirkung von RRAS auf RAP1A und RAP1B

Die beiden RAP1 Isoformen RAP1A und RAP1B sind zu 95% identisch (Wittchen et al., 2011). Trotzdem konnten bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keine kongruenten Auswirkungen von RRAS auf RAP1A bzw. RAP1B beobachtet werden.

Der strukturelle Unterschied zwischen den beiden beschränkt sich auf neun von insgesamt 184 im Protein enthaltenen Aminosäuren. Von diesen neun ungleichen Aminosäuren befinden sich wiederum sechs in dem 13 Aminosäuren langem C-Terminus des Proteins (Wittchen et al., 2011).

Möglicherweise befinden sich innerhalb dieser sechs Aminosäuren Erkennungsstellen z.B. für ein von RRAS aktivierbares, RAP1A-spezifisches GEF-Protein, welches jedoch nicht an RAP1B binden kann.

Eine weitere Begründung für den unterschiedlichen Einfluss von RRAS auf RAP1A und RAP1B bezieht sich ebenfalls auf die Differenzen der beiden Isoformen im C-Terminus. Da aktives RRAS größtenteils Membran-assoziiert vorliegt (Conklin et al., 2010), liegt eine subzelluläre Lokalisation von RAP1 ebenfalls an der Zellmembran, um eine funktionelle Signalweiterleitung zwischen diesen Proteinen zu gewährleisten. Am C-Terminus von RAP1 liegen eine Reihe positiv geladener, basischer Aminosäuren, die mit der negativ geladenen Plasmamembran interagieren und zusätzlich zu der Lipid-Modifikation von RAP1 die Adsorption an die Membran verstärken. Des Weiteren wurden am C-Terminus Phosphorylierungsstellen für die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA) lokalisiert. Die Phosphorylierung von RAP1 durch PKA hat eine elektrostatische Ladungsumkehr zur Folge, wodurch eine

Translokation des Proteins von der Plasmamembran ins Cytoplasma, also eine Relokation, erfolgt (Takahashi et al., 2013).

Unter der Annahme, dass die sechs unterschiedlichen C-terminalen Aminosäuren zwischen RAP1A und RAP1B die Lokalisation von RAP1 über die zwei beschriebenen Mechanismen (Lipid-abhängige Membranadsorption und phosphorylierungs-abhängige Relokation) beeinflussen, ist eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung von RAP1A und RAP1B durchaus möglich; dies könnte zu einer spezifischen Verortung von RAP1A nicht aber von RAP1B zusammen mit RRAS führen. Unterstützt wird die These der unterschiedlichen Verteilung von RAP1A und RAP1B in der Zelle durch eine Publikation von Wittchen et al., 2011, in der tatsächlich unterschiedliche Lokalisationen von RAP1A und RAP1B bei der Cadherin-abhängigen Bildung von Zelladhäsionen in Humanen Endothelzellen (HUVEC-Zellen) beschrieben werden: RAP1A ist vermehrt an Zell-Zell-Kontaktstellen präsent, während RAP1B besonders perinukleär lokalisiert ist. Bemerkenswerterweise haben die transmembranen Integrine und Cadherine Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihres bidirektionalen Signalweges, so teilen sie sich etwa gleiche Effektoren und regulieren schließlich ähnliche Prozesse in der Zelle (Weber et al., 2011). Die Beobachtungen von Wittchen et al. können daher als Hinweis auf eine unterschiedliche Funktion von RAP1A und RAP1B bei der Talin-abhängigen Aktivierung der Integrine angesehen werden.

Zusammengefasst könnte also der unterschiedliche C-Terminus von RAP1A und RAP1B eine differentielle Lokalisation bewirken und nur Rap1A in örtliche Nähe von Membran-assoziiertem RRAS bringen. Dadurch ließe sich die in dieser Arbeit nachgewiesene vermehrte Menge von aktivem RAP1A, nicht aber von RAP1B, in RRAS^{G38V} exprimierenden Zellen erklären.

6 Zusammenfassung

Integrine sind Transmembranproteine, die im aktivierten Zustand ihre Konformation ändern und dadurch viele biologische Prozesse der Zelle, wie beispielsweise Zellmigration, Blutgerinnung, Verbindung mit der extrazellulären Matrix und die Immunantwort, regulieren. Das Verständnis für die Aktivierung der Integrine ist daher von besonderem Interesse. Für die kleine GTPase RAP1 ist eine Funktion bei der Integrin-Aktivierung bereits bekannt: Liegt RAP1 im aktiven, GTP-gebundenen Zustand vor, kann es über Bildung eines „Integrin-Aktivierungs-Komplexes“, der den RAP1-Effektor RIAM und das Integrin-Bindeprotein Talin enthält, die Integrine aktivieren. Auch für die kleine GTPase RRAS konnte eine aktivierende Wirkung auf die Integrine und die Bildung fokaler Adhäsionen beschrieben werden. Der genaue Mechanismus ist hierbei unklar.

