



Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Institut für Humangenetik  
AG PD Dr. Rosenberger

BACHELORARBEIT

Studien zu Protein-Protein-  
Interaktionen der kleinen GTPase  
RRAS, dem Adaptorprotein RIAM  
und dem Zytoskelettprotein TALIN

Jan Bautsch

30. April 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich
2. Gutachter: PD Dr. Georg Rosenberger

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>7</b>
2.1	RASopathien .....	7
2.2	Die kleine GTPase RRAS .....	7
2.3	Fokale Adhäsionen und Integrinaktivierung.....	9
2.4	Arbeitshypothesen.....	11
2.4.1	RRAS steuert über eine direkte Interaktion mit TALIN die Aktivierung von Integrinen .....	11
2.4.2	RRAS rekrutiert das TALIN-Bindeprotein RIAM und reguliert so die TALIN-vermittelte Aktivierung der Integrine.....	12
2.5	Ziele der Arbeit .....	13
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
3.1	Material .....	14
3.1.1	Zelllinien und Bakterienstämme.....	14
3.1.2	Konstrukte.....	14
3.1.3	Antikörper .....	15
3.1.3.1	Primärantikörper .....	15
3.1.3.2	Sekundärantikörper.....	16
3.1.4	Medien.....	16
3.1.4.1	Bakterienkultur.....	16
3.1.4.2	Zellkultur .....	17
3.1.5	Puffer.....	18
3.1.5.1	Zellkultur .....	18
3.1.5.2	Zellyse und Co-Immunpräzipitation .....	18
3.1.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	19
3.1.5.4	Western Blot.....	20
3.1.6	Chemikalien .....	20
3.1.7	Enzyme, Kits, Proteine .....	22
3.1.8	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	22
3.1.9	Software und Datenbanken.....	23

3.2	Methoden .....	24
3.2.1	Zellbiologische Methoden.....	24
3.2.1.1	Kulturbedingungen .....	24
3.2.1.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	24
3.2.1.3	Passagieren von Zellen.....	24
3.2.1.4	Transiente Transfektion mittels Lipofektamin™ .....	25
3.2.1.5	Kontrolle nach der Transfektion .....	25
3.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	25
3.2.2.1	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen mittels Hitzeschock.....	25
3.2.2.2	Anzucht von Bakterienkulturen.....	26
3.2.2.3	Plasmidpräparation (Maxi-Präparation) .....	26
3.2.2.4	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA .....	26
3.2.3	Biochemische Methoden .....	26
3.2.3.1	Herstellung von Zellysaten.....	26
3.2.3.2	Co-Immunpräzipitation .....	26
3.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	27
3.2.3.4	Western Blot.....	28
3.2.3.5	Immundetektion.....	28
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
4.1	Untersuchung der Interaktion zwischen TALIN-head und RRAS .....	30
4.2	Untersuchung der Interaktion zwischen RIAM und RRAS .....	32
4.3	Untersuchung einer Komplexbildung zwischen RIAM, TALIN-full und RRAS .....	34
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>40</b>
5.1	Die Co-Immunpräzipitation mittels GFP-Trap ist nur bedingt geeignet für die Darstellung einer Interaktion zwischen GFP-TALIN und HA-RRAS <sup>G38V</sup> bzw. HA-RRAS <sup>S43N</sup> 40	
5.2	RRAS interagiert mit der head-Region von TALIN .....	41
5.3	RRAS geht sowohl mit TALIN als auch RIAM eine Interaktion ein und könnte so die Bildung eines Integrin-Aktivierungs-Komplexes stimulieren.....	41
<b>6</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>46</b>

9	Tabellenverzeichnis .....	47
10	Literaturverzeichnis .....	48
	Danksagung.....	51
	Eidesstattliche Erklärung.....	52

## 1 Zusammenfassung

Als RASopathien wird eine Gruppe klinisch ähnlicher Erkrankungen mit typischen Charakteristika, nämlich kraniofazialen Dysmorphien, kongenitalen Herzfehlern und kognitiven Entwicklungsstörungen, bezeichnet. Keimbahnmutationen in Genen, die für Proteine des RAS-MAPK-Signalwegs kodieren, sind die genetische Ursache für diese Syndrome. Kürzlich wurden bei Patienten mit einem RASopathie-ähnlichen Phänotyp Keimbahnmutationen im Gen für die kleine GTPase RRAS entdeckt. RRAS gehört zur Familie der RAS-Proteine, die als kleine GTPasen eine zentrale Rolle für die Weiterleitung von Signalen in der Zelle einnehmen. RRAS wirkt als molekularer Schalter, indem es zwischen einem aktiven (GTP-gebunden) und einem inaktiven (GDP-gebunden) Zustand alterniert. Zellbiologisch wurde für RRAS eine Funktion bei der Bildung von fokalen Adhäsionen beschrieben. Über diese zellulären Adhäsionsstellen wird in erster Linie die Verbindung und somit Verankerung der Zelle mit bzw. in der extrazellulären Matrix gewährleistet. Darüber hinaus werden über fokale Adhäsionen bidirektional Signale zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix vermittelt. Äußerst wichtige Proteine für diese Funktionen sind die Integrine, welche in den fokalen Adhäsionen stark angereichert vorliegen. Integrine können über RRAS-abhängige molekulare Mechanismen reguliert werden, wobei das Integrin-Bindeprotein TALIN bereits als darin involviert beschrieben wurde; die genauen molekularen Zusammenhänge sind jedoch noch unklar. Daher könnte RRAS über eine direkte Interaktion mit TALIN die Aktivierung von Integrinen steuern. Alternativ könnte RRAS indirekt über das TALIN-Bindeprotein RIAM mit TALIN komplexieren und so zu einer TALIN-vermittelten Regulation der Integrine beitragen.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob zwischen RRAS und dem Zytoskelettprotein TALIN, zwischen RRAS und dem Adaptorprotein RIAM sowie RRAS, RIAM und TALIN Protein-Protein-Interaktionen nachweisbar sind.

Die hierzu durchgeführten Versuche umfassten die ektopische Expression der zu untersuchenden Proteine in COS7-Zellen mit anschließender Co-Immunpräzipitation und Western Blot-Analyse. Um eine mögliche Abhängigkeit dieser putativen Interaktionen vom RRAS-Aktivitätsstatus darstellen zu können, wurden alternativ zu RRAS-Wildtyp- auch konstitutiv-aktives RRAS (RRAS<sup>G38V</sup>) und dominant-negativ wirkendes RRAS (RRAS<sup>S43N</sup>) eingesetzt.

Es konnte für RRAS sowohl eine Interaktion mit dem Zytoskelettprotein TALIN, als auch mit dem Adaptorprotein RIAM experimentell nachgewiesen werden. Die erhobenen Resultate deuten jedoch nicht verlässlich darauf hin, dass RIAM eine Interaktion zwischen RRAS und TALIN vermittelt. Schließlich zeigte sich in den durchgeführten Analysen, dass der RRAS-Aktivierungsstatus keinen Einfluss auf jegliche der hier aufgedeckten Interaktionen hat. Aus

diesem Grund erscheint eine von der RRAS-Aktivität abhängige Schalterfunktion, über welche die Aktivierung der Integrine gesteuert wird, eher unwahrscheinlich.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse geben erste Hinweise auf die Rolle von RRAS bei der TALIN-vermittelten Aktivierung der Integrine. Allerdings konnten, möglicherweise methodisch bedingt, nicht alle Determinanten für die Interaktionen der drei Proteine beschreiben werden. Aus diesem Grund sollten weitere Protein-Protein-Bindeassays, auch unter Berücksichtigung der hier diskutierten Lösungsansätze, durchgeführt werden.

Eine genaue Kenntnis der zellulären Funktion von RRAS kann zu einem detaillierteren Bild der Pathophysiologie der RASopathien führen und so Wege für zukünftige wissenschaftliche Therapieoptionen ebnet.

## 2 Einleitung und Zielsetzung

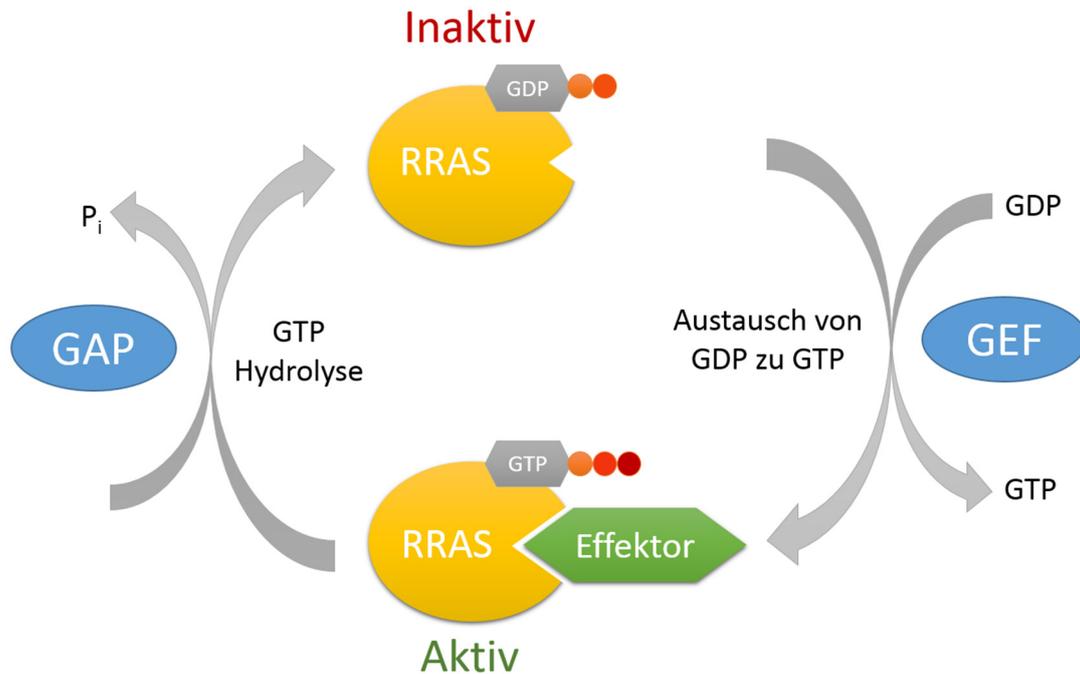
### 2.1 RASopathien

RASopathien ist der Oberbegriff für eine Reihe von klinisch und genetisch ähnlichen Syndromen, die alle verursacht werden durch Keimbahnmutationen in Genen, die für Proteine des RAS (rat sarcoma)-MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Signalwegs codieren (Bentires-Alj, et al., 2006; Jorge, et al., 2009). Dieser Signaltransduktionsweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Steuerung des Zell-Zyklus, dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung, sowie dem programmierten Zelltod. Meist führen Rasopathie-assoziierte Mutationen zu einer Überstimulation des RAS-MAPK-Signalweges, die zu gravierenden Entwicklungsdefekten führt (Tartaglia & Gelb, 2010; Tidyman & Rauen, 2009). Klinisch findet man bei diesen Syndromen Kleinwuchs, kraniofaziale Dysmorphien, kongenitale Herzfehler und teilweise kognitive Entwicklungsstörungen (Tidyman & Rauen, 2009; Zenker, 2011). Eine der am häufigsten auftretenden Erkrankungen innerhalb der RASopathien ist das Noonan-Syndrom (Binder, 2009; Zenker, 2011). 2014 wurden bei Patienten mit Noonan-Syndrom überlappendem Phänotyp neue Keimbahnmutationen entdeckt, die sich in dem Gen für die kleine GTPase RRAS (related RAS viral (r-ras) oncogene homolog) befinden (Flex, et al., 2014).

### 2.2 Die kleine GTPase RRAS

Das Protein RRAS gehört zur Familie der RAS-Proteine, die zu den kleinen GTPasen gezählt werden. RAS-Proteine werden ubiquitär exprimiert und spielen eine entscheidende Rolle bei der Weiterleitung von Signalen innerhalb der Zelle, indem sie als sogenannte molekulare Schalter wirken (Lowe & Goeddel, 1987; Gotoh, et al., 1997).

Der Aktivierungsstatus wird dabei über das Guanosin-Nukleotid gesteuert (Abbildung 2.1). Sogenannte Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) vermitteln den Austausch von GDP nach GTP und bringen damit die RAS-GTPase in den „angeschalteten“ Zustand. So kann RAS an mehrere Proteine von verschiedenen Signalwegen binden und diese aktivieren (Milburn, et al., 1990). Sobald das GTP unter Abspaltung einer Phosphatgruppe zu Guanosindiphosphat (GDP) hydrolysiert wird, verändert das RAS-Protein seine Konformation, kann somit nicht mehr mit seinen Effektoren interagieren und befindet sich folglich im deaktivierten Zustand. Die schwache intrinsische Hydrolyse-Aktivität des Proteins wird durch weitere Proteine, den sog. GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs), katalysiert (Karnoub & Weinberg, 2008).



**Abbildung 2.1: Der RRAS-GTPase Zyklus**

RRAS alterniert zwischen einem aktiven und inaktiven Zustand und nimmt dabei die Rolle eines molekularen Schalters ein. Befindet sich RRAS im aktiven GTP-gebundenen Zustand, ist es zugänglich für verschiedene Effektoren, die ihrerseits Signaltransduktionskaskaden in der Zelle stimulieren. Dieser aktive Zustand von RRAS wird durch die Hydrolyse von GTP zu GDP beendet. Hierbei geht das Protein eine Konformationsänderung durch und befindet sich daraufhin im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand, in dem es nicht mehr mit Effektoren interagieren kann. Da sowohl die intrinsische Hydrolyse-Aktivität, als auch der Nukleotidaustausch sehr langsame Vorgänge sind, werden diese katalysiert. Den Austausch des GDPs zu GTP stimulieren dabei Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF) und die Hydrolyse von GTP zu GDP wird von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) verstärkt.

Strukturell weist RRAS, wie alle Ras-GTPasen, eine P-Loop und eine Switch I- und Switch II-Region vor (Milburn, et al., 1990; Vetter & Wittinghofer, 2001). Die P-Loop vermittelt die Nukleotidbindung, indem es an die zweite Phosphatgruppe des GTP/GDP-Nukleotids bindet. Die Switch I-Region bindet, unterstützt durch ein Magnesium-Ion, an die dritte Phosphatgruppe des GTPs und steht so in keinem Kontakt zum GDP. Die Switch II-Region ist entscheidend für die Hydrolyse von GTP nach GDP. Gleichzeitig stellen die beiden Switch-Regionen auch die Interaktionsbereiche der Effektoren und Regulatoren von RRAS dar und sind zusätzlich die Bereiche des Proteins, die eine Konformationsänderung bei Aktivierung mit GTP durchgehen und damit die Schalterfunktion des Proteins ausmachen. Außerdem wird das Protein durch eine CVLL-Sequenz posttranslational durch eine Palmitoylierung modifiziert, wodurch es an die Plasmamembran lokalisiert wird (Ahearn, et al., 2012). RRAS ist mit seinen 218 Aminosäuren über 50 % mit den Aminosäuresequenzen der Ras-GTPasen HRAS (55 %), KRAS (59 %) und NRAS (54 %) homolog. Am N-Terminus weist

RRAS jedoch eine Sequenz von 26 Aminosäuren mit noch unbekannter Funktion auf (Lowe & Goeddel, 1987).