Das Ziel dieser Arbeit war es die Rolle von RRAS bei der Talin-abhängigen Aktivierung der Integrine zu untersuchen, wofür zwei Arbeitshypothesen aufgestellt wurden: (i) RRAS wirkt *upstream* als Aktivator von RAP1 und (ii) RRAS wirkt als Rekrutor von RIAM.

Zur Untersuchung einer möglichen stimulierenden Wirkung von RRAS auf RAP1 wurden unterschiedliche RRAS Varianten (Wildtyp $RRAS^{WT}$, konstitutiv aktives $RRAS^{G38V}$ bzw. dominant negatives $RRAS^{S43N}$) mit RAP1A- oder RAP1B-Konstrukten in COS7-Zellen ko-transfiziert. Durch RAP1-Pull-Down-Experimente stellte sich heraus, dass die Menge an aktivem RAP1A in $RRAS^{G38V}$ exprimierenden Zellen höher ist als in $RRAS^{WT}$ und $RRAS^{S43N}$ exprimierenden Zellen, weshalb auf eine aktivierende Wirkung von $RRAS^{G38V}$ auf RAP1A geschlossen werden kann. Für RAP1B konnte eine solche stimulierende Wirkung von RRAS nicht nachgewiesen werden. Die laut den derzeit vorliegenden Ergebnissen unterschiedliche funktionelle Wirkung von RRAS auf RAP1A bzw. RAP1B könnte am ungleichen C-Terminus und der daraus resultierenden differentiellen subzellulären Lokalisation der beiden Isoformen liegen.

Zur Überprüfung ob RRAS als Rekrutor von RIAM wirkt wurde bereits ein *RIAM* cDNA Konstrukt mit GFP-Epitop im pEGFP-C1 Vektor zur Expression in einer heterologen Zelllinie hergestellt. Dieses Konstrukt soll zusammen mit verschiedenen *RRAS* Konstrukten in nachfolgenden Koimmunpräzipitationsexperimenten eingesetzt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Abram, Clare L.; Lowell, Clifford A.** (2009): The ins and outs of leukocyte integrin signaling. In: *Annu. Rev. Immunol.* 27, S. 339–362.
- Calderwood, David A.; Yan, Boxu; de Pereda, Jose M; Alvarez, Begoña García; Fujioka, Yosuke; Liddington, Robert C.; Ginsberg, Mark H.** (2002): The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. In: *J. Biol. Chem.* 277 (24), S. 21749–21758.
- Campbell, Iain D.; Humphries, Martin J.** (2011): Integrin structure, activation, and interactions. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (3).
- Chhatiwala, Mariya Khuzem** (2008): Defining diverse mechanisms that regulate the activity of Dbl-family guanine nucleotide exchange factors. Dissertation am Department Pharmakologie an der Universität von North Carolina.
- Conklin, Matthew W.; Ada-Nguema, Aude; Parsons, Maddy; Riching, Kristin M.; Keely, Patricia J.** (2010): R-Ras regulates beta1-integrin trafficking via effects on membrane ruffling and endocytosis. In: *BMC Cell Biol.* 11, S. 14.
- Elliott, P. R.; Goult, B. T.; Kopp, P. M.; Bate, N.; Grossmann, J. G.; Roberts, G. C. et al.** (2010): The Structure of the talin head reveals a novel extended conformation of the FERM domain. In: *Structure* 18 (10), S. 1289–1299.
- Furuhjelm, Johanna; Peränen, Johan** (2003): The C-terminal end of R-Ras contains a focal adhesion targeting signal. In: *J. Cell. Sci.* 116 (Pt 18), S. 3729–3738.
- Goult, Benjamin T.; Zacharchenko, Thomas; Bate, Neil; Tsang, Ricky; Hey, Fiona; Gingras, Alexandre R. et al.** (2013): RIAM and vinculin binding to talin are mutually exclusive and regulate adhesion assembly and turnover. In: *J. Biol. Chem.* 288 (12), S. 8238–8249.
- Guan, Jun-Lin** (1997): Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (8-9), S. 1085–1096.
- Han, Jaewon; Lim, Chinten James; Watanabe, Naohide; Soriani, Alessandra; Ratnikov, Boris; Calderwood, David A. et al.** (2006): Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin alphaIIb beta3. In: *Curr. Biol.* 16 (18), S. 1796–1806.
- Holly, Stephen P.; Larson, Mark K.; Parise, Leslie V.** (2005): The Unique N-Terminus of R-Ras Is Required for Rac Activation and Precise Regulation of Cell Migration. In: *Mol Biol Cell.* 16 (5), S. 2458–2469.
- Hynes, Richard O.** (2002): Integrins Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. In: *Cell* 110 (6), S. 673–687.
- Kinbara, Kayoko; Goldfinger, Lawrence E.; Hansen, Malene; Chou, Fan-Li; Ginsberg, Mark H.** (2003): Ras GTPases: integrins' friends or foes? In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (10), S. 767–776.
- Lafuente, Esther M.; van Puijenbroek, André A F L; Krause, Matthias; Carman, Christopher V.; Freeman, Gordon J.; Berezovskaya, Alla et al.** (2004): RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. In: *Dev. Cell* 7 (4), S. 585–595.
- Lee, Ho-Sup; Lim, Chinten James; Puzon-McLaughlin, Wilma; Shattil, Sanford J.; Ginsberg, Mark H.** (2009): RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences. In: *J. Biol. Chem.* 284 (8), S. 5119–5127.