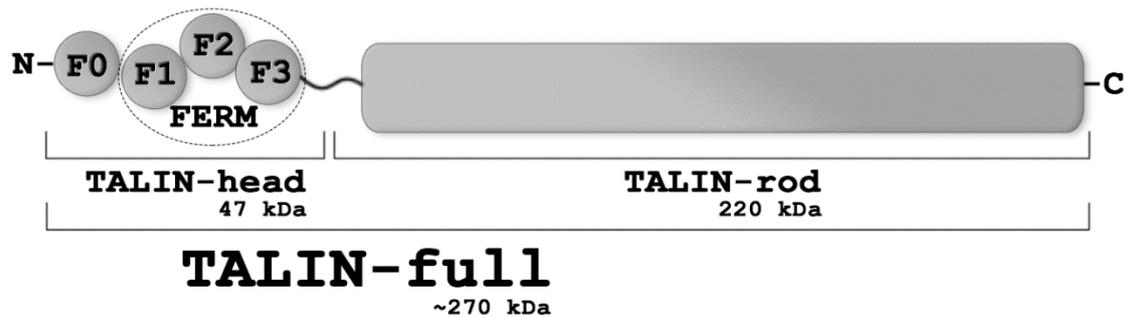
Während die RAS-Proteine HRAS und KRAS über die Transduktion von inter- oder extrazellulären Signalen in erster Linie das zelluläre Wachstum, die Differenzierung und das Überleben der Zelle steuern (Mitin, et al., 2005), wurde für RRAS auch eine Rolle bei der Regulation der Zelladhäsion beschrieben (Furuhjelm & Peränen, 2003).

### 2.3 Fokale Adhäsionen und Integrinaktivierung

Fokale Adhäsionen tragen als Komplexe aus zahlreichen Proteinen eine entscheidende Rolle für viele Zellfunktionen. Unter anderem verankern sie die Zelle mit der extrazellulären Matrix (EZM), sind maßgeblich beteiligt an Zellproliferation, -differenzierung und -migration und bilden außerdem einen Knotenpunkt für die Übertragung biochemischer Signale von diversen regulatorischen Signalwegen (Zamir & Geiger, 2001; Chen, et al., 2003; Wolfenson, et al., 2009). An diesen Adhäsionsstellen findet man in angereicherter Form sogenannte Integrine. Diese Proteine durchspannen die Zellmembran als Dimere, die mit ihrer größeren extrazellulären Domäne an Komponenten der EZM binden und mit ihrem kleineren Teil in das Zytoplasma der Zelle hineinragen, um dort eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herzustellen (Huttenlocher & Horwitz, 2011). Diese Verbindung gibt der Zelle nicht nur mechanische Stabilität, sondern fungiert auch als bidirektionaler Informationsaustausch (Abram & Lowell, 2009). Beim sog. inside-out-signaling wird durch interzelluläre Signale die Aktivierung der Integrine stimuliert. Der Vorgang wird durch Proteine innerhalb der Zelle ausgelöst, indem diese an die intrazelluläre Domäne der Integrine binden, woraufhin diese eine Konformationsänderung eingehen und dem extrazellulären Teil so eine Bindung mit der EZM ermöglicht wird (Kinbara, et al., 2003).

Ein bekannter Aktivator der Integrine ist das Protein TALIN, das in hoher Konzentration an fokalen Adhäsionen vorkommt und die Integrine entweder direkt, oder indirekt über Adaptorproteine an das Aktin-Zytoskelett bindet (Tadokoro, et al., 2003; Calderwood, 2004).

TALIN besteht aus einer 220 kDa C-terminalen rod-Region und einer 47 kDa N-terminalen head-Region (Abbildung 2.2). Letztere wird noch weiter in die FERM-Domäne, die wiederum aus den F1-, F2- und F3-Subdomänen besteht, und die F0-Domäne unterteilt (Critchley, 2009; Elliott, et al., 2010). Die F2- und F3- Subdomänen gehen die Bindung mit der Integrin-Untereinheit ein, während die N-terminale rod-Region die Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett ermöglicht (Calderwood, 2004; Roberts & Critchley, 2009).



### Abbildung 2.2: Schematische Domänenstruktur von TALIN

Die drei Subdomänen (F1, F2, F3) bilden die FERM-Domäne, die wiederum zusammen mit der F0-Subdomäne die 47 kDa schwere TALIN-head-Region umfasst. Gemeinsam mit der 220 kDa schweren TALIN-rod-Region, die ihrerseits aus vielen Subdomänen besteht (hier nicht dargestellt), bilden diese das gesamte ca. 270 kDa schwere Protein TALIN-full.

Interessanterweise zeigt die F0-Domäne eine hohe strukturelle Homologie zur RBD (Ras-binding domain) vom RAS-Effektorprotein RALGDS auf (Huang, et al., 1998). Außerdem findet sich bei dieser Domäne die gleiche elektrostatische Ausrichtung, wie auch bei RALGDS und anderen Ras-binding-Domänen wieder (Goult, et al., 2010).

RAS-GTPasen wurden eine Beteiligung bei der TALIN-vermittelten Aktivierung der Integrine zugeschrieben, der genaue Mechanismus ist aber noch schlecht verstanden (Kinbara, et al., 2003). Die hier beschriebene Ähnlichkeit zwischen RBD und TALIN F0-Domäne könnte auf eine putative Interaktion von RRAS mit der F0-Domäne deuten, also im Sinne von TALIN als Effektor von RRAS. Über diese Bindung könnte es zu einer Aktivierung der Integrine kommen. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass in TALIN-defizienten Zellen RRAS Integrine nicht aktiviert (Tadokoro, et al., 2003).

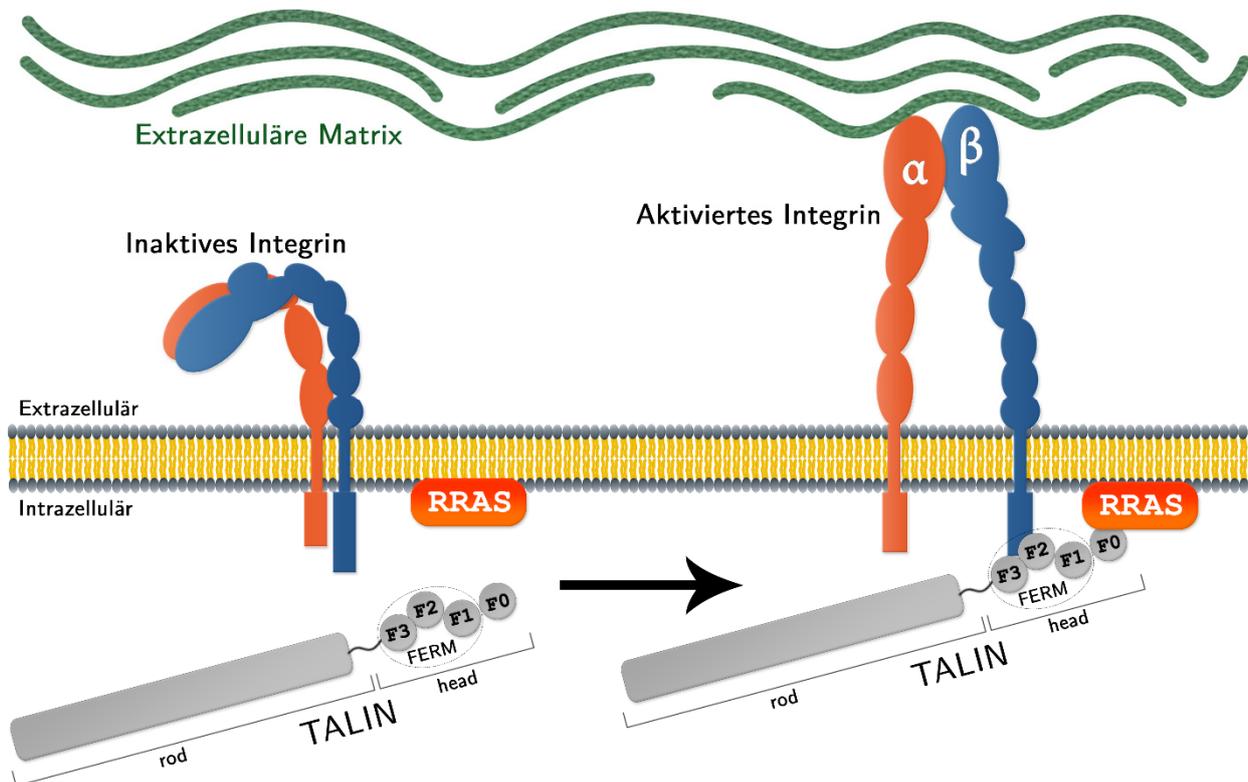
Alternativ könnten noch weitere Proteine bei der Übermittlung des Signals zur Aktivierung der Integrine beteiligt sein. Für die GTPase RAP1 wurde ebenfalls beschrieben, dass es über TALIN Integrine aktivieren kann (Kooistra, et al., 2007). Hierbei rekrutiert RAP1 in seinem aktiven Zustand das Adaptorprotein RIAM (RAP1-GTP interacting adapter molecule) in fokalen Adhäsionen an die Zellmembran. RIAM interagiert daraufhin mit TALIN-rod und vermittelt so über TALIN eine Aktivierung der Integrine (Lafuente, et al., 2004; Lee, et al., 2009). RAP1 weist sowohl von der Aminosäuresequenz (Quelle: National Center for Biotechnology Information, NCBI) als auch strukturell (Quelle: Protein Data Base, PDB) große Ähnlichkeiten mit RRAS auf, sodass für RRAS möglicherweise auch ein Integrin-Aktivierungskomplex, der TALIN und RIAM enthält, denkbar ist.

## 2.4 Arbeitshypothesen

Es ist bekannt, dass RRAS Integrine aktivieren und damit fokale Adhensionsstellen regulieren kann. TALIN spielt hierbei eine entscheidende Rolle, der genaue molekulare Prozess muss allerdings noch aufgeklärt werden. Diesbezüglich wurden zwei Arbeitshypothesen entwickelt:

### 2.4.1 RRAS steuert über eine direkte Interaktion mit TALIN die Aktivierung von Integrinen

Bei dieser Hypothese lokalisiert aktives GTP-gebundenes RRAS an der Zellmembran und interagiert dort mit der F0-Subdomäne vom TALIN-head. Diese direkte Interaktion mit TALIN könnte zur Rekrutierung oder genauen Positionierung von TALIN an Integrin-haltige Adhäsionen führen. Dort kann TALIN dann mit seiner F2- und F3-Subdomäne an die intrazelluläre  $\beta$ -Untereinheit des Integrins binden (Elliott, et al., 2010). Daraufhin macht das Integrin eine Konformationsänderung durch, geht so vom inaktiven in seinen aktivierten Zustand über und kann mit der EZM assoziieren (Abbildung 2.3).

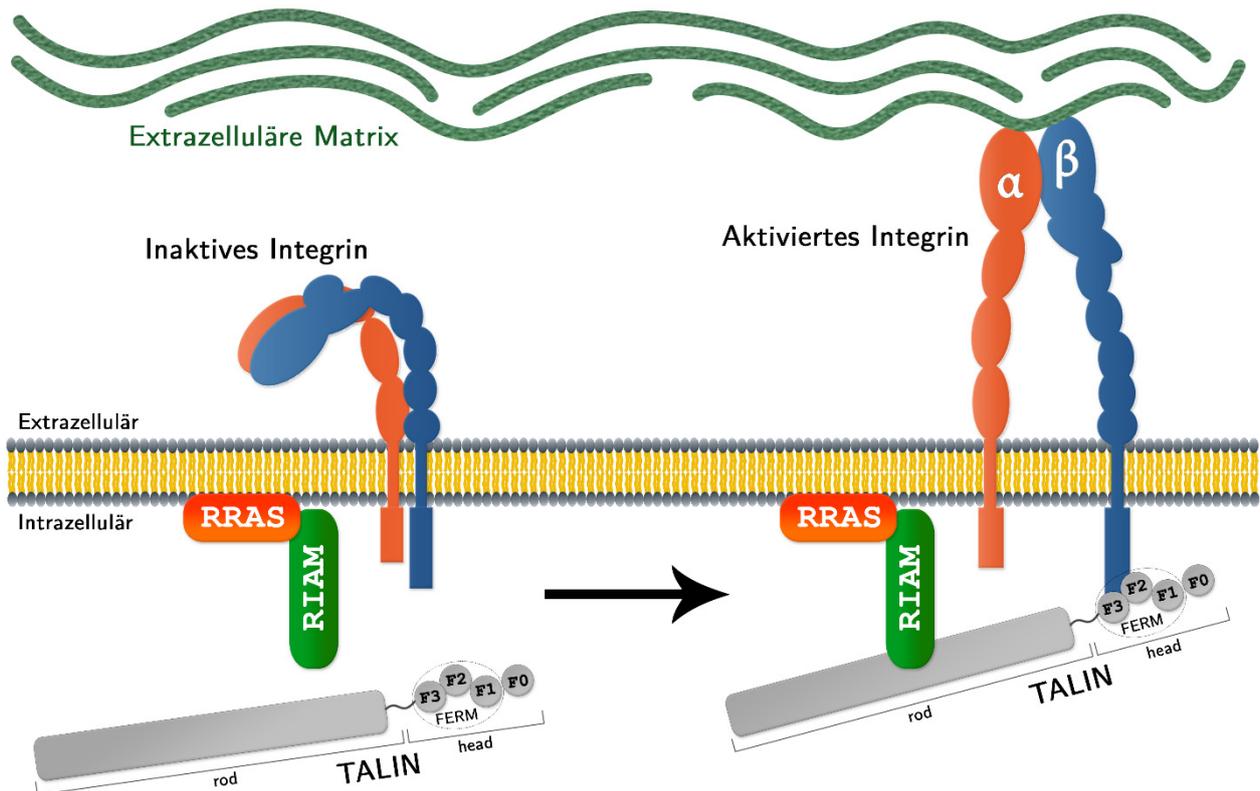


**Abbildung 2.3: Integrin-Aktivierung über eine direkte Interaktion von RRAS mit TALIN**

RRAS lokalisiert im aktiven Zustand (GTP-gebunden) an der Zellmembran und bringt TALIN, durch eine Bindung mit dessen F0-Subdomäne, in die Nähe der Integrine. Dort geht TALIN über die F2- und F3-Subdomäne eine Bindung mit der intrazellulären  $\beta$ -Untereinheit des Integrins ein, was eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne hervorruft. Das Integrin ist nun aktiviert und kann eine Bindung mit der extrazellulären Matrix eingehen.

### 2.4.2 RRAS rekrutiert das TALIN-Bindeprotein RIAM und reguliert so die TALIN-vermittelte Aktivierung der Integrine

Nach einer alternativen Hypothese rekrutiert aktives RRAS RIAM an die Plasmamembran, wo letztere TALIN-rod bindet und TALIN so in räumliche Nähe zu den Integrinen bringt. Hier findet dann wieder die Interaktion zwischen TALIN-head und intrazellulärem Integrinabschnitt statt und die Integrine werden, durch TALIN vermittelt, aktiviert (Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.4: Ein RRAS::RIAM-Proteinkomplex ermöglicht die TALIN-vermittelte Integrin-Aktivierung**

Aktives, an der Plasmamembran lokalisiertes RRAS relokalisiert RIAM an fokale Adhäsionsstellen an der Plasmamembran. Das Adaptorprotein RIAM interagiert sodann mit der rod-Region von TALIN und bringt TALIN so in die Nähe der Integrine. TALIN-head (F2- und F3-Domäne) assoziiert dort mit der β-Untereinheit des Integrins. Diese Interaktion führt zur Konformationsänderung des Integrins und dessen extrazellulärer Teil kann nun eine Bindung mit der extrazellulären Matrix eingehen.

## 2.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist eine Überprüfung auf eine molekulare Komplexbildung zwischen RRAS und TALIN, zwischen RRAS und RIAM, sowie zwischen RRAS, TALIN und RIAM durchzuführen. Methodisch soll dies durch die Überexpression der zu untersuchenden Proteine in COS7-Zellen mit anschließender Co-Immunpräzipitation, Western Blot-Analyse und Immundetektion erreicht werden.

Damit soll eine putative Kooperation dieser drei Proteine bei der Integrin-Aktivierung analysiert werden, um so ein besseres Verständnis des Einflusses von RRAS bei der Regulation von fokalen Adhäsionen zu erlangen.

Hinsichtlich der Erkrankungsgruppe der RASopathien können in dieser Studie eruierte Daten neue Aspekte zur molekularen Pathogenese aufdecken, was wiederum neue Wege für zukünftige Therapien ebnet.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 3.1: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien (DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

Typ	Bezeichnung	Eigenschaften / Zelltyp	Herkunft
Bakterienstamm	<i>E. coli</i> DH10 $\beta$	F- mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK $\lambda$ -rpsL (Str <sup>R</sup> ) nupG	Life Technologies (Darmstadt)
Zelllinie	COS7	Adhärente Fibroblasten aus dem Nierengewebe der grünen Meerkatzen	DSMZ (Braunschweig)

#### 3.1.2 Konstrukte

Tabelle 3.2: Verwendete Konstrukte für die Transfektion in Eukaryonten

Name	Name des Inserts und Genbank-Nummer	Codierte Aminosäuren	Herkunft
pMT2SM-HA-RRAS <sup>WT</sup>	Wildtyp RRAS (NM_006270.3)	2-218	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pMT2SM-HA- RRAS <sup>G38V</sup>	RRAS mit Mutation p.G38V	2-218	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pMT2SM-HA-RRAS <sup>S43N</sup>	RRAS mit Mutation p.S43N	2-218	AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pEGFP-C1-TALIN-full	Wildtyp TLN1 (NM_011602.5)	1-2541	Addgene (USA)
pEGFP-C1- TALIN- head	Wildtyp TLN1	1-433	Addgene (USA)

pEGFP-C1- TALIN-rod	Wildtyp TLN1	434-2541	Addgene (USA)
pEGFP-C1-RIAM	Wildtyp RIAM (NM_019043.3)		AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
mCherry-RIAM	Wildtyp RIAM		Christoph Ballestrem (University of Manchester)
pMT2SM-HA	Keins / Leervektor		AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pEGFP-C1	Keins / Leervektor		AG Rosenberger (UKE, Hamburg)
pmRFP_N1	Keins / Leervektor		AG Rosenberger (UKE, Hamburg)

### 3.1.3 Antikörper

#### 3.1.3.1 Primärantikörper

Tabelle 3.3: Genutzte Primärantikörper mit Angabe der verwendeten Verdünnung für den Western Blot

Name	Antigen	Hergestellt in	Verdünnung für Western Blot	Hersteller
anti-GFP	GFP-Tag	Kaninchen	1:1000	Clontech (USA)
anti-RED	RFP-Tag	Ratte	1:1000	Chromotek (Planegg-Martinsried)

### 3.1.3.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3.4: Genutzte Sekundärantikörper mit Angabe der verwendeten Verdünnung im Western Blot

Name	Antigen	Konjugat	Hergestellt in	Verdünnung für Western Blot	Hersteller
anti-HA-HRP High Affinity (3F10)	Hämagglutinin des humanen Influenzavirus	Meerrettich-peroxidase	Ratte	1:40000	Roche (Mannheim)
ECL™ Eesel-anti-Kaninchen-HRP	GFP-Tag	Meerrettich-peroxidase	Eesel	1:5000	GE Healthcare (Freiburg)
HRPO-IgG (H+L) Goat Anti-RAT	RFP-Tag	Meerrettich-peroxidase	Ziege	1:2500	Dianova (Hamburg)

### 3.1.4 Medien

#### 3.1.4.1 Bakterienkultur

Tabelle 3.5: Medien die zur Anzucht und Kultivierung von Bakterien verwendet wurden

Name	Substanz
LB-Medium (pH 7,0)	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	10 g Natriumchlorid
	ad 10000 ml Aqua dest.
Agar für Festmedien	+ 15 g/l Agar (in LB-Medium)
Ampicillin	250 mg/l Ampicillin (in LB-Medium)
Kanamycin	25 mg/l Kanamycin (in LB-Medium)

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

### 3.1.4.2 Zellkultur

Tabelle 3.6: Medien und Zusätze die zur Kultivierung von Zellen genutzt wurden

Name	Hersteller
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)
TrypLE™	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml / 100 mg/ml)	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 3.7: Medien für die Kultivierung und Durchführung der Experimente

Name	Substanz
Vollmedium	100 % DMEM
	10 % FBS (v/v)
	1 % Penicillin/Streptomycin (v/v)
Einfriermedium	100 % Vollmedium
	10 % DMSO (v/v)

### 3.1.5 Puffer

#### 3.1.5.1 Zellkultur

Tabelle 3.8: Verwendete Puffer für die Kultivierung von Zellen

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

#### 3.1.5.2 Zellyse und Co-Immunpräzipitation

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der genutzten Puffer für die Co-Immunpräzipitation

Name	Substanz
GFP-Trap-Lysepuffer (gleichzeitig Wasch- und Präzipitationspuffer)	10 mM Tris/Cl pH 7,5
	150 mM NaCl
	0,5 mM EDTA
	0,5% NP40 (v/v)
1x PBS <sup>+/+</sup> (pH 7,4)	8 g NaCl
	0,2 g KCl
	1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	9 ml CaCl <sub>2</sub> (100 mM)
	5,2 ml MgCl <sub>2</sub> (100 mM)
	1,6 ml MgSO <sub>4</sub> (100 mM)
ad 1000 ml Aqua dest.	

## 3.1.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 3.10: Eingesetzte Puffer für die SDS-PAGE

Name	Substanz	
4x Trenngelpuffer (pH 8,8 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> eingestellt)	2 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	91 g	Tris
	ad 500 ml	Aqua dest.
4x Sammelgelpuffer (pH 6,8 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> eingestellt)	2 g	SDS
	30,3 g	Tris
	ad 500 ml	Aqua dest.
4 x Laemmlipuffer (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 (pH 8,3)	288,4 g	Glycin
	40 g	SDS
	60,6 g	Tris
	ad 2000 ml	Aqua bidest.
Sammelgel (5 %)	0,975 ml	Aqua dest.
	0,425 ml	4x Sammelgelpuffer
	0,3 ml	Acrylamid/Bisacrylamid
	1,575 µl	TEMED
	31,25 µl	10%-iges APS in Aqua dest.
Trenngel (10 %)	2,1 ml	Aqua dest.
	1,25 ml	4x Trenngelpuffer
	1,7 ml	Acrylamid/Bisacrylamid
	5 µl	TEMED
	85 µl	10%-iges APS in Aqua dest.

### 3 Material und Methoden

Trenngel (15 %)	1,23 ml	Aqua dest.
	1,25 ml	4x Trenngelpuffer
	2,5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid
	5 µl	TEMED
	85 µl	10%-iges APS in Aqua dest.

#### 3.1.5.4 Western Blot

Tabelle 3.11: Puffer für die Durchführung des Western Blots

Name	Substanz	
Transferpuffer (pH 8,3)	150 mM	Glycin
	25 mM	Tris
	10 %	Methanol (v/v)
10x TBST	1,5 M	NaCl
	200 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	1 %	Tween 20 (v/v)

Tabelle 3.12: In dieser Arbeit genutzte Antikörperlösungen

Gelöster Antikörper	Lösungsmittel	
anti-HA-HRP	0,5 %	Milchpulver in 1x TBST (w/v)
anti-rabbit-HRP	0,5 %	Milchpulver in 1x TBST (w/v)
anti-rat-HRP	1x TBST	
anti-GFP	0,5 %	Milchpulver in 1x TBST (w/v)
anti-RFP	5 %	Milchpulver in 1x TBST (w/v)

#### 3.1.6 Chemikalien

Tabelle 3.13: Übersicht aller verwendeten Chemikalien

Name	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA 30%; 37,5:1)	Biorad (München)

### 3 Material und Methoden

---

Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ampicillin-Natriumsalz ( $C_{16}H_{18}N_3O_4S \cdot Na$ )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Milchpulver)	Biorad (München)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim)
D-Glucose	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
EZview™ Red Anti-HA Affinity Gel	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
GFP-Trap_A	Chromotek (Planegg-Martinsried)
Glycerol ( $C_3H_8O_3$ )	Roth (Karlsruhe)
Glycin ( $C_2H_5NO_2$ )	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Invitrogen (Karlsruhe)
Immobilon™ Western-Chemiluminescent HRP-substrate	Merck (Darmstadt)
Isopropanol ( $C_3H_8O$ )	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	Merck (Darmstadt)
Lipofectamin™2000 Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat ( $MgSO_4$ )	Merck (Darmstadt)
Methanol ( $CH_3OH$ )	Merck (Darmstadt)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED; $C_6H_{16}N_2$ )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker (Griesheim)
Natriumdihydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Nonidet P40 / Igepal ( $C_{30}H_{54}O_{12}$ )	ICN (Eschwege)
Phosphorsäure ( $H_3PO_4$ )	Merck (Darmstadt)
Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

### 3 Material und Methoden

Restore™ Western-Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific (Bonn)
Trizma® Base (Tris; C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypton Becton	Dickinson (Heidelberg)
Wasser für Chromatographie (HPLC)	Merck (Darmstadt)

#### 3.1.7 Enzyme, Kits, Proteine

Tabelle 3.14: Verwendete Enzyme, Kits und Proteine

Name	Hersteller
Immobilon™ Western	Millipore (Schwalbach)
NucleoBond® Extra Maxi	Macherey/Nagel (Düren)
PageRuler™ Plus Prestained Protein	Fermentas (St. Leon-Rot)

#### 3.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.15: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
100 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Sarstedt (Nürnbrecht)
Agarplatten	Greiner (Essen)
Autoklav	Tecnomara (Fernwald)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40 CFL, HBO 50, MBQ 52 AC	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Göttingen)
Filmentwickler OPTIMAX X-Ray Film Processor	Protec® (Oberstenfeld-Gronau)
Geldokumentationssystem ChemiDoc™ XRS+ System	BioRad (München)
Gelelektrophoresekammer	BioRad (München)
Heizblock (Typ:52526101)	Liebisch (Bielefeld)
Kühlzentrifuge „Sorvall superspeed RC2-B“	Thermo Scientific
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg)
Kunststoff-Tubes (Eppi)	Eppendorf AG (Hamburg)
Kunststoff-Tubes (Falcon)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Laserscanmikroskop DMIRE2	Leica (Mannheim)
Magnetrührer RET basic	IKA Labortechnik (Staufen i. Br.)

Mini-Protean® Tetra Cell Apparatur für Polyacrylamidgele	BioRad (München)
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
pH-Meter	WTW (Weilheim)
Photometer BioPhotometer	Eppendorf AG (Hamburg)
PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten Finnpiptetten	Thermo Labsystems (Mannheim)
PVDF (Polyvinylidendifluorid) Western Blotting Membran	Roche (Mannheim)
Röntgenfilme (Cronex 5)	AGFA (Berlin)
Schüttelapparat „Centromat R“	B. Braun Biotech International (Melsungen)
Schüttelapparat 3006	GFL (Burgwedel)
Schüttelautomat „Rocky“	Fröbel Labortechnik (Lindau)
Semi-Dry Fastblot B34	Biometra (Göttingen)
Spannungsgeber Standard Power Pack P25	Biometra (Göttingen)
Sterilwerkbank HERA safe Typ 12/2, 1995	Heraeus (Hanau)
Sterilwerkbank Lamin Air Instruments	Heraeus (Hanau)
Thermomixer compact	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus (Hanau)
Überkoprotator RS-60 Tube Rotator	BioSan (Riga, Lettland)
Vortexmischer Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000	Scientific Industries, INC. (USA)
Waage „Sartorius ISO 9001“	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad GFL 1083	GFL (Burgwedel)
Whatman-3mm-Chromatographie-Papier	Whatman (Dassel)
Zentrifuge Labofuge GL	Heraeus (Hanau)

#### 3.1.9 Software und Datenbanken

Tabelle 3.16: Computerprogramme und bioinformatische Datenbanken

Name	Typ	Anwendung
NCBI PubMed	Datenbank	Literaturrecherche
RCSB PDB	Datenbank	Proteindaten
NCBI BLAST	Software	Aminosäuren-Sequenzabgleich
Image Lab™	Software	Western Blot Bildentwicklung

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

##### 3.2.1.1 Kulturbedingungen

COS7-Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) mit 10% FBS (fötales Rinderserum) (v/v) und 1% P/S (Penicillin/Streptomycin) (v/v) bei konstanten 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Bei diesen Zellen handelt es sich um Fibroblasten aus dem Nierengewebe der grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*).

##### 3.2.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Alle COS7-Zellen wurden aus Kryo-Kulturen, die als Aliquots bei -150 °C gelagert wurden, entnommen. Hierfür wurden sie in einem 37 °C Wasserbad erwärmt und sofort in 8 ml vorgewärmtes Vollmedium überführt. Diese Suspension wurde für 5 min bei 900 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und anschließend auf eine Kulturplatte überführt.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese bei ca. 95% Konfluenz mit 1 ml TrypLE™ (Trypsin) von der Zellkulturschale abgelöst und die Reaktion mit 8 ml Vollmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde dann ebenfalls 5 min bei 900 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 3 ml, auf Eis gekühltem Einfriermedium (Vollmedium mit 10% DMSO; verhindert Auskristallisieren des Zytoplasmas und Platzen der Zellen) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension auf 1 ml Kryoröhrchen aliquotiert und in einem Einfrierbehälter über Nacht bei -80 °C gefroren, um letztendlich am nächsten Tag in einem -150 °C Gefrierschrank endgelagert zu werden.

##### 3.2.1.3 Passagieren von Zellen

Bei einer Konfluenz von ca. 80-90 % wurden die Zellen ca. alle 4 Tage für eine kontinuierliche Kultivierung auf neue Zellkulturplatten überführt. Hierfür wurde das vorhandene Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml 1x PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und durch Zugabe von 1 ml TrypLE™ (Trypsin) für wenige Minuten bei 37 °C abgelöst. Die restlichen ungelösten Zellen wurden durch leichtes Klopfen vom Boden der Zellkulturschale abgetrennt. Anschließend wurde die Trypsinierung durch die Zugabe von 9 ml Vollmedium gestoppt und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren in Suspension gebracht. Diese Suspension wurde dann auf eine neue Kulturplatte überführt und dabei im Verhältnis 1:10 auf ein Volumen von 10 ml gebracht.

### 3.2.1.4 Transiente Transfektion mittels Lipofektamin™

Die für die Transfektion vorgesehenen Zellen wurden am Vortag auf 10 ml Zellkulturplatten so ausgelegt, dass eine für die Transfektion optimale Konfluenz von 60-80% erreicht wurde. Zur Überexpression des jeweiligen Zielgens wurde der aufgereinigte DNA-Expressionsvektor mit Hilfe von Lipofektamin in die Zellen gebracht. Für die Transfektion wurde Lipofektamin™ genutzt, das eine Lipidschicht um die Plasmid-DNA bildet und auf diese Weise den Transport über die Zellmembran ermöglicht (Lipofektion). Hierfür wurden zwei Transfektionsansätze vorbereitet: Zum einen wurden 400 µl Opti-MEM® mit dem benötigten Volumen an Lipofektamin™ versetzt (Verhältnis 1 µg Plasmid-DNA zu 2 µl Lipofektamin™). Daneben wurde die Plasmid-DNA in 400 µl Opti-MEM® verdünnt. Die Plasmid-DNA-Menge variierte je nach Konstrukt zwischen 2-4 µg. Beide Ansätze wurden 5 min bei RT inkubiert, dann vermischt und weitere 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die zu transfizierenden Zellen mit 1 ml 1x PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und 3,2 ml Opti-MEM® auf die Kulturschale vorgelegt. Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Platte verteilt und diese leicht geschwenkt. Es folgte eine Inkubation von ca. 4-5 h im Inkubationsbrutschrank mit anschließendem Wechsel des Mediums auf 10 ml Vollmedium. Auf diese Weise transfizierte Zellen wurden dann bis zur Lyse weiter im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.1.5 Kontrolle nach der Transfektion

Vor der Zellyse wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40 CFL betrachtet. Dadurch konnte eine Abschätzung über den Transfektionserfolg aller Konstrukte, die mit einem GFP- oder RFP-Tag versehen waren, gemacht werden. Mit diesen Konstrukten transfizierte Zellen exprimierten folglich GFP- und RFP-Proteine, welche nach Anregung unter dem Fluoreszenzmikroskop Licht emittieren. So konnte Ansätze mit schwach, oder nicht leuchtenden Zellen von weiteren Analysen ausgeschlossen werden.

## 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.2.1 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock

Die Vervielfältigung der Expressionskonstrukte erfolgte in *E. coli* DH10β Bakterien. Diese wurden mit der Plasmid-DNA über die Hitzeschock-Methode nach folgender Vorgehensweise transformiert: Zuerst wurden kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und jeweils 50 µl dieser Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA vermischt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden diese für 90 Sekunden bei 42 °C schlagartig erwärmt. Anschließend wurde wieder 5 min auf Eis inkubiert und 700 µl SOC-Medium hinzugefügt, um die Zellen dann bei 37 °C im Schüttelinkubator wachsen zu lassen. Um ein plattierbares Volumen zu erhalten wurden die Ansätze bei 300 rpm und Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. In der zurückbleibenden Flüssigkeit wurden die Zellen resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotika-Zusatz ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht im Inkubator bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.2.2 Anzucht von Bakterienkulturen

Die in Abschnitt 3.2.2.1 transformierten Bakterien wurden am nächsten Tag als Einzelkolonie von den Agarplatten gepickt und in jeweils 2 ml antibiotikahaltigem LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikum vermehrt. Nach 6 h Inkubationszeit wird mit dieser Vorkultur 200 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (1:1000) angeimpft und in einem Schüttelkolben über Nacht in einem Inkubator bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

### 3.2.2.3 Plasmidpräparation (Maxi-Präparation)

Um eine große Menge von reiner Plasmid-DNA aus den Bakterien zu isolieren, wurden diese am nächsten Tag lysiert und mit dem NucleoBond® Xtra Maxi Kit der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt. Die Bakterienlyse, Ionenaustauschchromatographie und DNA-Fällung wurde dabei nach dem Herstellerprotokoll des Kits durchgeführt. Letztendlich wurde die so gewonnene DNA in Aqua dest. gelöst und in 1 ml Aliquots abgefüllt, die alle auf eine Konzentration von ca. 1 µg/µl eingestellt wurden. Gelagert wurden die Aliquots bei -20 °C.

### 3.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Zur Einstellung der passenden Konzentration der Plasmid-DNA nach der Plasmidpräparation und vor der Transfektion wurde diese photometrisch im Nanodrop ND-1000 nach Herstellervorschriften gemessen. Gleichzeitig wurde über den Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260/280}$ ) eine starke Verunreinigung der DNA durch Proteine und Alkohole ausgeschlossen (Ratio DNA 1,6-1,8).

## 3.2.3 Biochemische Methoden

### 3.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Die adhärennten Zellen wurden auf Eis zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS<sup>+/+</sup> gewaschen und anschließend mit 1 ml GFP-Trap-Lysepuffer (+cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail) lysiert. Um alle Zellen zu lysieren und von der Zellkulturplatte abzulösen, wurden diese nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten mit einem Zellschaber abgeschabt und die Suspension dann in ein Eppi überführt. Mittels einer 10 minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C wurden die Zelltrümmer aus der Suspension entfernt. 75 µl des Überstandes wurden als Rohlysat (total cell lysate, TCL) abgenommen, mit 25 µl 4x Laemmli-Ladepuffer versetzt und dann bei -20 °C gelagert. Der verbleibende Überstand wurde für die Co-Immunpräzipitation in ein weiteres Tube überführt.

### 3.2.3.2 Co-Immunpräzipitation

Zur Aufklärung der Protein-Protein-Interaktionen wurde in dieser Arbeit die Methode Co-Immunpräzipitation verwendet. Diese erlaubt durch die Zugabe eines Antikörpers, der an eine feste stationäre Phase gebunden ist, ein spezifisches Antigen aus einem Zelllysat zu

präzipitieren. Interaktionspartner des so aufgereinigten Proteins werden co-präzipitiert und können mittels SDS-PAGE und Western Blot detektiert werden. Zur Präzipitation wurden Agarosekügelchen, bzw. „Beads“ genutzt, die jeweils mit Antikörpern verbunden sind, welche gegen einen HA- oder GFP-Tag gerichtet sind.

Vor Hinzugabe der anti-HA- oder anti-GFP-Antikörper gekoppelten Beads zum Zelllysate wurden diese dreimal gewaschen, um den Alkohol des Lagerungspuffers zu entfernen und sie zu equilibrieren. Hierfür wurden 20 µl der Beads und 500 µl eiskalter GFP-Trap-Lysepuffer in die Reaktionsgefäße gegeben, jedes Mal bei 4 °C und 2700 g für 2 min zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurden das Zelllysate und 20 µl Lysepuffer hinzugegeben und für 1 h bei 4 °C in einem Überkopffrotator inkubiert.

Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde anschließend fünf Mal gewaschen. Hierfür wurde zuerst bei 2000 g und 4 °C für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Reaktionsgefäß wurde dann erneut mit 500 µl GFP-Trap-Lysepuffer befüllt und für 6 min bei 4 °C in einem Überkopffrotator inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 2700 g für 2 Minuten, um den Überstand wieder von den Beads zu trennen und zu verwerfen. Diese Schritte (500 µl Pufferzugabe, 6 min Inkubation, 2 min Zentrifugation) wurden 5 mal wiederholt, um sicherzustellen, dass sich nur noch das mit den anti-HA-, oder anti-GFP-Antikörper gekoppelten Beads präzipitierte Protein und dessen Interaktionspartner im Reaktionsgefäß befinden. Nach dem letzten Waschschrift wurde zu den Beads 30 µl GFP-Trap-Lysepuffer und 20 µl 4x Laemmli-Ladepuffer hinzugegeben. Bis zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion wurden die Proben bei -20 °C weggefroren.

#### 3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteine aus den Rohlysate- und Präzipitatproben der Größe nach aufzutrennen, wurden diese unter denaturierenden Bedingungen mittels einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, welches sich an die Proteine lagert und so ihre Eigenladung überdeckt. Durch das Aufkochen der Probe bei 95 °C für 5 min wird das Protein in seine Primärstruktur zerlegt. Durch die Bindung von SDS erhalten die Proteine eine einheitliche negative Ladung und können durch ein Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch zur positiv geladenen Anode bewegt werden. Hierbei werden Proteine mit größerer Molekülmasse und damit längerer Kettenlänge stärker vom Gel zurückgehalten als kleinere Proteine und brauchen somit länger durch das Gel. Es entsteht damit eine Auftrennung aller Proteine in der Probe nach ihrem Molekulargewicht. Durch eine Anpassung der Zusammensetzung des Gels kann eine unterschiedliche Porengröße und damit ein anderer Trennbereich erreicht werden.

Die Polyacrylamid-Trenngel-Lösung wurde wie in Abschnitt 3.1.5.3 beschrieben angesetzt und zwischen zwei Glasplatten, die in einer Gel-Apparatur (BioRad) eingespannt waren, gegossen

und mit Isopropanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Isopropanol wieder entfernt, eine Sammelgel-Lösung (siehe Abschnitt 3.1.5.3) angesetzt, in den verbleibenden Spalt gegossen und mit Probenkämme bestückt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht und bei 8000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Daraufhin wurden die Probenkämme aus dem Sammelgel entfernt und die Proteinproben in die so entstandenen Taschen pipettiert. Von den Rohlysate-Proben wurde jeweils 10-15 µl und von den Präzipitat-Proben 20-25 µl des proteinhaltigen Überstands aufgetragen. Um anschließend die Molekülgrößen der Proteine in den Proben bestimmen zu können, wurde zusätzlich noch ein Proteingrößenstandard auf das Gel aufgetragen. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 100 V im Sammelgel und 150 V im Trenngel.

#### 3.2.3.4 Western Blot

Um die Proteine für eine Immundetektion zugänglich zu machen, mussten diese noch aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran übertragen werden. Hierbei werden die negativ geladenen SDS/Protein-Komplexe durch ein elektrisches Feld (Elektroblot) aus dem Gel auf die Membran transferiert und bleiben dort aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen haften.

Die PVDF-Membran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten, für 30 s in 100 % Methanol aktiviert und im Transferpuffer inkubiert. Währenddessen wurden vier Whatman-Filterpapiere auf die gleiche Größe zugeschnitten und mit dem, aus der Elektrophoresevorrichtung entnommenen, Polyacrylamidgel in den Transferpuffer gelegt. Die Semi-Dry-Blot-Apparatur wurde wie folgt aufgebaut: Kathode, zwei Whatman-Filterpapiere, Polyacrylamidgel, PVDF-Membran, 2 Whatman-Filterpapiere, Anode. Der Transfer wurde mit vier Gelen gleichzeitig, je nach Proteingröße, für 60-120 Minuten bei 500 mA durchgeführt.

#### 3.2.3.5 Immundetektion

Die zu untersuchenden Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper und einer Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Dabei wird ein primärer Antikörper eingesetzt der an ein spezifisches Antigen bindet. Zu diesem Komplex wird noch ein weiterer sekundärer Antikörper hinzugegeben, der sich an den primären Antikörper anlagert und mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) konjugiert ist. Diese kann nach Zugabe des Substrats (Immobilon™ Western-Chemiluminescent HRP-substrate; ECL) schließlich eine Lichtreaktion katalysieren, welche mit einem Röntgenfilm oder einem CCD-Sensor (charge-coupled device) aufgenommen werden kann. Der anti-HA-Primärantikörper ist direkt an das Enzym HRP gekoppelt und benötigt daher keine Zugabe eines Sekundärantikörpers.

Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran wurde diese zunächst in 1x TBST gewaschen, um störende Salze und SDS zu entfernen. Hiernach folgte eine Inkubation in 5 % (w/v) Milchpulver in 1x TBST für ca. 30 min bei RT um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde der anti-GFP- oder anti-RFP-Antikörper über Nacht bei 4

°C, oder der anti-HA-Antikörper 60 min bei RT mit der Membran inkubiert (Antikörperlösungen siehe Abschnitt 3.1.3). Überschüssiger oder unspezifisch gebundener Primär-Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 10 min in 1x TBST entfernt. Anschließend wurden die HRP-gekoppelten Sekundärantikörper, die spezifisch den jeweiligen Primärantikörper erkennen, für weitere 60 min bei RT auf die Membran gegeben. Nach dieser Inkubation wurde wieder drei Mal für 10 min in 1x TBST gewaschen.

Zur Detektion wurde die Membran ca. 2 min in ECL-Lösung inkubiert und die so stattfindende Chemilumineszenzreaktion, entweder durch das Auflegen eines Röntgenfilms mit anschließender Entwicklung im OPTIMAX *X-Ray Film Processor* oder digital, im ChemiDoc™ XRS+ System, aufgenommen. Schließlich lässt sich so ein Bild vom Gel generieren, das nur die Banden zeigt, die dem antikörperspezifischen Protein zugeordnet werden können.

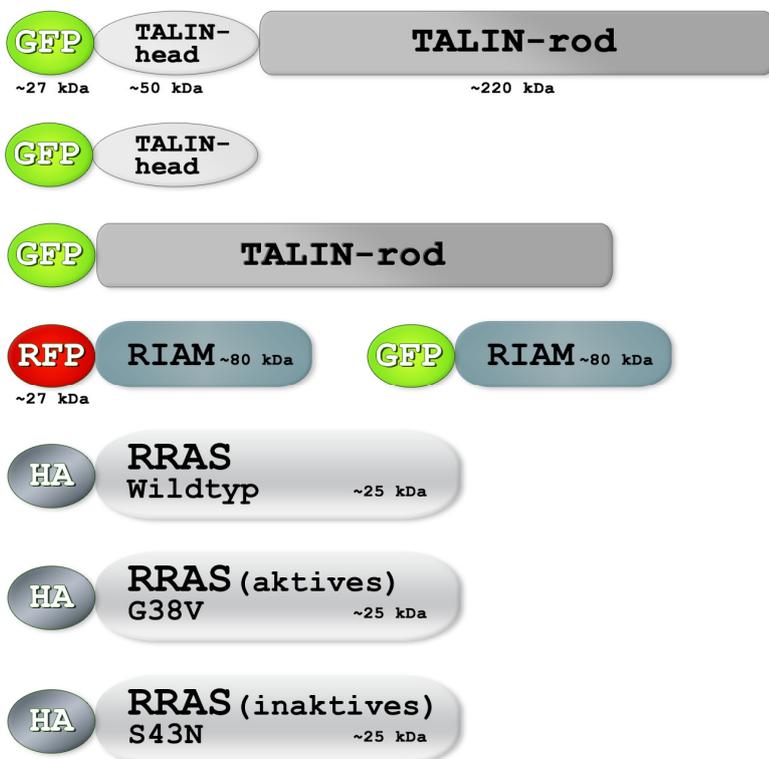
Sollte eine Membran mit anderem Antikörper erneut entwickelt werden, wurde diese mit dem Restore™ Western-Blot Stripping Puffer für 20 min bei RT inkubiert. Auf diese Weise können gebundene Antikörper von der Membran entfernt werden und eine erneute Detektion durch einen anderen Primär-Antikörper erfolgen.

## 4 Ergebnisse

Um die Auswirkungen von RRAS auf die TALIN vermittelte Integrin-Aktivierung zu untersuchen, wurden neben der RRAS<sup>WT</sup>-Proteinvariante auch noch auf eine konstitutiv aktive (G38V) und dominant negative (S43N) RRAS-Mutante zurückgegriffen. Diese beiden Varianten ermöglichen die gezielte Untersuchung der Abhängigkeit einer Protein-Protein-Interaktion vom Aktivierungszustand von RRAS. Bei der konstitutiv aktiven Proteinvariante RRAS<sup>G38V</sup> ist die intrinsische und die GAP-induzierte Hydrolyseaktivität stark beeinträchtigt, sodass GTP nicht mehr zu GDP hydrolysiert wird und RRAS somit dauerhaft im GTP-gebundenen, also aktiven Zustand bleibt (Spaargaren & Bischoff, 1994). Bei der RRAS<sup>S43N</sup> Variante ist GDP dauerhaft gebunden, RRAS bildet inaktive Komplexe mit GEFs und verbleibt dauerhaft im inaktiven Zustand (Huff, et al., 1997).

### 4.1 Untersuchung der Interaktion zwischen TALIN-head und RRAS

Zur Überprüfung der ersten Arbeitshypothese (siehe Abschnitt 2.4.1) wurde zunächst die Interaktion der TALIN-head-Region mit RRAS mittels Co-Immunpräzipitation und anschließendem Immunoblot untersucht. Hierfür wurde auf ein GFP-fusioniertes Expressionskonstrukt für TALIN-head (GFP=Grün fluoreszierendes Protein), sowie auf die zuvor beschriebenen RRAS-Proteinvarianten als HA-fusionierte Konstrukte zurückgegriffen.



**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Proteinvarianten**

Zur Analyse der Protein-Protein-Interaktionen wurden die hier dargestellten Proteine in COS7-Zellen überexprimiert. Da diese unabhängig voneinander immunologisch detektiert werden mussten, waren alle Proteine mit verschiedenen Tags versehen (GFP, RFP, HA). TALIN lag in drei Proteinvarianten vor (GFP-TALIN-full, GFP-TALIN-head, GFP-TALIN-rod), die alle am N-Terminus mit einem GFP-Tag verbunden sind. RIAM konnte mit einem RFP-, oder GFP-Tag in den Zellen überexprimiert werden. RRAS lag in drei Varianten vor (Wildtyp, konstitutiv aktiv,

dominant negativ), die am N-Terminus jeweils mit einem HA-Tag versehen sind. Dieser Tag besteht nur aus neun Aminosäuren und beeinflusst so das Molekulargewicht nicht nennenswert. Der GFP- und

RFP-Tag konnte für Kontrollversuche auch ohne angefügtes TALIN oder RIAM in den COS7-Zellen überexprimiert werden.

Es erfolgte eine Kotransfektion verschiedener HA-RRAS-Expressionskonstrukte (HA-RRAS<sup>WT</sup>, HA-RRAS<sup>G38V</sup>, oder HA-RRAS<sup>S43N</sup>) zusammen mit GFP-TALIN-head in COS7-Zellen. Als Negativkontrolle dienten COS7-Zellen, die mit einem GFP-Leervektor kotransfiziert wurden. Nach 45 Stunden wurden die Zellen mit dem GFP-Trap-Lysepuffer lysiert und alle GFP-getaggten Proteine mittels anti-GFP-Antikörper-gekoppelten Beads aus den Zelllysaten präzipitiert. Die Rohlysate und Präzipitate wurden nach SDS-PAGE und Western Blot immunologisch mit anti-HA- und anti-GFP-Antikörpern analysiert.

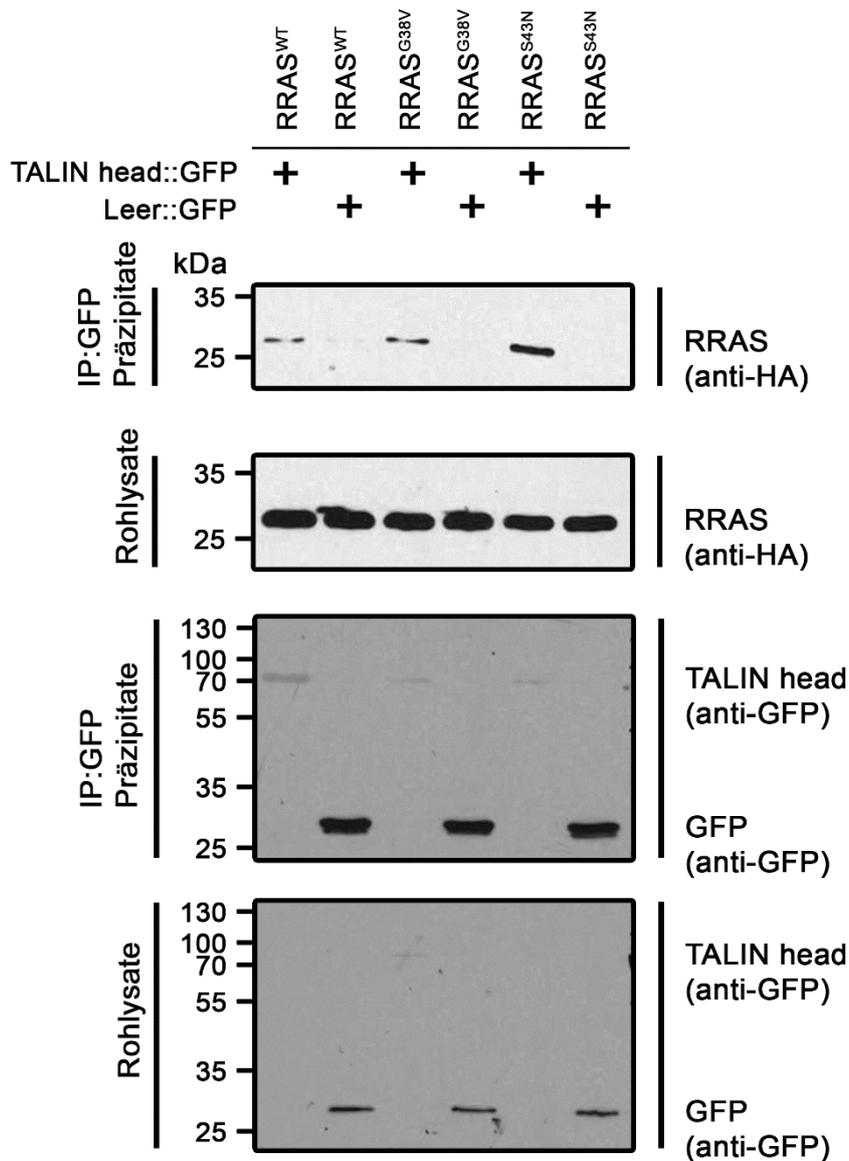


Abbildung 4.2: Ermittlung einer möglichen Interaktion zwischen TALIN-head und den RRAS-Proteinvarianten in COS7-Zellen mittels GFP-Trap

COS7-Zellen wurden, wie in der Abbildung angegeben, transient mit verschiedenen HA-RRAS-Expressionskonstrukten (HA-RRAS<sup>WT</sup>, HA-RRAS<sup>G38V</sup>, oder HA-RRAS<sup>S43N</sup>) zusammen mit GFP-TALIN-head, bzw. dem GFP-Leervektor (als Negativkontrolle) kotransfiziert. Präzipitate und die Rohlysate wurden nach Western Blot und anschließender Immundetektion mittels anti-HA- und anti-GFP-Antikörpern analysiert. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte des Proteinstandards dargestellt, auf der rechten Seite stehen die für die Detektion genutzten Antikörper sowie das nachgewiesene Protein.

RRAS wurde in allen Zellen im Rohlysat nachgewiesen, was auf eine erfolgreiche Transfektion schließen lässt (**Abbildung 4.2**, zweiter Blot von oben). GFP-TALIN-head wurde im Rohlysat nur äußerst schwach detektiert (**Abbildung 4.2**, unterster Blot), konnte aber mittels GFP-Beads angereichert werden (**Abbildung 4.2**, dritter Blot von oben). In den Kontrollansätzen konnte GFP, sowohl in den Rohlysaten als auch in den Präzipitaten stark nachgewiesen werden (**Abbildung 4.2**, dritter und vierter Blot von oben).

Alle drei RRAS-Varianten kopräzipitierten mit GFP-TALIN-head, wobei in den Kontrollversuchen mit GFP-Leervektor erwartungsgemäß kein RRAS zu detektieren war (**Abbildung 4.2**, oberster Blot). Die dominant negative RRAS Proteinvariante (RRAS<sup>S43N</sup>) wurde deutlich stärker als die Wildtyp- (RRAS<sup>WT</sup>) und konstitutiv aktive Variante (RRAS<sup>G38V</sup>) kopräzipitiert.

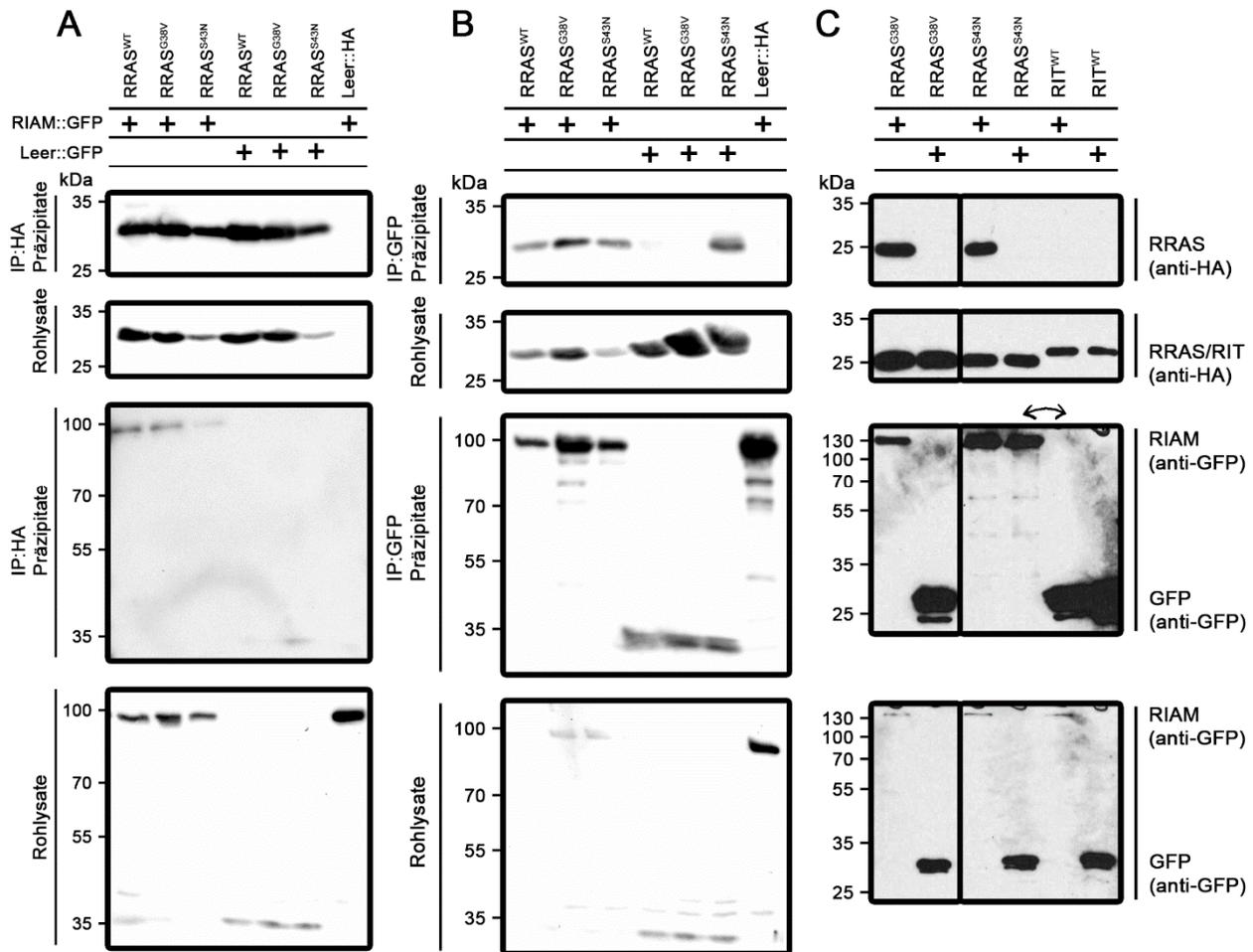
Zusammengefasst scheint RRAS unabhängig vom Aktivierungszustand mit TALIN-head zu interagieren.

### 4.2 Untersuchung der Interaktion zwischen RIAM und RRAS

Um zu klären, ob RRAS direkt oder über ein weiteres Protein indirekt mit TALIN interagiert, wurde als nächstes gezielt RIAM als potentieller RRAS Bindepartner auf eine Interaktion mit RRAS untersucht (siehe Abschnitt 2.4.2). Für die zu RRAS ähnliche GTPase RAP1 konnte schon eine Interaktion mit RIAM nachgewiesen werden, wodurch es zu einer Integrin-Aktivierung kommt (Lafuente, et al., 2004).

Um für RRAS eine Interaktion mit RIAM zu überprüfen, wurde eine Kotransfektion mit den verschiedenen HA-RRAS-Expressionskonstrukten (HA-RRAS<sup>WT</sup>, HA-RRAS<sup>G38V</sup>, oder HA-RRAS<sup>S43N</sup>), bzw. HA-RIT<sup>WT</sup> zusammen mit dem GFP-RIAM-Konstrukt in COS7-Zellen durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Kotransfektionen des GFP-Leervektors, bzw. des HA-Leervektors.

Nach 45 Stunden wurden die Zellen mit dem GFP-Trap-Lysepuffer lysiert und die Proteine mittels anti-GFP- bzw. anti-HA-gekoppelten Agarose-Beads aus den Zellysaten präzipitiert. Die Rohlysate und Präzipitate wurden nach SDS-PAGE und Western Blot immunologisch mit anti-HA- und anti-GFP-Antikörpern analysiert.



**Abbildung 4.3: Untersuchungen zur möglichen Interaktion von RIAM und verschiedenen RRAS-Proteinvarianten in COS7-Zellen mittels GFP- und HA-TRAP**

COS7-Zellen wurden, wie der Abbildung zu entnehmen, transient mit verschiedenen HA-RRAS-Konstrukten (HA-RRAS<sup>WT</sup>, HA-RRAS<sup>G38V</sup>, oder HA-RRAS<sup>S43N</sup>) und dem GFP-RIAM-Konstrukt kotransfiziert. Als Negativkontrollen dienten Kotransfektionen mit dem GFP-Leervektor oder einem HA-Leervektor. Nach 45 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Lysate anschließend mit HA-Antikörper-konjugierten Beads (A) sowie GFP-Antikörper-konjugierten Beads (B und C) versetzt. Nach der Präzipitation wurden die Präzipitate und Rohlysate mittels Western Blot und anschließender Immundetektion mit anti-HA- und anti-GFP-Antikörpern analysiert. Rechts neben den Blots sind die zur Detektion eingesetzten Antikörper und die entsprechenden Antigene angegeben. Auf der anderen Seite der Blots sind die Molekulargewichte des Größenstandards eingezeichnet. Bei dem mit anti-GFP detektiertem Präzipitat in Grafik C kam es zwischen Spur 4 und 5 zu einer Vertauschung beim Auftragen auf das Proteinelektrophoresegel.

**Abbildung 4.3 A** zeigt, dass alle RRAS Varianten exprimiert wurden und diese auch mit Hilfe von anti-HA-konjugierten Beads präzipitiert und angereichert werden konnten (**Abbildung 4.2 A**, erster und zweiter Blot von oben). Die dominant negative Variante scheint etwas schwächer exprimiert zu werden; dies liegt jedoch wahrscheinlich darin begründet, dass diese Variante durch die mutationsbedingte Proteinfehlfunktion zu verminderter Zellproliferation und/oder

erhöhtem Zelltod führt (**Abbildung 4.2 A**, zweiter Blot von oben). In der Negativkontrolle (HA-Leervektor) wurde kein HA-spezifisches Signal detektiert. RIAM bzw. GFP sind ebenfalls in den Rohlysaten exprimiert (**Abbildung 4.2 A**, unterster Blot). GFP-RIAM kopräzipitiert mit RRAS<sup>WT</sup> und RRAS<sup>G38V</sup>, sowie etwas schwächer mit RRAS<sup>S43N</sup> (**Abbildung 4.2 A**, dritter Blot von oben). Da allerdings RRAS<sup>S43N</sup> auch mit GFP leicht kopräzipitiert, ist dieser Versuch nur bedingt aussagekräftig.

Die **Abbildung 4.3 B** zeigt die gleiche Versuchskonstellation wie in Versuch A, nur wurde diesmal mit anti-GFP-konjugierten Beads präzipitiert. Alle RRAS Proteinvarianten (RRAS<sup>WT</sup>, RRAS<sup>G38V</sup> und RRAS<sup>S43N</sup>) konnten im Rohlysate detektiert werden (**Abbildung 4.2 B**, zweiter Blot von oben). GFP-RIAM bzw. GFP wurde mittels GFP-Antikörper-konjugierten Agarosekügelchen angereichert (**Abbildung 4.2 B**, dritter Blot von oben). Alle drei getesteten RRAS Proteinvarianten kopräzipitierten mit GFP-RIAM; allerdings wurde RRAS<sup>S43N</sup> auch mit GFP kopräzipitiert, was auf eine unspezifische Bindung der RRAS<sup>S43N</sup> Proteinvariante in diesem Versuch hindeutet (**Abbildung 4.2 B**, oberster Blot).

Bei dem in **Abbildung 4.3 C** dargestellten Versuch wurde als zusätzliche Kontrolle die kleine GTPase RIT<sup>WT</sup> eingesetzt, um die Spezifität einer RIAM::RRAS Interaktion sicherzustellen. Die Expression von RIT<sup>WT</sup> und der beiden RRAS Mutanten RRAS<sup>G38V</sup> und RRAS<sup>S43N</sup> konnte im Rohlysate nachgewiesen werden (**Abbildung 4.2 C**, zweiter Blot von oben). Auch das GFP-getaggte RIAM bzw. GFP ist in den Rohlysaten exprimiert und konnte mittels anti-GFP-konjugierten Beads im Präzipitat angereichert werden (**Abbildung 4.2 C**, dritter und vierter Blot von oben). Mit GFP-RIAM kopräzipitiert wurden sowohl die aktive (RRAS<sup>G38V</sup>) als auch inaktive (RRAS<sup>S43N</sup>) RRAS-Form (**Abbildung 4.2 C**, oberster Blot). RIT<sup>WT</sup> hingegen kopräzipitierte nicht mit RIAM; auch in den Negativkontrollen wurde keine Kopräzipitation von RRAS festgestellt (**Abbildung 4.2 C**, oberster Blot).

Insgesamt lässt sich aus den Daten vermuten, dass RRAS mit RIAM unabhängig vom GTP/GDP-Beladungszustand, bzw. Aktivierungsstatus von RRAS interagiert. Diese Aussage kann nur unter Vorbehalt gemacht werden, da für die dominant-negative-Variante (RRAS<sup>S43N</sup>) eine unspezifische Bindung (möglicherweise methodisch bedingt, siehe Abschnitt 5.1) festgestellt wurde. Sollte die Interaktion von RIAM mit RRAS unabhängig von dessen Aktivierungszustand sein, spricht dies für eine Funktion von RIAM als Adaptorprotein und nicht als Effektor von RRAS.

### 4.3 Untersuchung einer Komplexbildung zwischen RIAM, TALIN-full und RRAS

Um zu klären, ob RIAM als Adaptermolekül einen möglicherweise stärkenden Einfluss auf die Interaktion von RRAS mit TALIN hat, wurden Präzipitationsexperimente nach Dreifach-Transfektion von COS7-Zellen durchgeführt. Dazu wurden jeweils HA-RRAS<sup>WT</sup>, GFP-TALIN-full (bzw. GFP alleine), und RFP-fusioniertes RIAM (bzw. RFP alleine) ektopisch exprimiert. Die Zellen wurden nach 45 Stunden lysiert und die Proteine mittels anti-GFP-Antikörper-

konjugierten Beads aus den Zelllysaten präzipitiert. Die Rohlysate und Präzipitate wurden nach SDS-PAGE und Western Blot immunologisch mit anti-HA-, anti-GFP und anti-RFP-Antikörpern analysiert.

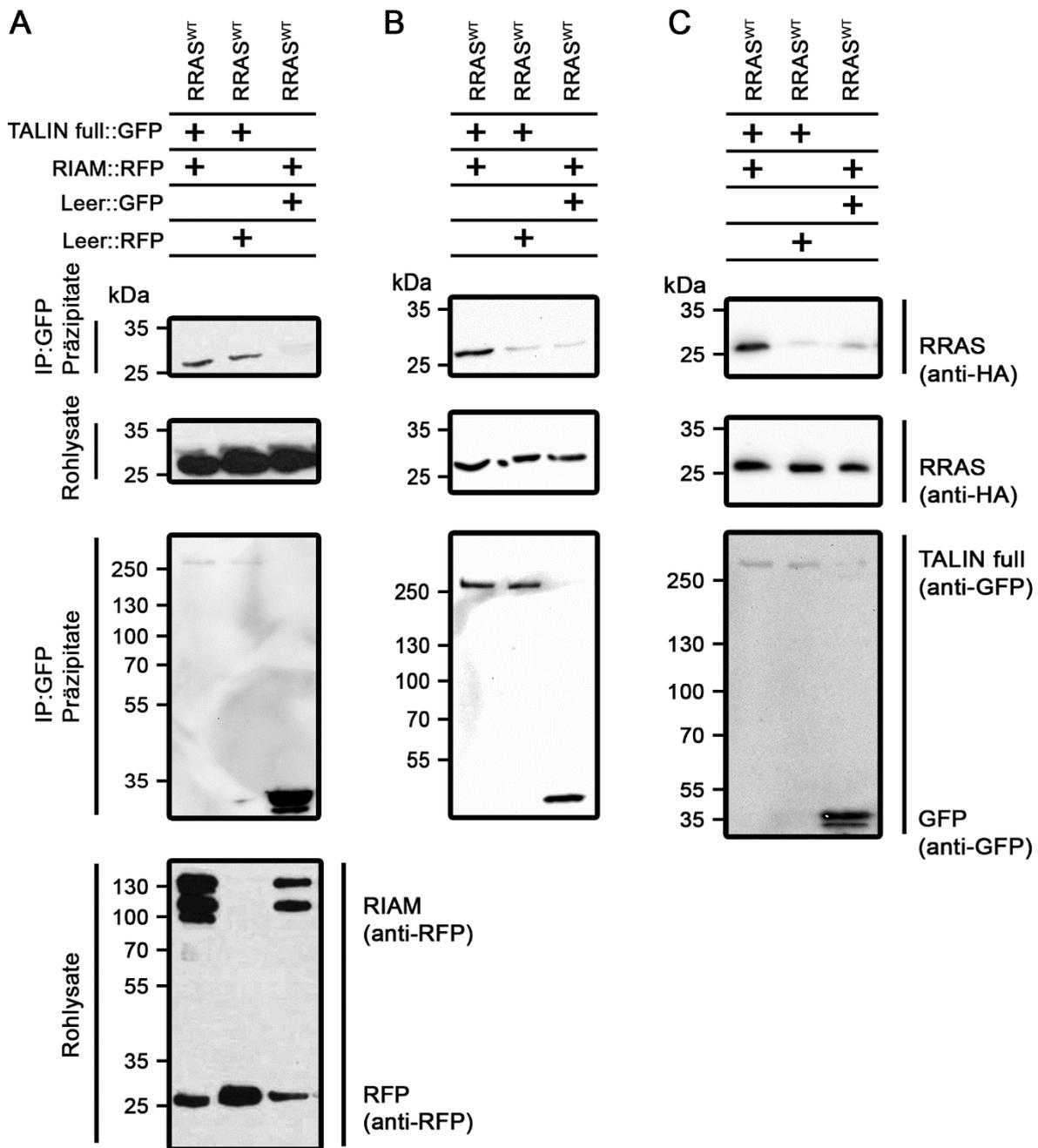


Abbildung 4.4: Analyse der Komplexbildung zwischen RIAM, TALIN-full und der RRAS<sup>WT</sup>-Proteinvariante in COS7-Zellen mittels GFP-Trap

Die COS7-Zellen wurden mit HA-RRAS<sup>WT</sup>-Konstrukten zusammen mit GFP-TALIN-full-, und RFP-RIAM-Konstrukten, wie in der Abbildung angegeben, transient kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde ein GFP-Leervektor, bzw. RFP-Leervektor kotransfiziert. Nach 45 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Lysate anschließend mit GFP-Antikörper-konjugierten Beads versetzt. Nach der

Präzipitation wurden die Präzipitate und die Rohlysate mittels Western Blot und anschließender Immundetektion mit anti-HA-, anti-GFP und anti-RFP-Antikörpern analysiert. Rechts neben den Blots sind die zur Detektion eingesetzten Antikörper und die entsprechenden Antigene angegeben. Auf der anderen Seite der Blots sind die Molekulargewichte des Größenstandards eingezeichnet. Die anti-RFP entwickelten Blots der Präzipitate (A, B und C) sowie der Rohlysate bei B und C fehlen, da hier die immunologische Detektion fehlschlug.

Die Blots in **Abbildung 4.4 A, B und C** stellen drei unabhängige Experimente mit der RRAS<sup>WT</sup>-Proteinvariante dar. Die Expression von RRAS<sup>WT</sup> konnte in allen Ansätzen in den Rohlysaten nachgewiesen werden (**Abbildung 4.4 A, B und C**, jeweils zweiter Blot von oben). Die Anwesenheit von GFP-TALIN-full bzw. GFP alleine wurde in den Präzipitaten nachgewiesen (**Abbildung 4.4 A, B und C**, jeweils dritter Blot von oben). RFP und RFP-RIAM konnten nur im Versuch A im Rohlysate nachgewiesen werden, da die Detektion bei B und C fehlschlug (**Abbildung 4.4 A**, vierter Blot von oben). Die Identität der drei bzw. zwei Banden auf der Höhe des Molekulargewichts für RIAM ist unklar; bei den unteren Banden könnte es sich um ein prozessiertes RIAM Protein handeln. Diesbezüglich gibt es jedoch keine Studien.

In Versuch A kopräzipitierte RRAS<sup>WT</sup> mit TALIN-full, unabhängig davon ob RIAM koexprimiert vorlag. Die Interaktion zwischen RRAS<sup>WT</sup> und TALIN-full ist spezifisch, da im Kontrollansatz mit GFP- und RFP-RIAM RRAS nicht detektiert wurde. In den Versuchen B und C wurde RRAS<sup>WT</sup> in den Präzipitaten nur dann nachgewiesen, wenn TALIN-full und RFP-RIAM koexprimiert wurden.

Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass RRAS<sup>WT</sup> mit TALIN-full interagiert, wobei sich die leichte Tendenz einer erhöhten Komplexbildung bei Anwesenheit von RIAM abzeichnet.

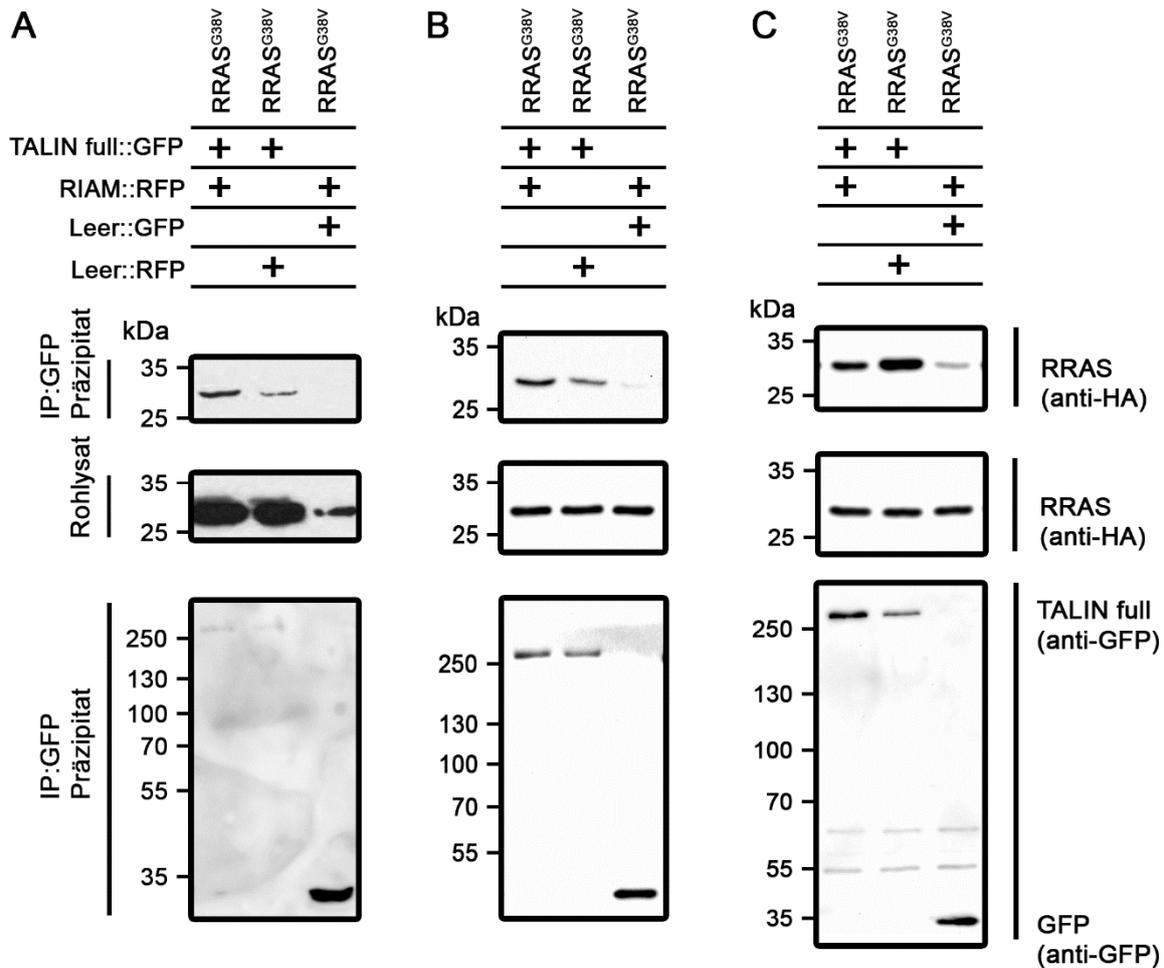


Abbildung 4.5: Analyse der Komplexbildung zwischen RIAM, TALIN-full und der RRAS<sup>G38V</sup>-Proteinvariante in COS7-Zellen mittels GFP-Trap

Die COS7-Zellen wurden mit HA-RRAS<sup>G38V</sup>-Konstrukten zusammen mit GFP-TALIN-full-, und RFP-RIAM-Konstrukten, wie in der Abbildung angegeben, transient kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde ein GFP-Leervektor, bzw. RFP-Leervektor kotransfiziert. Nach 45 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Lysate anschließend mit GFP-Antikörper-konjugierten Beads versetzt. Nach der Präzipitation wurden die Präzipitate und die Rohlysate mittels Western Blot und anschließender Immundetektion mit anti-HA-, anti-GFP und anti-RFP-Antikörpern analysiert. Rechts neben den Blots sind die zur Detektion eingesetzten Antikörper und die entsprechenden Antigene angegeben. Auf der anderen Seite der Blots sind die Molekulargewichte des Größenstandards eingezeichnet. Da die immunologische Detektion von RFP mittels anti-RFP-Antikörpern fehlschlug, bleibt der Nachweis der Expression von RFP hier noch offen.

Die Blots in **Abbildung 4.5 A, B und C** stellen drei unabhängige Experimente, diesmal mit der RRAS<sup>G38V</sup>-Proteinvariante, dar. In den Rohlysaten konnte die Expression von RRAS<sup>G38V</sup> in allen Ansätzen detektiert werden (**Abbildung 4.5 A, B und C**, jeweils zweiter Blot von oben). Auch GFP-TALIN-full (bei A schwächer) bzw. GFP alleine wurden in den Präzipitaten nachgewiesen (**Abbildung 4.5 A, B und C**, jeweils dritter Blot von oben). Die immunologische

Detektion der Expression von RFP und RFP-RIAM schlug fehl, dennoch konnte sie mittels Fluoreszenzmikroskop (vgl. Abschnitt 3.2.1.5) überprüft werden (Daten nicht gezeigt).

In allen drei Versuchen zeigte sich die Kopräzipitation von RRAS<sup>WT</sup> mit TALIN-full unabhängig davon ob RIAM koexprimiert vorlag. Die Interaktion zwischen RRAS<sup>WT</sup> und TALIN-full ist in Versuch A und B spezifisch, da hier RRAS im Kontrollansatz mit GFP und RFP-RIAM nicht detektiert wurde. Im Gegensatz dazu wurde bei Versuch C mit gleichem Kontrollansatz eine unspezifische Bindung festgestellt.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die konstitutiv aktive RRAS Proteinvariante (G38V) tendenziell unabhängig von RIAM an TALIN bindet.

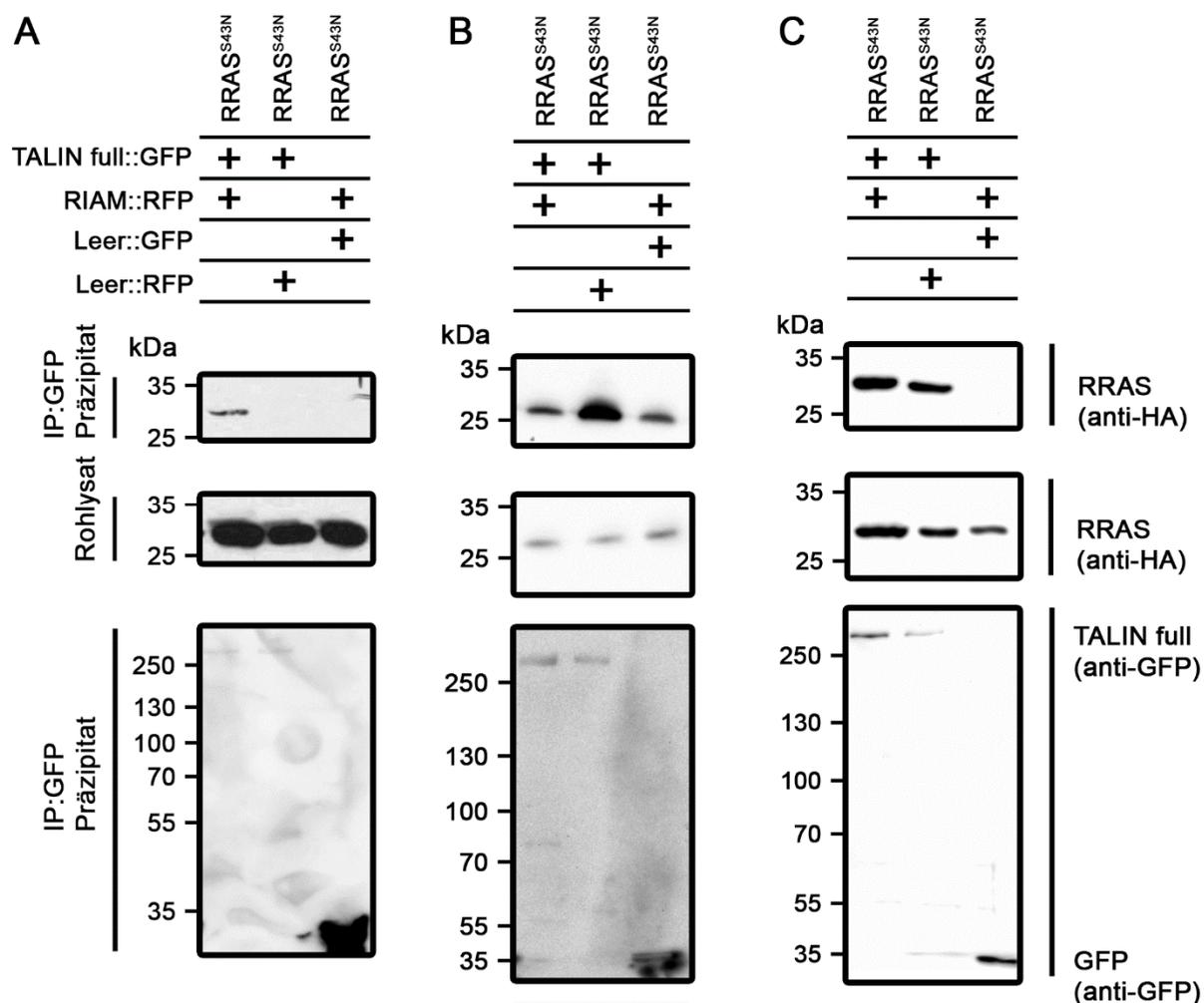


Abbildung 4.6: Analyse der Komplexbildung zwischen RIAM, TALIN-full und der RRAS<sup>S43N</sup>-Proteinvariante in COS7-Zellen mittels GFP-Trap

Die COS7-Zellen wurden mit HA-RRAS<sup>S43N</sup>-Konstrukten zusammen mit GFP-TALIN-full-, und RFP-RIAM-Konstrukten, wie in der Abbildung angegeben, transient kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde ein GFP-Leervektor, bzw. RFP-Leervektor kotransfiziert. Nach 45 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Lysate anschließend mit GFP-Antikörper-konjugierten Beads versetzt. Nach der

Präzipitation wurden die Präzipitate und die Rohlysate mittels Western Blot und anschließender Immundetektion mit anti-HA-, anti-GFP und anti-RFP-Antikörpern analysiert. Rechts neben den Blots sind die zur Detektion eingesetzten Antikörper und die entsprechenden Antigene angegeben. Auf der anderen Seite der Blots sind die Molekulargewichte des Größenstandards eingezeichnet. Da die immunologische Detektion von RFP mittels anti-RFP-Antikörpern fehlschlug, bleibt der Nachweis der Expression von RFP hier noch offen.

Die **Abbildung 4.6 A, B und C** zeigt Blots von drei unabhängigen Versuchen mit der RRAS<sup>S43N</sup>-Proteinvariante. In allen Versuchen (B etwas schwächer) konnte die Expression von RRAS<sup>G43N</sup> nachgewiesen werden (**Abbildung 4.6 A, B und C**, jeweils zweiter Blot von oben). GFP, wie auch GFP-TALIN-full (z. T. schwächer), konnte in den Präzipitaten detektiert werden (**Abbildung 4.6 A, B und C**, jeweils dritter Blot von oben). Die immunologische Detektion der Expression von RFP und RFP-RIAM schlug fehl, dennoch konnte sie mittels Fluoreszenzmikroskop (vgl. Abschnitt 3.2.1.5) überprüft werden (Daten nicht gezeigt).

Während in Versuch A RRAS<sup>S43N</sup> nur in den Präzipitaten nachgewiesen wurde, wenn TALIN-full und RFP-RIAM koexprimiert wurden, zeigte sich in Versuch B und C die Kopräzipitation von RRAS<sup>S43N</sup> unabhängig davon ob RIAM vorhanden war. In Versuch B wurde RRAS<sup>S43N</sup> wieder im Präzipitat des Ansatzes mit GFP und RFP-RIAM (Negativkontrolle) detektiert, weshalb der Versuch nicht auswertbar ist. In den Kontrollansätzen von Versuch A und C zeigt sich erwartungsgemäß kein RRAS<sup>S43N</sup> im Präzipitat.

Wie auch schon bei den Versuchen mit der RRAS<sup>G38V</sup> Proteinvariante, zeigt sich hier zusammengefasst die Tendenz, dass auch RRAS<sup>S43N</sup> unabhängig von RIAM mit TALIN interagiert.

Zusammenfassend lässt sich aus den hier durchgeführten Experimenten keine eindeutige Aussage darüber treffen, ob RIAM die Interaktion zwischen TALIN und RRAS beeinflusst. Einerseits liegt dies an der Inkonsistenz der erhaltenen Ergebnisse, andererseits aber auch an den nicht funktionierenden Kontrollansätzen. Unter Ausklammerung der Versuche mit falsch positiver Leerkontrolle (nach Transfektion mit GFP-Leervektor), zeigt sich für RRAS<sup>WT</sup> tendenziell eine verstärkte Interaktion mit TALIN bei Anwesenheit von RIAM. Für RRAS<sup>G38V</sup> und RRAS<sup>S43N</sup> ist eine solche Interpretation jedoch nicht möglich, da sowohl eine verstärkende, als auch eine hemmende Wirkung bei Koexpression von RIAM detektiert wurde.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von RRAS auf die TALIN-vermittelte Integrin-Aktivierung untersucht. Dabei wurden zwei Arbeitshypothesen verfolgt: 1. RRAS steuert über eine direkte Interaktion mit TALIN die Aktivierung von Integrinen (vgl. Abschnitt 2.4.1); 2. RRAS rekrutiert das TALIN Bindeprotein RIAM, und reguliert so die TALIN-vermittelte Aktivierung der Integrine (vgl. Abschnitt 2.4.2). Im Folgenden werden die Versuchsergebnisse erörtert und Rückschlüsse auf mögliche molekulare Mechanismen bei der Integrin-Aktivierung gezogen. Außerdem wird eine Problematik der hier durchgeführten biochemischen Analyse zur Protein-Protein-Interaktionen diskutiert.

### 5.1 Die Co-Immunpräzipitation mittels GFP-Trap ist nur bedingt geeignet für die Darstellung einer Interaktion zwischen GFP-TALIN und HA-RRAS<sup>G38V</sup> bzw. HA-RRAS<sup>S43N</sup>

Bei den Co-Immunpräzipitationen mittels GFP-Trap wurden HA-RRAS<sup>G38V</sup> und HA-RRAS<sup>S43N</sup> in den Versuchen mit der GFP-Leervektor-Negativkontrolle kopräzipitiert (vgl. **Abbildung 4.3 B**, **Abbildung 4.6 B**). Es gab zwei Problemlösungsansätze: Zum einen die NaCl-Konzentration des GFP-Trap-Lysepuffers zu erhöhen (von 150 auf 225 mM), um die Spezifität der Bindungen zu erhöhen; zum anderen zusätzliche Waschvorgänge durchzuführen, um unspezifisch gebundene Moleküle aus den Präzipitaten zu eliminieren. Beide Lösungsansätze konnten das Problem nicht beseitigen.

Folgende Ursachen könnten zu diesen unspezifischen Interaktionen führen:

1. Die ektopische Expression der konstitutiv-aktiven und dominant-negativen RRAS-Proteinvarianten (HA-RRAS<sup>G38V</sup> bzw. HA-RRAS<sup>S43N</sup>) könnte zu erhöhtem Zelltod führen. Ein im Vergleich mit HA-RRAS-Wildtyp transfizierten Zellen verstärktes Zellsterben konnte unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Sterbende, apoptotische Zellen können große Mengen durch Protease-vermittelte Degradierung von Proteinen entstandene Peptide aufweisen, die möglicherweise eine unspezifische Kreuzreaktion zwischen GFP und HA-RRAS<sup>G38V</sup> bzw. HA-RRAS<sup>S43N</sup> verursachen. Hierzu wurden aber keine Belege in der Literatur gefunden.
2. GFP selbst könnte sich wie ein „sticky“ Protein verhalten, dass unspezifisch mit zahlreichen Proteinen, u. a. HA-RRAS<sup>G38V</sup> bzw. HA-RRAS<sup>S43N</sup>, interagiert und letztere dadurch kopräzipitiert werden. In der Literatur findet man hierzu allerdings keine Publikationen.
3. Ein weiteres vorstellbares Problem könnte die Matrix der Beads darstellen. Diese besteht aus poröser Agarose, in der sich Proteine „verhaken“ können, was ebenfalls zu unspezifischen Präzipitationen führt. Ein Lösungsansatz hierfür könnte der Umstieg auf magnetische Beads darstellen, denn diese weisen in vielen Fällen weniger unspezifische Bindungen mit Proteinen auf (Karlsson & Platt, 1991; Safarik & Safarikova, 2004).

## 5.2 RRAS interagiert mit der head-Region von TALIN

Aktives, GTP-gebundenes RRAS vermittelt in der Zelle eine sogenannte inside-out-Signalkaskade im Sinne einer intrazellulär-induzierten Aktivierung von Integrinen und damit eine Verstärkung der Zelladhäsion (Zhang, et al., 1996; Furuholm & Peränen, 2003). RRAS scheint aber nicht direkt die Integrine zu aktivieren, sodass noch weitere, zwischengeschaltete Proteine nötig sind (Kinbara, et al., 2003). Zur Bildung von Zelladhäsionen im Allgemeinen und zur Integrinaktivierung im Speziellen wird unter anderem auch das Protein TALIN benötigt (Tadokoro, et al., 2003), das somit einen geeigneten Kandidaten für die RRAS-vermittelte Aktivierung der Integrine darstellt. Mit der ersten Arbeitshypothese wurde die Bindung von RRAS an die TALIN-head-Region untersucht, da dessen Strukturdaten darauf hinweisen (Huang, et al., 1998; Goult, et al., 2010).

Es konnte mittels Co-Immunpräzipitation experimentell bestätigt werden, dass RRAS in einem Proteinkomplex mit TALIN-head auftritt und diese Interaktion unabhängig vom Aktivierungszustand stattfindet (vgl. Abschnitt 4.1). Diese Beobachtung geht jedoch nicht vollständig konform mit der ersten Arbeitshypothese, da in dieser eine Interaktion mit TALIN und eine Aktivierung der Integrine nur durch aktives, GTP-gebundenes RRAS postuliert wird. Eine mögliche Erklärung für diese Abweichung könnte sein, dass RRAS, unabhängig von seiner Aktivierung, TALIN an der Plasmamembran und damit in die Nähe der Integrine verankert; die eigentliche TALIN Stimulierung und Integrin-Aktivierung erfolgt jedoch erst in einem zweiten unabhängigen Schritt, möglicherweise über eine Aktivierung von RRAS und darauf folgender Konformationsänderung des RRAS-TALIN Proteinkomplexes. Dieser zweite Schritt würde dann noch weitere regulatorische Proteine miteinbeziehen.

## 5.3 RRAS geht sowohl mit TALIN als auch RIAM eine Interaktion ein und könnte so die Bildung eines Integrin-Aktivierungs-Komplexes stimulieren

Mit der zweiten Arbeitshypothese wurde der Annahme nachgegangen, dass für die TALIN-vermittelte Integrin-Aktivierung noch andere Bindepartner zwischengeschaltet sein könnten. Für RAP1 wurde schon ein ähnlicher Mechanismus beschrieben, bei dem das Adaptorprotein RIAM eine RAP1-abhängige Aktivierung von TALIN vermittelt (Lafuente, et al., 2004). RAP1 zeigt eine ähnliche Struktur wie RRAS (siehe Abschnitt 2.3), weshalb eine Interaktion zwischen RRAS und RIAM ebenfalls möglich erscheint. Die aus der Annahme entwickelte Arbeitshypothese, dass RRAS RIAM an die Plasmamembran rekrutiert und so die TALIN-vermittelte Aktivierung der Integrine stimuliert, wurde in dieser Arbeit experimentell untersucht.

Eine Interaktion von RRAS mit RIAM konnte mittels Co-Immunpräzipitation bestätigt werden (vgl. Abschnitt 4.2). Während für aktives, GTP-gebundenes RRAS (RRAS<sup>G38V</sup>) eine spezifische Interaktion detektiert wurde, konnte dies bei der dominant negativen RRAS-

Variante (RRAS<sup>S43N</sup>) nicht eindeutig gezeigt werden. Daher kann nicht bestimmt werden, ob RIAM als Adaptorprotein oder als Effektor von RRAS bei der TALIN-vermittelten Aktivierung der Integrine wirkt: Eine vom GTP/GDP-Beladungszustand abhängige Interaktion zwischen RRAS und RIAM würde die Arbeitshypothese unterstützen. RIAM würde laut dieser Hypothese nur von aktivem RRAS gebunden und zur Plasmamembran rekrutiert werden, wo der RRAS::RIAM-Proteinkomplex sodann über eine Interaktion mit TALIN eine Aktivierung von Integrinen induziert. Sollte RIAM aber unabhängig vom RRAS-Aktivierungszustand mit RRAS interagieren, könnte dies, anders als in dieser zweiten Arbeitshypothese beschrieben, die Möglichkeit eröffnen, dass RIAM keinen Effektor von RRAS, sondern ein Adaptorprotein bzw. einen Kofaktor für die Interaktion mit TALIN darstellt.

Zur weiteren Überprüfung der zweiten Arbeitshypothese wurde mittels Co-Immunpräzipitation untersucht, inwiefern RIAM die RRAS::TALIN-Interaktion beeinflusst (vgl. Abschnitt 4.3). Die gewonnenen Daten zeigen eine Interaktion von TALIN-full und RRAS auf. Für den RRAS-Wildtyp ließ sich hierbei tendenziell ein durch RIAM verstärkter Effekt auf diese Interaktion beobachten. Hinsichtlich der Integrin-Aktivierung unterstützt diese Beobachtung, dass RIAM auf die Aktivierung der Integrine einen stimulierenden Effekt ausübt und daher auch benötigt wird. Für konstitutiv aktives RRAS (RRAS<sup>G38V</sup>) und die dominant negative RRAS-Proteinvariante (RRAS<sup>S43N</sup>) wurde jedoch kein Unterschied hinsichtlich der RRAS::TALIN-Interaktion bei Koexpression von RIAM nachgewiesen. Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass RIAM eher ein/en unterstützendes/r Adaptorprotein/Kofaktor für die RRAS-TALIN-Interaktion darstellt. Denn wäre es ein Effektor von RRAS, würde man für RRAS<sup>G38V</sup> eine verstärkte Komplexbildung zwischen RRAS, RIAM und TALIN erwarten. Bzw. würde RIAM rein hypothetisch kompetitiv zu einer direkten Interaktion zwischen RRAS und TALIN wirken, würde man bei Expression von RRAS<sup>S43N</sup> eine verstärkte Komplexbildung zwischen RRAS und TALIN erwarten.

Weitere Experimente sind nötig, um die genauen molekularen Zusammenhänge bei der RRAS- und RIAM-gesteuerten, TALIN-vermittelten Integrin-Aktivierung aufzuklären.

## 6 Fazit und Ausblick

Zusammengenommen weisen die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche darauf hin, dass die kleine GTPase RRAS sowohl mit dem Zytoskelettprotein TALIN, als auch mit dem Adaptorprotein RIAM interagiert. Weder die Interaktion von RRAS mit TALIN, noch mit RIAM scheint vom RRAS-Aktivierungszustand abhängig zu sein, sodass eine Funktion für RRAS als molekularer Ein/Aus-Schalter bei der Aktivierung von Integrinen unwahrscheinlich erscheint. Daher wird hier ein weiterer molekularer Regulatormechanismus postuliert, welcher schlussendlich die TALIN-vermittelte Aktivierung der Integrine induziert.

Die molekularen Determinanten bei der Interaktionen zwischen RRAS, RIAM und TALIN konnten in dieser Studie nicht vollständig beschrieben werden. Um methodisch bedingte Probleme zu eliminieren, könnte der Wechsel auf magnetische Beads bei der Wiederholung der bisherigen Versuche von Nutzen sein (vgl. Abschnitt 5.1). Um die Interaktion von TALIN und RRAS besser darzustellen, sollten weitere Co-Immünpräzipitationen durchgeführt werden, im Rahmen derer u. a. alle Domänen von TALIN einzeln untersucht werden sollten. Um weiter aufzuklären, ob RIAM als Adaptorprotein, oder als Effektor von RRAS wirkt, sollten sogenannte GTPase-Pulldowns durchgeführt werden, mit Hilfe derer man die aktive RRAS-Form mittels Effektorpräzipitation aus einem Zelllysat präzipitiert. Schließlich könnten die Interaktionen aber auch durch alternative Protein-Protein-Bindeassays, wie z. B. mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems, einer bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) oder eines Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) untersucht werden.

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse geben erste Hinweise auf die Rolle von RRAS bei der TALIN-vermittelten Aktivierung der Integrine. Weitere experimentelle Analysen sind nötig, um die genauen molekularen Mechanismen festzustellen. Dies würde ein detaillierteres Bild der Pathophysiologie bei der Erkrankungsgruppe der RASopathien ermöglichen.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 7.1: Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bidest.	bidestilliert
Bp	Basenpaare
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
COS7	Fibroblasten aus Nierenzellen der afrikanischen grüne Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Polypeptids
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Fokale Adhäsionen
FERM-Domäne	F für 4.1 protein, E für ezrin, R für radixin und M für moesin
G	Guanin
GAP	GTPase activating proteins; GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-Triphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factors; GTP-Austauschfaktor
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat

## 7 Abkürzungsverzeichnis

---

GTPase	GDP/GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität
HA	Hämagglutinin des humanen Influenzavirus
HPLC	high pressure liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
LB	lysogeny broth
MAPK	mitogen-activated protein kinase
N	Asparagin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NP-40	Nichtionisches Detergenz P40
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Polypeptids
OD	Optische Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDB	Protein Data Base
P-Loop	phosphate-binding loop
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RalGDS	ral guanine nucleotide dissociation stimulator
RAP1	Ras-proximate-1 oder Ras-related protein 1
RAS	rat sarcoma
RBD	RAS binding domain
RFP	red fluorescent protein
RIAM	Rap1-interacting adapter molecule
RIT	Ras-like protein expressed in many tissues
RRAS	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Sodium-Dodecylsulfate; Natrium-Dodecylsulfat
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
Tab.	Tabelle
TB	Terrific Broth

---

TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	tris buffered saline
TBST	tris buffered saline mit Tween
TCL	total cell lysate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
V	Valin
WT	Wildtyp

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Der RRAS-GTPase Zyklus .....	8
Abbildung 2.2: Schematische Domänenstruktur von TALIN .....	10
Abbildung 2.3: Integrin-Aktivierung über eine direkte Interaktion von RRAS mit TALIN ..	11
Abbildung 2.4: Ein RRAS::RIAM-Proteinkomplex ermöglicht die TALIN-vermittelte Integrin-Aktivierung .....	12
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Proteinvarianten .....	30
Abbildung 4.2: Ermittlung einer möglichen Interaktion zwischen TALIN-head und den RRAS-Proteinvarianten in COS7-Zellen mittels GFP-Trap .....	31
Abbildung 4.3: Untersuchungen zur möglichen Interaktion von RIAM und verschiedenen RRAS-Proteinvarianten in COS7-Zellen mittels GFP- und HA-TRAP.....	33
Abbildung 4.4: Analyse der Komplexbildung zwischen RIAM, TALIN-full und der RRAS <sup>WT</sup> -Proteinvariante in COS7-Zellen mittels GFP-Trap .....	35
Abbildung 4.5: Analyse der Komplexbildung zwischen RIAM, TALIN-full und der RRAS <sup>G38V</sup> -Proteinvariante in COS7-Zellen mittels GFP-Trap .....	37
Abbildung 4.6: Analyse der Komplexbildung zwischen RIAM, TALIN-full und der RRAS <sup>S43N</sup> -Proteinvariante in COS7-Zellen mittels GFP-Trap .....	38

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien (DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) .....	14
Tabelle 3.2: Verwendete Konstrukte für die Transfektion in Eukaryonten.....	14
Tabelle 3.3: Genutzte Primärantikörper mit Angabe der verwendeten Verdünnung für den Western Blot .....	15
Tabelle 3.4: Genutzte Sekundärantikörper mit Angabe der verwendeten Verdünnung im Western Blot .....	16
Tabelle 3.5: Medien die zur Anzucht und Kultivierung von Bakterien verwendet wurden....	16
Tabelle 3.6: Medien und Zusätze die zur Kultivierung von Zellen genutzt wurden .....	17
Tabelle 3.7: Medien für die Kultivierung und Durchführung der Experimente .....	17
Tabelle 3.8: Verwendete Puffer für die Kultivierung von Zellen.....	18
Tabelle 3.9: Zusammensetzung der genutzten Puffer für die Co-Immunpräzipitation .....	18
Tabelle 3.10: Eingesetzte Puffer für die SDS-PAGE.....	19
Tabelle 3.11: Puffer für die Durchführung des Western Blots.....	20
Tabelle 3.12: In dieser Arbeit genutzte Antikörperlösungen.....	20
Tabelle 3.13: Übersicht aller verwendeten Chemikalien.....	20
Tabelle 3.14: Verwendete Enzyme, Kits und Proteine.....	22
Tabelle 3.15: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien .....	22
Tabelle 3.16: Computerprogramme und bioinformatische Datenbanken .....	23
Tabelle 7.1: Abkürzungen .....	44

## 10 Literaturverzeichnis

- Abram, C. L. & Lowell, C. A., 2009. The ins and outs of leukocyte integrin signaling.. *Annual review of immunology*, Volume 27, pp. 339–62.
- Ahearn, I. M., Haigis, K., Bar-Sagi, D. & Philips, M. R., 2012. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS.. *Nature reviews. Molecular cell biology*, Jan, 13(1), pp. 39–51.
- Bentires-Alj, M., Kontaridis, M. I. & Neel, B. G., 2006. Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nature medicine*, 12(3), pp. 283–285.
- Binder, G., 2009. Noonan syndrome, the Ras-MAPK signalling pathway and short stature.. *Hormone research*, Volume 71, pp. 64–70.
- Calderwood, D. A., 2004. Integrin activation. *Journal of cell science*, 117(5), pp. 657–666.
- Chen, C. S. et al., 2003. Cell shape provides global control of focal adhesion assembly.. *Biochemical and biophysical research communications*, Jul, 307(2), pp. 355–61.
- Critchley, D. R., 2009. Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin.. *Annual review of biophysics*, Volume 38, pp. 235–54.
- Elliott, P. R. et al., 2010. The Structure of the talin head reveals a novel extended conformation of the FERM domain.. *Structure (London, England : 1993)*, Oct, 18(10), pp. 1289–99.
- Flex, E. et al., 2014. Activating mutations in RRAS underlie a phenotype within the RASopathy spectrum and contribute to leukaemogenesis. *Human molecular genetics*, p. ddu148.
- Furuhjelm, J. & Peränen, J., 2003. The C-terminal end of R-Ras contains a focal adhesion targeting signal. *Journal of cell science*, 116(18), pp. 3729–3738.
- Gotoh, T. et al., 1997. Activation of R-Ras by Ras-guanine nucleotide-releasing factor.. *The Journal of biological chemistry*, Jul, 272(30), pp. 18602–7.
- Goult, B. T. et al., 2010. Structure of a double ubiquitin-like domain in the talin head: a role in integrin activation.. *The EMBO journal*, Mar, 29(6), pp. 1069–80.
- Huang, L., Hofer, F., Martin, G. S. & Kim, S.-H., 1998. Structural basis for the interaction of Ras with RaIGDS. *Nature Structural & Molecular Biology*, 5(6), pp. 422–426.
- Huff, S. Y., Quilliam, L. A., Cox, A. D. & Der, C. J., 1997. R-Ras is regulated by activators and effectors distinct from those that control Ras function.. *Oncogene*, 14(2), pp. 133–143.

- Huttenlocher, A. & Horwitz, A. R., 2011. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(9), p. a005074.
- Jorge, A. A. L., Malaquias, A. C., Arnhold, I. J. P. & Mendonca, B. B., 2009. Noonan syndrome and related disorders: a review of clinical features and mutations in genes of the RAS/MAPK pathway.. *Hormone research*, 71(4), pp. 185--93.
- Karlsson, G. B. & Platt, F. M., 1991. Analysis and isolation of human transferrin receptor using the OKT-9 monoclonal antibody covalently crosslinked to magnetic beads. *Analytical biochemistry*, 199(2), pp. 219--222.
- Karnoub, A. E. & Weinberg, R. A., 2008. Ras oncogenes: split personalities.. *Nature reviews. Molecular cell biology*, Jul, 9(7), pp. 517--31.
- Kinbara, K. et al., 2003. Ras GTPases: integrins' friends or foes?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(10), pp. 767--778.
- Kooistra, M. R., Dubé, N. & Bos, J. L., 2007. Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *Journal of cell science*, 120(1), pp. 17--22.
- Lafuente, E. M. et al., 2004. RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion.. *Developmental cell*, Oct, 7(4), pp. 585--95.
- Lee, H.-S. et al., 2009. RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences. *Journal of Biological Chemistry*, 284(8), pp. 5119--5127.
- Lowe, D. G. & Goeddel, D. V., 1987. Heterologous expression and characterization of the human R-ras gene product.. *Molecular and cellular biology*, Aug, 7(8), pp. 2845--56.
- Milburn, M. V. et al., 1990. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*, 247(4945), pp. 939-945.
- Mitin, N., Rossman, K. L. & Der, C. J., 2005. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Current Biology*, 15(14), pp. R563--R574.
- Roberts, G. C. & Critchley, D. R., 2009. Structural and biophysical properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Biophysical reviews*, 1(2), pp. 61--69.
- Safarik, I. & Safarikova, M., 2004. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology*, 2(1), p. 7.
- Spaargaren, M. & Bischoff, J. R., 1994. Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26), pp. 12609--12613.

- Tadokoro, S. et al., 2003. Talin binding to integrin  $\beta$  tails: a final common step in integrin activation. *Science*, 302(5642), pp. 103--106.
- Tartaglia, M. & Gelb, B. D., 2010. Disorders of dysregulated signal traffic through the RAS-MAPK pathway: phenotypic spectrum and molecular mechanisms.. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Dec, Volume 1214, pp. 99--121.
- Tidyman, W. E. & Rauen, K. A., 2009. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation.. *Current opinion in genetics & development*, Jun, 19(3), pp. 230--6.
- Vetter, I. R. & Wittinghofer, A., 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294(5545), pp. 1299--1304.
- Wolfenson, H., Henis, Y. I., Geiger, B. & Bershadsky, A. D., 2009. The heel and toe of the cell's foot: a multifaceted approach for understanding the structure and dynamics of focal adhesions.. *Cell motility and the cytoskeleton*, Nov, 66(11), pp. 1017--29.
- Zamir, E. & Geiger, B., 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions.. *Journal of cell science*, Oct, 114(Pt 20), pp. 3583--90.
- Zenker, M., 2011. Clinical manifestations of mutations in RAS and related intracellular signal transduction factors. *Current opinion in pediatrics*, 23(4), pp. 443--451.
- Zhang, Z. et al., 1996. Integrin activation by R-ras. *Cell*, 85(1), pp. 61--69.

## Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuallererst bei PD Dr. Georg Rosenberger. Zum einen für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung während der Versuche, die zahlreichen Ratschläge und schnelle Beantwortung meiner Fragen. Vor allem gilt der Dank seiner aufgebrauchten Zeit und Geduld bei der kritischen Durchsicht meiner Arbeit.

Ich danke auch Prof. Dr. Oliver Ullrich für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens.

Für die Einarbeitung im Labor danke ich Marika Pusch. Für die wertvolle Hilfe und die vielen Ratschläge, die in die experimentelle Umsetzung dieser Arbeit eingegangen sind, danke ich insbesondere Verena Kolbe, Liisa Knipp und Frederike Harms. Auch Dr. Uta Meyer zum Büschenfelde möchte ich für ihr stets offenes Ohr bei Laboralltagsproblemen und auch für die anregenden fachlichen Diskussionen danken.

Abschließend möchte ich mich bei allen weiteren Mitgliedern der AG Kutsche und AG Rosenberger ganz herzlich für die freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die interessanten Gespräche auch außerhalb des Laboralltags bedanken.

## Eidesstattliche Erklärung

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, 30.04.2015

---

Jan Bautsch