- Lowe, David G.; Goeddel, David V.** (1987): Heterologous expression and characterization of the human R-ras gene product. In: *Mol Cell Biol.* 7 (8), S. 2845–2856.
- McHugh, Brian J.; Buttery, Robert; Lad, Yatish; Banks, Stephen; Haslett, Christopher; Sethi, Tariq** (2010): Integrin activation by Fam38A uses a novel mechanism of R-Ras targeting to the endoplasmic reticulum. In: *J. Cell. Sci.* 123 (Pt 1), S. 51–61.
- Milburn, Michael V.; Tong, Liang; de Vos, Abraham M.; Brunger, Alex; Yamaizumi, Ziro; Nishimura, Susumu; Kim, Sung-Hou** (1990): Molecular switch for signal transduction, structural differences between active and inactive forms of ras Proteins. In: *Science* 247 (4945), S. 939–945.
- Plow, E. F.; Haas, T. A.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith, J. W.** (2000): Ligand binding to integrins. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (29), S. 21785–21788.
- Roberts, Gordon; Critchley, David R.** (2009): Structural and biophysical properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. In: *Biophys Rev* 1 (2), S. 61–69.
- Sabbatini, Maria Eugenia** (2010): RAP1. Am Department für molekulare und integrative Physiologie an der Universität von Michigan.
- Shattil, Sanford J.; Kim, Chungo; Ginsberg, Mark H.** (2010): The final steps of integrin activation: the end game. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (4), S. 288–300.
- Tadokoro, Seiji; Shattil, Sanford J.; Eto, Koji; Tai, Vera; Liddington, Robert C.; de Pereda, Jose M et al.** (2003): Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. In: *Science* 302 (5642), S. 103–106.
- Takahashi, Maho; Dillon, Tara J.; Liu, Chang; Kariya, Yumi; Wang, Zhiping; Stork, Philip J. S.** (2013): Protein kinase A-dependent phosphorylation of Rap1 regulates its membrane localization and cell migration. In: *J. Biol. Chem.* 288 (39), S. 27712–27723.
- Takaya, Akiyuki; Kamio, Takahiro; Masuda, Michitaka; Mochizuki, Naoki; Sawa, Hirofumi; Sato, Mami et al.** (2007): R-Ras Regulates Exocytosis by Rgl2Rlf-mediated Activation of RalA on Endosomes. In: *Mol Biol Cell.* 18 (5), S. 1850–1860.
- Weber, Gregory F.; Bjerke, Maureen A.; DeSimone, Douglas W.** (2011): Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 8), S. 1183–1193.
- Wittchen, Erika S.; Aghajanian, Amir; Burridge, Keith** (2011): Isoform-specific differences between Rap1A and Rap1B GTPases in the formation of endothelial cell junctions. In: *Small GTPases* 2 (2), S. 65–76.
- Wurtzel, Jeremy; Kumar, Puneet; Goldfinger, Lawrence E.** (2012): Palmitoylation regulates vesicular trafficking of R-Ras to membrane ruffles and effects on ruffling and cell spreading. In: *Small GTPases* 3 (3), S. 139–153.

Danksagung

Mein Dank geht insbesondere an Dr. Georg Rosenberger für die Bereitstellung des Themas und der tollen Betreuung meiner Bachelorarbeit. Ich danke auch für die ausführliche Durchsicht meiner Arbeit und für all die hilfreichen Ratschläge!

Ich danke auch Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Kristina Brand für die hervorragende Einarbeitung im Labor und all die Unterstützung bedanken!

Bei allen Mitgliedern der AG Rosenberger und AG Kutsche möchte ich mich für die produktive und freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken!