

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

Akzessorische Proteine des RTK-RAS-MAPK-
Signalwegs
Die Rolle von IQGAP1 in KRAS(G12V)-mutierten Zelllinien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Raphael Noah Horst Martin Hofmann
2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Reza Ahmadian

Zweitgutachter: Prof. Dr. Björn Stork

... meiner Familie

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation untersucht die Rolle akzessorischer Proteine im RTK-KRAS-MAPK-Signalweg mit besonderem Fokus auf IQGAP1 in KRAS-mutierten Zelllinien. IQGAP1 ist u.a. ein Gerüstprotein, das durch seine Interaktion mit einer Vielzahl von Signalwegkomponenten die zelluläre Signalübertragung moduliert. Besonders in Zellen mit einer KRAS-*gain-of-function*-Mutationen an Position Glycin-12, die eine konstitutive Aktivierung des KRAS-Proteins verursachen, könnte IQGAP1 eine entscheidende Rolle bei der Verstärkung oder Modulation der Signalweiterleitung zur Kontrolle der Proliferation und Migration spielen. Ein zentrales Problem der Krebstherapie ist die rasche Ausbildung von Wirkstoff-Resistenzen bei zielgerichteten Therapien, die direkt gegen Hauptakteure der Signalwege gerichtet sind. Daher könnte die gezielte Modulation akzessorischer Proteine eine vielversprechende Strategie zur Umgehung solcher Resistenzen darstellen und eine effektive Kombinationstherapie ermöglichen.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des akzessorischen Proteins IQGAP1 und dessen Einfluss auf KRAS-mutierte Tumorzellen. Durch CRISPR-Cas9 vermittelten *knockout* wurde untersucht, wie IQGAP1 Signalwege, Zellproliferation und Migration beeinflusst. Somit soll herausgefunden werden, ob IQGAP1 als potenzielles therapeutisches Ziel zur Überwindung von Resistenzen infrage kommt.

Der *Knockout* von IQGAP1 in den KRAS-mutierten Zelllinien CAPAN1, SW480 und HEK293 wurde erfolgreich durchgeführt und validiert. In CAPAN1-Zellen zeigte sich, dass der *Knockout* weder die Zellmigration noch die Proliferation signifikant beeinflusst. Jedoch führte der Verlust von IQGAP1 zu einer deutlichen Erhöhung der AKT-Phosphorylierung an den Stellen T308 und S473, was auf eine verstärkte Aktivierung des AKT-Signalwegs hindeutet. Andere untersuchte Signalwege, darunter STAT3, YAP, JNK und ERK, blieben hingegen unverändert.

Die Ergebnisse zeigen, dass IQGAP1 in KRAS-mutierten Zellen eine modulierende Rolle spielt, insbesondere in Bezug auf den AKT-Signalweg. Interessanterweise hatte der *Knockout* keinen Einfluss auf Migration oder Proliferation, was darauf hindeutet, dass möglicherweise kompensatorische Mechanismen aktiv sind, die weiter untersucht werden müssen. Diese Erkenntnisse verdeutlichen die Komplexität der Signalnetzwerke in Tumorzellen. Weitere Untersuchungen mit zusätzlichen Zellmodellen und funktionellen Rettungsexperimenten sind erforderlich, um die genaue Rolle von IQGAP1 und anderen akzessorischen Proteinen besser zu verstehen und ihr Potenzial für neue Therapieansätze in der Onkologie, beispielsweise im Rahmen von Kombinationstherapien zu bewerten.

Summary

This dissertation investigates the role of accessory proteins in the RTK-KRAS-MAPK signaling pathway, with a particular focus on IQGAP1 in KRAS-mutated cell lines. IQGAP1 is a scaffold protein that modulates cellular signal transduction through its interaction with various signaling components. In the context of cells with a KRAS gain-of-function mutation at position glycine-12, which leads to constitutive activation of the KRAS protein, IQGAP1 may play a crucial role in enhancing or modulating signal transmission to regulate proliferation and migration. A major challenge in cancer therapy is the rapid development of drug resistance in targeted therapies directed against key signaling pathway players. Therefore, the selective modulation of accessory proteins could represent a promising strategy to circumvent such resistance and enable effective combination therapy.

The primary goal of this study was the functional characterization of the accessory protein IQGAP1 and its impact on KRAS-mutated tumor cells. Using CRISPR-Cas9-mediated knockout, the effects of IQGAP1 on signaling pathways, cell proliferation, and migration were examined to determine whether IQGAP1 could serve as a potential therapeutic target for overcoming resistance.

The knockout of IQGAP1 was successfully performed and validated in the KRAS-mutated cell lines CAPAN1, SW480, and HEK293. In CAPAN1 cells, the knockout did not significantly affect cell migration or proliferation. However, the loss of IQGAP1 resulted in a substantial increase in AKT phosphorylation at positions T308 and S473, indicating enhanced activation of the AKT signaling pathway. Other examined pathways, including STAT3, YAP, JNK, and ERK, remained unchanged.

The results suggest that IQGAP1 plays a modulatory role in KRAS-mutated cells, particularly concerning the AKT signaling pathway. Interestingly, the knockout did not influence migration or proliferation, suggesting the presence of compensatory mechanisms that require further investigation. These findings highlight the complexity of signaling networks in tumor cells. Further studies with additional cell models and functional rescue experiments are necessary to better understand the precise role of IQGAP1 and other accessory proteins and to assess their potential for novel therapeutic approaches in oncology, such as combination therapies.

Abkürzungsverzeichnis

A		N	
Abb.	Abbildung	n	nano
AKT	Proteinkinase B	NMD	<i>nonsense -mediated decay</i>
AK	Antikörper	NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>	NFkappaB	<i>nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i>
APS	Ammoniumpersulfat	NPM1	Nucleophosmin
ARF	<i>ADP-ribosylation factor</i>	NTC	<i>non-template control</i>
ARP	<i>actin related protein</i>	N-terminal	Amino-terminal
AS	Aminosäure	N-WASP	<i>neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat	P	
B		PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
BSA	Rinderserum Albumin	PCR	Polymerase Kettenreaktion
C		PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent protein-kinase 1</i>
C	Celsius	PH	<i>pleckstrin homology</i>
CaM	Calmodulin	PI3K	Phosphatidolinositol 3-Kinase
Cas	<i>CRISPR associated protein</i>	PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
CC	<i>coiled-coil domain</i>	PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
CD20	<i>Cluster of differentiation 20</i>	PKC	Proteinkinase C
CDC42	<i>cell division control protein 42 homology</i>	pS6K	p70S6Kinase
cDNA	komplementäre DNA	PTB	phosphotyrosinbindend
CHD	<i>Calponin homology-domain</i>	PTPN11	<i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11</i>
CNK1	<i>Connector enhancer of kinase suppressor of RAS 1</i>	Q	
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>	qPCR	quantitative PCR
Ct	<i>cycle threshold</i>	R	
C-terminal	Carboxyl-terminal	RAB	<i>RAS-like in brain</i>
D		RAC1	RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1
Da	Dalton	RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	RAN	<i>RAS-like nuclear</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	RAS	<i>rat sarcoma</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RBD	RAS-bindende Domäne
DTT	Dithiotreitol	RGCT	<i>RASGAP C-terminal domain</i>
		RHO	<i>RAS-homology</i>

E					
EDTA	Ethylendiamintetraessig-säure	RICTOR	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>		
EGF(R)	<i>Epidermal growth facor (receptor)</i>	RNA	Ribonukleinsäure		
ELK1	ETS Like-1 Protein	ROI	<i>region of interest</i>		
Erbin	ErbB2-binding protein	RSK	90 kDa	ribosomale	S6
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>	RTK	<i>Rezeptortyrosinkinase</i>		
ERRB	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene</i>	S			
et al.	<i>et alia</i> (und Co-Autoren)	SDS-PAGE	<i>Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide eletrophoresis</i>		
		sgRNA	<i>single guide RNA</i>		
F-Aktin	filamentöses Aktin	SH2	<i>Src homology 2 domain</i>		
FBS	fetales Rinderserum	SH3	<i>Src homology 3 domain</i>		
FDA	<i>Food and Drug administration</i>	SHOC2	<i>suppressor of clear homolog 2</i>		
FHL1	<i>four and a half LIM-domain protein 1</i>	SHP2	<i>SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 2</i>		
FOXO	<i>forkhead box transcription factor</i>	shRNA	<i>small hairpin RNA</i>		
		SIN1	<i>stress-activated MAP kinase-interacting protein 1</i>		
g	Gramm / Erdbeschleunigung	SOS	<i>son of sevenless</i>		
GAP	GTPase aktivierendes Protein	SPRED1	<i>sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1</i>		
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	T			
GDP	Guanin-Diphosphat	TAZ	<i>transcriptional co-activator with PDZ-binding motif</i>		
GEF	<i>guanine exchange factor</i>	TBS(-T)	Tris gepufferte Salzlösung (mit Tween-20)		
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor	TEAD	<i>transcription enhanced associate domain</i>		
GRB2	<i>growth-factor receptor bound protein 2</i>	TEMED	Tetramethylethylendiamin		
GRD	<i>GTPase activating protein-related domain</i>	Tween-20	Polyoxytheylen-Sorbitan-Monolaureat		
GTP	Guanin-Triphosphat	U			
H		U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)		
h	hora / Stunde	UV	Ultraviolett		
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>	V			
HPRT1	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1	V	Volt		
HRAS	<i>Harvey RAS viral oncogene homolog</i>	Vol.	Volumen		
HVR	hypervariable Region	v/v	Volumenprozent		

I		W	
IQGAP	<i>IQ-motif containing GTPase activating protein</i>	WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>	WF	Wachstumsfaktor
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>	WNT	<i>Wingless/integrated</i>
J		WT	Wildtyp
JNK	<i>c-Jun-N-terminale-Kaskade</i>	Y	
K		YAP	yes-associated protein
k	kilo		
KO	<i>knockout</i>		
KRAS	Kirsten RAS		
KSR	Kinase suppressor of RAS		
L			
l	Liter		
LATS	<i>large tumor suppressor</i>		
LLPS	<i>liquid-liquid phase separation</i>		
M			
m	Meter / milli		
M	Molar / Mol pro Liter		
μ	mikro		
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>		
MEK	<i>mitogen activated protein</i>		
Merlin	<i>Moesin-Ezrin-Radixin-Like Protein</i>		
min	Minute		
mLST8	<i>mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>		
MORG1	<i>mitogen-activated protein kinase organizer 1</i>		
MP1	<i>MEK-binding partner 1</i>		
mRNA	<i>messenger RNA</i>		
MST	<i>mammalian sterile 20-like kinase</i>		
mTOR(C)	<i>mammalian target of Rapamycin (complex)</i>		

Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren

Die 20 Aminosäuren werden mit dem Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Code abgekürzt.

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat/Asparaginsäure
E	Glu	Glutamat/Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin

H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Krebs	1
1.1.1	Epidemiologische Daten	1
1.1.2	Krebsentstehung	2
1.1.3	<i>Hallmarks of cancer</i> und Signalwege	3
1.1.4	Therapieansätze	4
1.2	RTK-RAS-MAPK-Signalweg.....	5
1.2.1	RTKs und EGFR	5
1.2.2	KRAS	6
1.2.3	MAP-Kinasen Kaskade	7
1.3	Akzessorische Proteine	9
1.3.1	Akzessorische Proteine im RTK-RAS-MAPK-Signalwegs.....	10
1.3.2	IQGAP1	12
1.4	RASopathien	14
1.5	PI3K-AKT-Signalweg	15
1.6	Ziele der Arbeit.....	16
2.	Material und Methoden	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Zelllinien	18
2.1.2	Zellkulturmedien und –zusätze	18
2.1.3	Puffer und Lösungen.....	18
2.1.4	Antikörper und immunhistochemische Färbung	19
2.1.5	Biochemikalien und Chemikalien.....	20
2.1.6	Kit-Systeme und Proteine	22
2.1.7	Oligonukleotide.....	22
2.1.8	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.9	Geräte.....	23
2.1.10	Programme.....	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1.1	RNA Extraktion.....	25
2.2.1.2	cDNA-Synthese.....	25
2.2.1.3	qPCR	25
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	26
2.2.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
2.2.2.2	<i>Western Blot</i>	27
2.2.2.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Immunoblotting).....	27

2.2.3	Zellbiologische Methoden	28
2.2.3.1	Zellkultivierung	28
2.2.3.2	Auftauen von Zellen	28
2.2.3.3	Passagieren von Zellen	28
2.2.3.4	Zellzahlbestimmung	29
2.2.3.5	Kryokonservierung von Zellen	29
2.2.3.6	Zelllyse	29
2.2.3.7	Proliferations-Assay	29
2.2.3.8	Migrations-Assay.....	29
2.2.3.9	Stimulations-Assay.....	30
2.2.3.10	CRISPR-Cas9	30
2.2.3.11	Konfokale Mikroskopie	30
3.	Resultate	31
3.1	RNA-Expression akzessorischer Proteine des RTK-RAS-MAPK-Signalwegs..	31
3.2	<i>Western Blot</i> Expressionsanalysen verschiedener Akzessorischer Proteine....	32
3.3	Mykoplasmen-PCR	32
3.4	<i>Knockout</i> -Validierung mittels <i>Western Blot</i>	33
3.5	<i>Knockout</i> -Validierung mittels qPCR.....	34
3.6	IQGAP1- <i>Knockout</i> -Validierung mittels konfokaler Mikroskopie und IQGAP1 kolokalisiert mit Aktin zellgrenznah	35
3.7	IQGAP1- <i>Knockout</i> hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate von CAPAN1-Zellen	36
3.8	IQGAP1 <i>Knockout</i> hat keinen Einfluss auf die Migration in CAPAN1-Zellen	37
3.9	IQGAP1 <i>Knockout</i> führt zu einer erhöhten Phosphorylierung von AKT an den Phosphorylierungsstellen T308 und S473 in CAPAN1-Zellen	38
4.	Diskussion	39
	Literatur- und Quellenverzeichnis	45

1. Einleitung

1.1 Krebs

Der Begriff Krebs leitet sich vom lateinischen Begriff *cancer* ab, da man in der Antike eine Ähnlichkeit zwischen der Schere des Krebses und der Krankheit, die sich im gesunden Gewebe ausbreitet, sah. Krebs ist somit die laienhafte Bezeichnung für maligne oder bösartige Erkrankungen. Diese umfassen alle Erkrankungen in denen Zellen ohne Kontrolle oder Richtung wachsen, sich ausbreiten und dabei unerwünscht Schaden anrichten. Lebewesen brauchen sich teilende Zellen, um zu wachsen und sich zu entwickeln. Normalerweise unterliegt der Prozess der Zellteilung und des Gewebswachstums komplexer genetischer Kontrollen. Krebszellen entziehen sich dieser Kontrolle und unterscheiden sich funktionell und strukturell von den Ursprungszellen (Aigner et al., 2016).

Als Grundlage für diese Entziehung genetischer Kontrolle sind Schäden der Desoxyribonukleinsäure oder *desoxyribonucleic acid* (DNA). Dadurch wird die Funktion und Expression von sogenannten Protoonkogenen verändert oder Tumorsuppressorgene deaktiviert. Protoonkogene werden als dominant beschrieben und wirken durch *gain-of-function* Mutationen, während Tumorsuppressorgene als rezessiv angesehen werden und durch *loss-of-function* zur Tumorentstehung beitragen (Liu and Weissman, 1992). Es wird davon ausgegangen, dass die Zelle als klonalen Ursprungs des Tumors mehrere solcher Mutationen durchgemacht haben muss (Ma et al., 2012). Somit ist Krebs im Alter häufiger durch Akkumulation solcher Mutationen und es gibt eine familiäre Häufung bei Personen mit Keimbahnmutationen, welche schon bei der Geburt eine Prädisposition haben. Weiterhin ist der Lebensstil von entscheidender Bedeutung. Häufige Gründe für Mutationen sind krebserregende Stoffe, auch Karzinogene genannt, wie beispielsweise viele Inhaltsstoffe von Tabak, Alkohol oder UV-Licht, radioaktive Strahlung, Hormone, Viren und viele mehr. Alle lösen Veränderungen der DNA aus und somit kann ein direkter kausaler Zusammenhang gefunden werden (Aigner et al., 2016, Siemiatycki et al., 2004).

1.1.1 Epidemiologische Daten

Im Jahr 2018 gab es fast 500 000 Krebsneuerkrankungen in Deutschland mit einer rohen Inzidenz von 554,1/100 000 bei den Frauen und 648,2/100 000 bei den Männern. Es starben knapp 230 000 Menschen mit roher Mortalität von 249,5/100 000 Frauen und 303,8/100 000 Männer (Erdmann et al., 2021). Somit erkrankten jedes Jahr über 5‰ der Gesamtbevölkerung an Krebs und sterben ca. 3 ‰, das sind ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland (Arndt et al., 2021). Bösartige Neubildungen ist die zweithäufigste Todesursache in der deutschen Gesamtbevölkerung hinter Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, sind aber die Hauptursache für *years of life lost* (Wengler et al., 2021).

Durch moderne Therapien überleben durchschnittlich 50 % aller Personen mit Krebs ihre Erkrankungen, jedoch mit sehr unterschiedlichen Werten für verschiedene Tumorentitäten. Beispielsweise haben Menschen mit Tumoren am Hoden oder malignem Melanom eine 5-/10-Jahres Überlebensrate von ca. 90 %, während Personen mit Mesotheliom oder Pankreaskarzinom nur eine Überlebensrate von ca. 10 % über 5 Jahre und 5 % über 10 Jahre haben (Erdmann et al., 2021).

1.1.2 Krebsentstehung

Zur Entstehung von Krebs gibt es mehrere Hypothesen. Zu den Ursprüngen einer Tumorentität kann man unterscheiden zwischen den monoklonalen Hypothesen und denen die von mehreren Ursprungszellen ausgehen. Die monoklonalen Hypothesen beschreiben, dass der Tumor aus einer einzigen mutierten Zelle entsteht, welche einen Vorteil im Sinne der Theorie Darwins hat. Diesen Hypothesen gehen dann von einer klonalen Divergenz aus, dass Abkömmlinge der Primärzelle verschiedene weitere Mutationen akquirieren und so eine intratumorale Heterogenität entsteht (Marusyk and Polyak, 2010). Andere Hypothesen gehen von mehreren Ursprungszellen (Polyklonalität) aus, welche dann konvergieren und eine sekundäre Oligo- oder Monoklonalität zur Folge hat. Aus der sekundären Oligo- oder Monoklonalität kann dann wieder eine Divergenz erfolgen. (Fanale et al., 2021)

Natürliche Zellen, sowie Tumorzellen, bilden Netzwerke und probieren das Überleben sicher zu stellen. Während Erstere dies in einer organisierten und kontrollierten Weise machen, fehlt Zweiteren diese Kontrolle. In der Theorie der Tumorentstehung verlieren Zellen immer mehr Eigenschaften, die sie mit den umliegenden gesunden Zellen teilen, und mutieren zugunsten undifferenziertem, unkontrolliertem Wachstum, Migration und Ausbreitung der Zellen (Grizzi et al., 2006). Der Tumor wird durch verschiedene Mutationen dabei zunehmend heterogener (Fanale et al., 2021).

Eine weitere bekannte Hypothese zur Tumorentstehung von Adenokarzinomen ist die Adenom-Karzinom Sequenz. Beispielhaft wird diese an dem kolorektalen Karzinom erklärt. Von der normalen Kolonschleimhaut kommt es zuerst zu einem tubulären Adenom, dann zu einem Adenom mit schweren Atypien bis hin zu einem Adenokarzinom. Der Übergang von einer Phase in die Nächste ist gekennzeichnet durch eine typische Abfolge von Mutationen. Zuerst Inaktivierung des *adenomatous polyposis coli* (APC)-Tumorsupressor-Gens des *wingless/integrated* (WNT)-Signalweges, gefolgt von Mutation des Protoonkogens *Kirsten Rat Sarcoma* (KRAS) und weitere Mutationen, wie von Zellzyklusregulierenden Genen, z.B. p53 (Fearon and Vogelstein, 1990). Von ersten adenomatösen Veränderungen bis zur Adenokarzinom-Entstehung vergehen bis zu 20 Jahre (Sievers et al., 2017). Somit besteht viel Zeit für Erkennung der Krebsvorstufen

und deshalb wird auch eine Koloskopie alle zehn Jahre bei Patienten über 50 empfohlen (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, 2021).

Andere Adenom-Karzinom Sequenzen gehen schneller, wie beispielsweise des Adenokarzinoms des Pankreas, bei dem oft als eine der ersten Mutationen schon eine KRAS-Mutation auftritt (Luo, 2021). Bei Pankreas-Karzinomen ist eine schnelle Progression zu beobachten (Yu et al., 2015). In myeloproliferativen Erkrankungen konnte somit gezeigt werden, dass die Reihenfolge von somatischen Mutationen essenziell für die Entwicklung der Erkrankung ist (Kent and Green, 2017).

1.1.3 *Hallmarks of cancer* und Signalwege

Bei der Transformation von gesunden Zellen zu Krebszellen erreichen die Zellen die *Hallmarks of cancer*. Die *Hallmarks* bestehen aus: Aufrechterhaltung proliferativer Signale, Unempfindlichkeit zu wachstumshemmenden Signalen, Gewebeinvasion und Metastasierung, unbegrenztes Replikationspotential, anhaltende Angiogenese und Entgehen des Zelltodes (Hanahan and Weinberg, 2000). In den letzten Jahren sind jedoch neue Erkenntnisse dazu gekommen, weshalb die beiden Autoren 2011 die neue Generation der *Hallmarks* veröffentlichten. Dazu kamen Umgehung der Immunabwehr, tumorfördernde Entzündung, Genominstabilität und Mutation, sowie die Reprogrammierung des Energiestoffwechsels (Hanahan and Weinberg, 2011).

Die *Hallmarks* werden erreicht durch Veränderungen in den jeweils zugehörigen Signal- und Kommunikationswegen (Hanahan and Weinberg, 2011). Beispielsweise ist die Aufrechterhaltung der mitogenen Aktivität eines der bekanntesten Merkmale von Tumorzellen. Dies kann durch Wachstumsfaktoren (Witsch et al., 2010), Rezeptoren (Lemmon and Schlessinger, 2010), Mutationen in Signalproteinen beispielsweise RAS (*rat sarcoma*) oder des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalwegs (Davies and Samuels, 2010) oder auch Mutationen im Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K-) - Proteinkinase B (AKT-) – Signalweg (Jiang and Liu, 2009, Yuan and Cantley, 2008) passieren. Negative Feedback-Mechanismen wie beispielsweise Ubiquitinierungen (Wertz and Dixit, 2010) und Endozytose (Mosesson et al., 2008) spielen zudem eine wichtige Rolle in der Veränderung von Signalwegen (Amit et al., 2007).

Bei den anderen *Hallmarks* gibt es auch eine breite Spanne an Wegen wie diese erreicht werden können und es gibt auch Überlappungen zwischen Signalwegen die einen Einfluss auf mehrere *Hallmarks* haben, auch wenn es noch keinen definitiven Konsens zu den Zugehörigkeiten gibt (Chen et al., 2021).

1.1.4 Therapieansätze

Aktuell ist die Krebstherapie auf drei Säulen aufgestellt: Der Chemotherapie, der Chirurgie oder Resektion und der Radiotherapie. Die Chemotherapie ist im 20. Jahrhundert entstanden als in den beiden Weltkriegen auffiel, dass Soldaten, die Senfgas ausgesetzt waren erniedrigte Leukozytenwerte aufwiesen. Somit wurde Stickstoff-Senfgas das erste Chemotherapeutikum und wurde 1943 in der Behandlung von Lymphomen eingesetzt. In der Gruppe der Alkylanzien folgten in den darauffolgenden Jahren Cyclophosphamid und Chlorambucil. 1948 konnte mit Methotrexat, ein Folsäure-Analogon, Leukämien bei Kindern in Remission gebracht werden. Es folgten viele weitere Chemotherapeutika in verschiedenen neuen Gruppen. (Arruebo et al., 2011)

In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde die chirurgische Resektion sowie die Radiotherapie, die Anfang des 20. und Ende des 19. Jahrhunderts erstmals gezielt verwendet wurden in der Krebsbehandlung weiterentwickelt und auch mit Chemotherapeutika kombiniert. Adjuvant, nach der OP, oder neoadjuvant, vor der OP. Im Anschluss kam es aber meist nur zu einem Plateau der Heilungsraten oder leichte Besserungen durch gezielte randomisierte Studien für Kombinationstherapien. (Arruebo et al., 2011)

Ein Aufschwung kam erneut in den 90ern des letzten Jahrhunderts durch die Entwicklung von spezifischer Therapie auf molekulare Ziele. Als Beispiel sind hier Kinasehemmer zu nennen (Spada and Myers, 2008). Die Immuntherapie nutzt Anteile des Immunsystems in der Therapie, wie beispielsweise Antikörper (AK), Zytokine und Immunzellen. Rituximab, ein Anti- *cluster of differentiation 20* (CD20)-AK, war der erste AK, der in der Tumorthherapie von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen wurde, zur Therapie von B-Zell-Lymphomen (Arruebo et al., 2011). Heute sind AK-Therapien nicht mehr aus onkologischen Therapien wegzudenken, wie beispielsweise Trastuzumab, ein AK gegen den *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2), eine Rezeptortyrosinkinase (RTK), in der Brustkrebstherapie (Jeyakumar and Younis, 2012), Cetuximab, ein *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-AK in der Behandlung von Kolonkarzinomen (Vincenzi et al., 2010) oder Pembrolizumab und weitere Immuncheckpoint-Inhibitoren, welche eine weite Anwendung bei vielen verschiedenen Tumorentitäten finden (Webb et al., 2018). (Arruebo et al., 2011)

Aktueller Teil der Forschung sind unter anderem Nanokörper (Arruebo et al., 2011) und AK-Wirkstoff Konjugate, wie beispielsweise Enfortumab-Vedotin, welches seit Kurzem Erstlinientherapie beim metastasiertem Urothelkarzinom der Harnblase ist (Müller, 2024). Es ist ein AK gegen Nektin 4, ein Oberflächenprotein der auf Urothelkarzinomzellen exprimiert wird, verbunden mit einem Zytotoxin, um dieses gezielt in die gewünschten Zellen zu schleusen (Hoffman-Censits and Maldonado, 2022).

Durch gezielte Therapien können sich aber auch schnell Resistenzen in den Tumoren bilden, weshalb eine Suche nach weiteren möglichen therapeutischen Zielen essenziell ist! (Aldea et al., 2021)

1.2 RTK-RAS-MAPK-Signalweg

Mutationen der RTKs und Proteine des RAS-MAPK-Signalwegs sind einer der häufigsten Mutationen, die in Krebs gefunden werden und sind oft von entscheidender Bedeutung in der Entstehung des Tumors aus dem gesunden Gewebe (Transformation) (McDonnell et al., 2015, Hymowitz and Malek, 2018, Vogelstein et al., 2013).

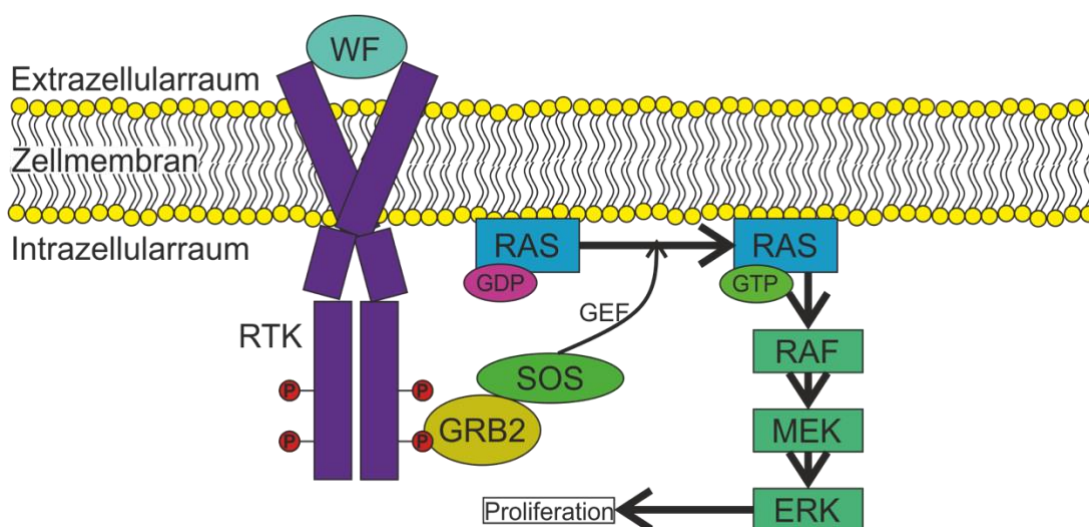


Abb. 1: Schematische Darstellung des RTK-RAS-MAPK-Signalwegs: Zu sehen ist ein dimerisierte Rezeptortyrosinkinase (RTK) mit gebundenem Wachstumsfaktor (WF). Der RTK liegt in phosphoryliertem Zustand vor. Über das Adapterprotein GRB2 (*growth factor receptor bound protein 2*) und dem *Guanine-exchange-factor* (GEF) SOS (*sons of sevenless*) wird RAS (*rat sarcoma*) aktiviert, indem es ein Guanosintriphosphat (GTP) bindet (Chardin et al., 1993). Dies führt zur kaskadenartigen Aktivierung (durch Phosphorylierung) von RAF (*rapidly accelerating fibrosarcoma*), MEK (*mitogen activated protein*) und ERK (*extracellular regulated kinase*) (Hattori et al., 1992). Aktiviertes ERK gibt der Zelle, unter anderen, das Signal zur Proliferation (Lu and Malemud, 2019). Diese Abbildung ist abgewandelt aus (Pudewell et al., 2021).

1.2.1 RTKs und EGFR

RTKs sind eine Unterklasse der Tyrosinkinasen, die an der Zell-Zell-Kommunikation involviert sind und viele zelluläre Prozesse kontrollieren. Beispielsweise das Wachstum, die Motilität, den Metabolismus, aber auch die Differenzierung (Du and Lovly, 2018). Es gibt 58 humane RTKs (Manning et al., 2002), die alle aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne, einer einzelnen membranspannenden Helix und einem intrazellulären Teil aufgebaut sind. Letzterer beinhaltet eine regulatorische Region, der Tyrosinkinasedomäne, sowie einem Carboxyl (C-) terminalen Ende (Hubbard, 1999).

RTKs werden durch spezifische Liganden aktiviert. Die Ligandenbindung verursacht eine Dimerisierung der Rezeptoren (Ullrich and Schlessinger, 1990). Dies verursacht eine Konformationsveränderung, wodurch die Tyrosinkinasedomänen nicht länger inhibiert werden und sich autophosphorylieren (Lemmon and Schlessinger, 2010). Damit befinden sich die RTKs in ihrem aktiven Zustand.

Die *erythroblastic leukemia viral oncogene* (ERBB)-Familie ist eine Familie von RTKs die mit Wachstumsfaktoren (*growth factor*) stimuliert werden. Der EGFR ist der Hauptrezeptor für den *epidermal growth factor* (EGF) und war der erste, der in der ERBB-Familie entdeckt wurde. Da alle Rezeptoren der Familie ähnlich zum EGFR sind, werden sie auch *Human epidermal growth factor receptor* (HER) 1-4 genannt (Wagener and Müller, 2010).

Proteine mit einer *Src homology 2* (SH2)-Domäne oder *phosphotyrosine binding* (PTB)-Domäne binden an den phosphorylierten oder aktiven EGFR (Cantor et al., 2018). Die Spezifität der Proteine für den richtigen Rezeptor wird durch die variable Region der Domänen bestimmt, die nur gewisse Aminosäuren erkennen, die C-terminal der Phosphorylierungsstelle liegen (Peter C. Heinrich, 2014). *Growth-factor receptor bound protein 2* (GRB2) bindet mit seiner SH2-Domäne an den EGFR und rekrutiert *son of sevenless* (SOS), welcher ein RAS-spezifischer Nukleotidaustauschfaktor ist (Cantor et al., 2018).

1.2.2 KRAS

KRAS gehört zur Familie der RAS-Proteine innerhalb der Superfamilie der *small GTP-binding* proteins oder kleinen GTPasen. Weitere Familien innerhalb der Superfamilie sind RHO (*RAS-homology*), ARF (*ADP-ribosylation factor*), RAB (*RAS-like in brain*) und RAN (*RAS-like nuclear*) (Colicelli, 2004). Diese Familien sind in allen Eukaryonten zu finden und haben ihre Hauptfunktionen innerhalb der Signaltransduktion. Beispielsweise RAS in der Zellproliferation, RHO in der Regulation des Zytoskeletts oder RAB in der Vesikelfusion und in dem -transport (Reiner and Lundquist, 2018).

Kleine GTPasen hydrolysieren Guanin-Triphosphat (GTP) zu Guanin-Diphosphat (GDP) durch die intrinsische GTPase Aktivität. Dies kann unterstützt werden durch ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) (z.B. Neurofibromin 1). Um erneut ein GTP binden zu können muss das Protein sich von dem GDP lösen, welches durch *guanine exchange factors* (GEF) (z.B. SOS) bewerkstelligt wird. Das nun freie G-Protein kann schnell ein neues GTP aufnehmen, dank der hohen Affinität zu diesem (Peter C. Heinrich, 2014).

RAS ist aktiv in der GTP-gebundenen Form und inaktiv nach der Hydrolyse. Somit sind GEFs und GAPs wichtige Regulatoren der kleinen GTPasen. Sie sind große Proteine mit

mehreren Domänen, die mit vielen anderen Molekülen interagieren können (Bos et al., 2007).

Innerhalb der RAS-Familie gibt es die sogenannten klassischen RAS-Proteine. Diese sind HRAS (*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*), NRAS (*neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) und die beiden *splice*-Varianten von KRAS (KRAS4A und KRAS4B) (Madaule and Axel, 1985). Diese RAS-Varianten sind zu 90% homolog außerhalb ihrer hypervariablen Region (HVR). Letztere beinhaltet die CAAX-Box bestehend aus Cystein (C), zwei aliphatischen Aminosäuren (A) und eine beliebige Aminosäure (X), die die Art der C-terminalen posttranslationalen Modifikation des Proteins und somit auch die Assoziierung mit der Zellmembran bestimmt (Cox and Der, 2002, Wennerberg et al., 2005). Die beliebige Aminosäure der CAAX-Box bestimmt, wie das Protein isoprenyliert wird (Farnesylierung oder Geranylgeranylierung) (Kato et al., 1992). Dies ist notwendig für die Signaltransduktion (Cox et al., 2015, Zhou et al., 2018).

RAS aktiviert Effektoren indem es Diese an die Membran rekrutiert (Leevers et al., 1994, Simanshu et al., 2017, Stokoe et al., 1994, Ferro and Trabalzini, 2010, Castellano and Downward, 2011). Beispielsweise rekrutiert RAS RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*), eine MAP3-Kinase, welche den Beginn des ersten kanonischen Signalwegs von RAS darstellt, an die Membran durch die RAS-bindende Domäne (RBD) und Cystein-reiche Domäne (Hibino et al., 2011, Tran et al., 2021). Die Lokalisation an der Membran ist essenziell für die RAF-Aktivierung (Stokoe et al., 1994). An der Membran wird ein Tyrosin von RAF phosphoryliert und das Protein somit aktiviert (Jelinek et al., 1996).

In 27 % aller Krebserkrankungen wird eine *Missense gain-of-function* Mutation von RAS gefunden, welche dafür sorgt, dass RAS konstitutionell aktiv ist und somit sich jeglicher Kontrolle entzieht und Effektoren unabhängig aktivieren kann. 98 % dieser Mutationen sind an der Stelle G12, G13 oder Q61 zu finden. KRAS ist mit 85 % die am häufigsten mutierte RAS-Isoform in Krebszellen, gefolgt von NRAS und HRAS mit jeweils ca. 10 % und 5 %. (Hobbs et al., 2016)

1.2.3 MAP-Kinasen Kaskade

Die MAP-Kinasen Kaskade ist ein hoch konservierter Signalweg bestehend aus drei aufeinanderfolgenden aktivierten Proteinkinasen: MAP3K, MAP2K und MAPK (L'Allemain, 1994). Die Kaskade nimmt eine zentrale Rolle in vielen wichtigen zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung, Stress und Apoptose ein (Keshet and Seger, 2010). Die Kaskade verhält sich wie ein hochkooperatives Enzym mit einer steilen Stimulus-Antwort-Kurve. Diese Eigenschaften eignen ihn, um auf diskrete zelluläre Zustandsänderungen zu reagieren. (Huang and Ferrell, 1996)

Die drei Hauptfamilien der MAPK können eingeteilt werden in die zellwachstumsfördernde Kaskade mit ERK (*extracellular signal regulated kinase*) und in die zwei Stress-aktivierten Kaskaden mit p38 oder JNK (c-Jun-N-terminale Kinasen) am Ende (Ji et al., 2009, Munshi and Ramesh, 2013). Dysregulierung der Kaskaden spielt eine wichtige Rolle in, unter anderem, neurodegenerativen und malignen Erkrankungen (Kim and Choi, 2010). In Letzteren kann der MAPK/ERK Signalweg sowohl als Tumorsuppressor als auch tumorfördernd wirken, abhängig von Signalintensität und Gewebe (Burotto et al., 2014).

RAF ist eine Serin/Threonin-Kinase und existiert in drei Isoformen ARAF, BRAF und CRAF (Wellbrock et al., 2004). ARAF ist weniger gut untersucht und zeigt eine niedrigere Kinaseaktivität gegenüber *mitogen-activated protein* (MEK) / ERK und fungiert dadurch wahrscheinlich als Regulator der MAPK-Kaskade (An et al., 2015). BRAF ist in den letzten Jahren besonders als therapeutisches Ziel aufgefallen, da es in vielen Tumoren mutiert ist. Beispielsweise bei Melanomen ist BRAF oft V600E mutiert, welches die Voraussetzung der Dimerisierung für die Aktivierung umgehen kann (Karasarides et al., 2004, Poulikakos et al., 2011). Neue gezielte Therapien, alleine oder in Kombination, zeigen gute Wirksamkeit in der Tumorthherapie (Huang et al., 2013, Bollag et al., 2010). CRAF spielt eine wichtige Rolle bei mitochondrialen Prozessen der Apoptose (Galmiche et al., 2008), aber auch in der Entstehung Resistenzen gegen RAF-Inhibitoren (Roskoski, 2010) und in der Entstehung von einigen RAS-abhängigen Tumoren (Karreth et al., 2011). RAF wird im ersten Schritt durch GTP-gebundenes RAS, wie oben beschrieben, an die Zellmembran rekrutiert und dimerisiert anschließend als Homo- oder Heterodimer. Eine Reihe von De-/Phosphorylierungen führt dann zur Aktivierung (Jambrina et al., 2014, Hu et al., 2013, Jambrina et al., 2016, Zhang et al., 2021)

MEK1 und MEK2 werden aktiviert, indem sie durch RAF an den Positionen Ser218/Ser222 (MEK1) und Ser222/Ser226 (MEK2) phosphoryliert werden. Im Anschluss bilden diese Proteine ebenfalls Hetero- oder Homodimere. MEK1 *knockout* (KO) ist letal im Maus-Modell, während MEK2-KO zu lebensfähigen und fertilen Mäusen führt. Somit können MEK1-Homodimere den Verlust von MEK2-Homodimeren kompensieren und suggeriert, dass MEK1 eine wichtigere Rolle spielt (Giroux et al., 1999, Belanger et al., 2003, Cseh et al., 2014).

ERK1/2 wird aktiviert durch die Phosphorylierung zweier Aminosäuren (Payne et al., 1991). Die erste Phosphorylierung findet durch Enzym-Substrat-Komplexbildung zwischen MEK1/2 und ERK1/2 an der Position Tyr204/187 statt, während die Zweite direkt im Anschluss oder nach Dissoziation erst nach erneuter Assoziation an Thr202/185 abläuft (Burack and Sturgill, 1997, Roskoski, 2019).

Durch Phosphorylierung von ERK werden zelluläre Prozesse in Gang gesetzt, um Zellproliferation und -überleben aufrecht zu erhalten: nukleäre Prozesse wie über ELK1 (*ETS Like-1 protein*) und NFkappaB (*nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*) (Zhao and Lee, 1999) oder zytosolische Prozesse über RSK (*90 kDa ribosomal S6 kinase*) (Gonzalez et al., 1993, Mendoza et al., 2010, Wortzel and Seger, 2011). Der MAPK-Signalweg ist in >30 % aller humanen malignen Tumoren überaktiv und ist deshalb ein Hauptziel der modernen Forschung in der Krebstherapie (Sinkala et al., 2021)

1.3 Akzessorische Proteine

Es zeigt sich immer mehr, dass Signale in Zellen durch hochspezialisierte Proteinkomplexe weitergeleitet werden, die räumlich und zeitlich aufeinander abgestimmt sein müssen. Dadurch kann die Enzymaktivität, -spezifität und die Zellantwort auf Stimuli beeinflusst und angepasst werden (Hlavacek et al., 2003, Kholodenko et al., 2010). Der Transport von membranständigen Proteinen zur Membran über den sekretorischen Weg ist gut verstanden (Omerovic and Prior, 2009, Xu et al., 2022). Zytosolische Proteine hingegen organisieren sich in membranlosen oder membranhaften Kompartimenten und biomolekularen Kondensaten mittels *liquid-liquid phase separation* (LLPS) (Wang et al., 2021, Tong et al., 2022). Die lokale Konzentration von Proteinen kann durch LLPS um das mehrfache erhöht werden, indem zuerst eine Phasentrennung von multivalenten Proteinen entsteht und im Anschluss weitere Proteine in die Phase einwandern, ohne dessen Stabilität zu beeinflussen (Xu et al., 2023, Su et al., 2016).

Für die räumliche und zeitliche Organisation von Signalwegen gibt es die akzessorischen Proteinen, die meist keine eigene enzymatische Aktivität besitzen, jedoch durch besondere Bindungsdomänen und deren Form Proteinkomplexe organisieren, und somit die Signalweitergabe fördern können (Pudewell et al., 2021). Sie binden mindestens 2 Komponenten des Signalwegs, erhöhen deren Konzentration lokal und bringen die interagierenden Komponente in räumliche Nähe (Hunter, 2000, Tian et al., 2007, Ivakhno and Armstrong, 2007).

Akzessorische Proteine können in 4 Gruppen anhand deren Funktion und Struktur eingeteilt werden. Gerüst- oder *scaffold* Proteine sind zytosolische Mehrdomänen Proteine die mindestens zwei unterschiedliche Komponenten des Signalwegs binden, zu einem Komplex organisieren und so deren Funktion modulieren. Adapterproteine verknüpfen über SH2 und/oder SH3-Domänen zwei Partner und können so auch den weiteren Verlauf des Signalwegs regulieren. Anker- oder *anchor* Proteine binden an die Membran, und lenken weitere Interaktionspartner (meist Kinasen) zum Wirkort. Die letzte Gruppe sind die Andock-

oder *docking* Proteine, welche Komplexe bilden, indem sie Effektoren, und G-Proteine oder RTKs, an der Membran binden. (Pudewell et al., 2021)

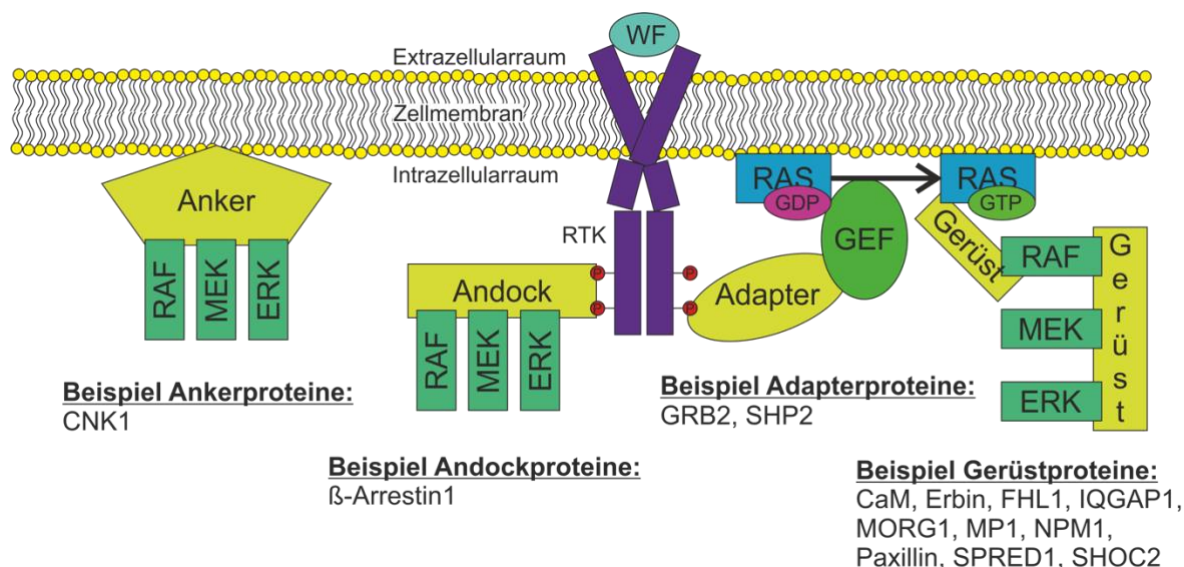


Abb. 2: Einteilung der akzessorischen Proteine anhand von Beispielen des RTK-RAS-MAPK-Signalwegs: Schematische Darstellung des Signalwegs vergleichbar mit Abb. 1. Ankerproteine binden an die Membran und bringen weitere Proteine zum Wirkort. Andockproteine bilden Komplexe mit G-Proteinen oder RTKs und Effektoren. Adapterproteine verknüpfen SH2- und/oder SH3-Domänen zweier Partner. Gerüstproteine sind zytosolische Mehrdomänenproteine die mindestens zwei Partner eines Signalwegs binden und in räumliche Nähe zueinander bringen. Diese Abbildung ist abgewandelt aus (Pudewell and Ahmadian, 2021).

1.3.1 Akzessorische Proteine im RTK-RAS-MAPK-Signalwegs

In dem RTK-RAS-MAPK-Signalweg gibt es viele akzessorische Proteine, die die Funktionen des Signalwegs ermöglichen und/oder regulieren. Im Folgenden werden nur einige aufgegriffen und kurz erklärt.

Um das Signal vom Transmembranrezeptor (der Rezeptortyrosinkinase) zu RAS zu bringen kommt das Adapterprotein GRB2 ins Spiel. Dieses 25 kDa große Protein besitzt zwei SH3-Domänen und eine SH2-Domäne und kann so SOS1 (ein RAS-GEF) aktivieren (Cantor et al., 2018, Wang et al., 2024). Das Protein *SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 2* (SHP2) ist ein weiteres solcher Adapterproteine, welches an spezifischen Orten der RTK Dephosphorylierungen durchführen kann, somit die RAS-GAP-Bindung unterbindet und dadurch die Halbwertszeit des aktivierten RAS erhöht (Agazie and Hayman, 2003, Zhou and Agazie, 2009). Außerdem kann SHP2 RAS direkt an Tyr32 dephosphorylieren und infolgedessen die Assoziation mit RAF fördern. Dadurch wird SHP2 zu einem interessanten Ansatzpunkt in der Therapie von RAS-angetriebenen Tumoren (Chou and Bivona, 2022, Bunda et al., 2015).

RAS wird durch GEFs und GAPs wie bereits beschrieben reguliert. Es gibt jedoch auch weitere Proteine, die an der Regulierung beteiligt sind. *Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1* (SPRED1) rekrutiert Neurofibromin1 an die Zellmembran, wo es durch die GAP-Funktion die RAS-Aktivität supprimiert (McClatchey and Cichowski, 2012, Stowe et al., 2012). Das *Moesin-Ezrin-Radixin-Like Protein* (Merlin) kooperiert mit SPRED1 und Neurofibromin, indem es als „selektive RAS-Barriere“ fungiert und die RAS-CRAF Interaktion hemmt (Cui et al., 2021).

Nucleophosmin (NPM1) lokalisiert sich an die Zellmembran, wo es spezifisch mit KRAS interagiert und dort die Konzentration von KRAS, und dessen *nanoclustering* erhöht. Somit wird der *geclusterte* Anteil von GTP-RAS erhöht und das MAPK-Signal verstärkt (Inder et al., 2009). NPM1-Mutationen sind häufig zu finden in akuten myeloischen Leukämien des Erwachsenen (Federici and Falini, 2013). Calmodulin interagiert spezifisch mit KRAS und verringert die Aktivierung von RAS in Fibroblasten, indem es verhindert, dass die Proteinkinase C RAS aktiviert (Villalonga et al., 2001, Villalonga et al., 2002).

Suppressor of clear homolog 2 (SHOC2) ist ein Leucin-reiches Gerüstprotein, welches die Assoziation und Dissoziation von RAS und RAF unterstützt und somit den Signalweg über ERK beschleunigt (Kwon and Hahn, 2021, Matsunaga-Udagawa et al., 2010). Es kann als Onkogen oder Tumorsuppressor agieren je nachdem, ob der MAPK- oder mTORC1 (*mammalian target of Rapamycin Complex 1*)- Signalweg überwiegt (You et al., 2024). *ErbB2-binding protein* (Erbin) ist ein negativer Modulator der kardialen Hypertrophie, indem es das ERK-Signal durch die Interaktion mit SHOC2 inhibiert (Rachmin et al., 2014). Erbin stört die *scaffolding*-Funktion von SHOC2 bei der RAS-RAF-Interaktion (Harmon et al., 2013).

CNK1 (*Connector enhancer of kinase suppressor of ras 1*) ist ein Anker-Protein welches N-terminal mit RAS und C-terminal mit RAF kooperiert und so RAS-RAF-Interaktion fördert (Rocheleau et al., 2005, Pudewell and Ahmadian, 2021). Außerdem kann es durch Acetylierung an Lys414 vermehrt an der Zellmembran assoziieren und kreiert so ein positives Feedback im RAF/ERK-Signalweg. Das ERK-Signal induziert die Acetylierung, was wiederum das ERK-Signal verstärkt (Fischer et al., 2017).

Eine große Gruppe an akzessorischen Proteinen des RTK-RAS-MAPK-Signalwegs sind die *scaffolding*- oder Gerüstproteine der MAP-Kinasen. Diese binden zwei bis drei Partner des Signalwegs, bringen sie in räumliche Nähe, regulieren deren Aktivität und bestimmen die Lokalisierung (Pudewell et al., 2021). MP1 (*MEK-binding partner 1*) assoziiert mit p14 an späten Endosomen und Lysosomen, wo es MEK1 und ERK1 bindet (Wunderlich et al., 2001, Lunin et al., 2004, Kurzbauer et al., 2004). In *Drosophila* reguliert es beispielsweise das ERK-Signal bei der Flügelentwicklung (Mouchel-Vielh et al., 2011). *Kinase suppressor*

of RAS (KSR) wurde erst selbst als Kinase betrachtet, jedoch zeigte sich schnell, dass es ein Gerüstprotein ist, welches RAF1, MEK1/2 und ERK1/2 binden kann, deren Signaltransduktion vereinfacht, jedoch nicht dafür essenziell ist (Nguyen et al., 2002). Es koordiniert die Bildung des Membran-lokaliserten Multiprotein MAP-Kinasen Komplexes (Morrison, 2001, Raabe and Rapp, 2002). *Mitogen-activated protein kinase organizer 1* (MORG1) erleichtert die ERK-Aktivierung im Komplex mit MP1 wenn stimuliert durch Lysophosphatidsäure, Phorbol-12-myristat-13-acetat oder Serum (Vomastek et al., 2004). Paxillin Ist ein fokales Adhäsionsprotein und bindet weitere Proteine neben dem RAF-MEK-ERK-Komplex und moduliert somit dessen Aktivität, kontrolliert den Umbau des Zytoskeletts und spielt somit eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion, Migration und Signaltransduktion (Deakin and Turner, 2008, Lopez-Colome et al., 2017, Crowe and Ohannessian, 2004). Das *four and a half LIM-domain protein* FHL1 ist ein Gerüstprotein zu RAF/MEK/ERK an N2B-Domänen des Proteins Titin auf Muskelzellen von Säugetieren und ist Teil eines biomechanischen Dehnungssensors in Kardiomyozyten und dient als positiver Regulator bei der druckbedingten hypertrophen Kardiomyopathie (Sheikh et al., 2008, Liang et al., 2018). Das *IQ-motif containing GTPase activating protein* IQGAP1 bindet RAF, MEK und ERK direkt in Assoziation mit dem EGF-Rezeptor (McNulty et al., 2011, Roy et al., 2004, Roy et al., 2005).

1.3.2 IQGAP1

IQGAP1 ist ein 190 kDa, 1657 Aminosäuren großes Protein welches 1994 entdeckt wurde (Weissbach et al., 1994, Weissbach et al., 1998). Es spielt eine wichtige Rolle in der Zytoskelettregulation sowie in der Signaltransduktion (Briggs and Sacks, 2003). Es hat mehrere Protein-Erkennungsmotive, wodurch die vielen Proteininteraktionen bewerkstelligt werden. Die N-terminale *Calponin homology-domain* (CHD) bindet Aktin (Mateer et al., 2004). Weiter C-terminal gehend findet sich die *coiled-coil domain* (CC), dessen Funktion noch nicht genauer bekannt ist. Weiter ist die WW-Domäne zu finden mit hochkonservierten Tryptophan-Aminosäuren. Früher wurde gedacht, dass diese Domäne ERK1/2 binden würde, jedoch zeigte sich, dass diese Domäne dazu nicht ausreichend in der Lage ist (Bardwell et al., 2017), aber es zeigte sich, dass es direkt mit der p110 α -Untereinheit von PI3K interagiert (Bardwell et al., 2023). Darauffolgend sind vier *Isoleucin/Glutamine containing motifs* (IQ-Motive), die mit MEK1/2, ERK1/2 (Roy et al., 2004, Roy et al., 2005, Bardwell et al., 2017) , Myosin-Leichte Ketten (Weissbach et al., 1998), S100B (Mbele et al., 2002) und Calmodulin (Joyal et al., 1997, Ho et al., 1999) interagieren. Die *GTPase-activating protein-related domain* (GRD) beschleunigt untypischerweise nicht die Hydrolyse des GTP in den Proteinen *cell division control protein 42 homolog* (CDC42) und *RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1* (RAC1), sondern stabilisiert die GTP-gebundene Form (Nouri et al., 2016, Kurella et al., 2009). Die *RASGAP C-terminal domain* (RGCT)

interagiert spezifisch mit der *switch-region* von CDC42 (Nouri et al., 2016). Die sehr C-terminal gelegene Domäne (CT) kann auch CDC42 binden (Elliott et al., 2012)

IQGAP1 co-immunpräzipitiert mit dem EGFR. Die Assoziation von IQGAP1 mit dem EGFR ist EGF-unabhängig und entsteht zwischen dem IQ-Motiv von IQGAP1 und der Kinasedomäne des Rezeptors, jedoch schwächt Ca^{2+} /Calmodulin die Verbindung ab. Durch EGF-Stimulation wird IQGAP1 an Ser1443 phosphoryliert, welches im Zusammenhang mit dem Proteinkinase C (PKC) -Signalwegs steht (McNulty et al., 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass in Zellen ohne IQGAP1, EGF-Stimulation nicht mehr zu einer BRAF-Aktivierung führt (Ren et al., 2007). Des Weiteren unterstützt IQGAP1 die Oligomerisierung des EGFR, fördert die Assoziation zu Phosphodiatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) und hemmt den lysosomalen Abbau des Rezeptors (Yerramilli et al., 2024).

Die Interaktion von IQGAP1 zu KRAS bleibt umstritten. Während es Quellen gibt die eine Interaktion beschreiben (Matsunaga et al., 2014), gibt es weitere die dies verneinen (Morgan et al., 2019). Gezeigt werden konnte jedoch, dass IQGAP1 ein *scaffold* von BRAF, MEK1/2 und ERK1/2 ist über das IQ-Motiv ist und, dass ERK-Bindung, die Assoziation zu MEK fördert. Außerdem moduliert IQGAP1 die EGF-stimulierte Aktivierung von MEK und ERK (Roy et al., 2005).

IQGAP1 interagiert mit den RHO-GTPasen CDC42 und RAC1 und spielt eine entscheidende Rolle bei Zelladhäsion, Polarität und Migration. Es stabilisiert die RAC1-GTP und CDC42-GTP Bindung wie oben beschrieben (Nouri et al., 2016, Nouri et al., 2020, Kurella et al., 2009). Aktiviertes RAC1 und CDC42 reguliert die IQGAP1 Funktion negativ, sodass die Interaktion zu β -Catenin inhibiert und der Cadherin-Catenin-Komplex stabilisiert wird und es somit zu einer besseren Zell-Zelladhäsion kommt (Fukata et al., 1999).

β -Catenin spielt auch eine entscheidende Rolle als Transkriptionsfaktor im WNT-Signalweg. Normalerweise liegt es in einem Komplex, dem *destruction complex*, vor, welches die Ubiquitinierung von β -Catenin begünstigt und somit den proteasomalen Abbau. Gibt es jedoch ein Signal, löst sich der Komplex und es liegt vermehrt β -Catenin in freier Form vor. Somit kann es in den Zellkern translozieren, wo es als Transkriptionsfaktor für beispielsweise Cyclin D und andere Gene fungiert, die wichtig für die Zellteilung sind (Liu et al., 2022). IQGAP1 interagiert mit mehreren Proteinen und unterstützt die Lösung aus dem *destruction complex* und die nukleäre Akkumulation (Goto et al., 2013).

Der Hippo-Signalweg ist wichtig in der Differenzierung und Regeneration von Geweben. Das Kinasemodul besteht aus *mammalian sterile 20-like Kinase* (MST1/2) und *large tumor suppressor* (LATS1/2). Wenn aktiv hemmen sie *yes-associated Protein* (YAP) und dessen Koaktivator *Transcriptional Co-activator with PDZ-binding motif* (TAZ) durch

Phosphorylierung und Inaktivierung. Somit wird im transkriptionellen Modul des Signalwegs YAP/TAZ durch 14-3-3-Proteine im Zytosol gehalten. Bei inaktivem Kinasemodul bindet YAP/TAZ mit dem Transkriptionsfaktor *transcription enhanced associate domain* (TEAD) im Zellkern und führt zur vermehrten Transkription spezifischer Gene, die dann die oben aufgeführten Funktionen ausführen. (Tollot et al., 2020). IQGAP1 interagiert mit MST1/2 und LATS1/2 über seine IQ-Motive und hemmt deren Kinaseaktivität (Quinn et al., 2021). Außerdem bindet IQGAP1 mit seinem IQ-Motiv YAP an dessen TEAD-Bindedomäne. Knockdown von IQGAP1 zeigt erhöhte Bildung des YAP/TEAD-Komplexes und somit erhöhte Transkription der YAP-abhängigen Gene (Sayedyahosseini et al., 2016).

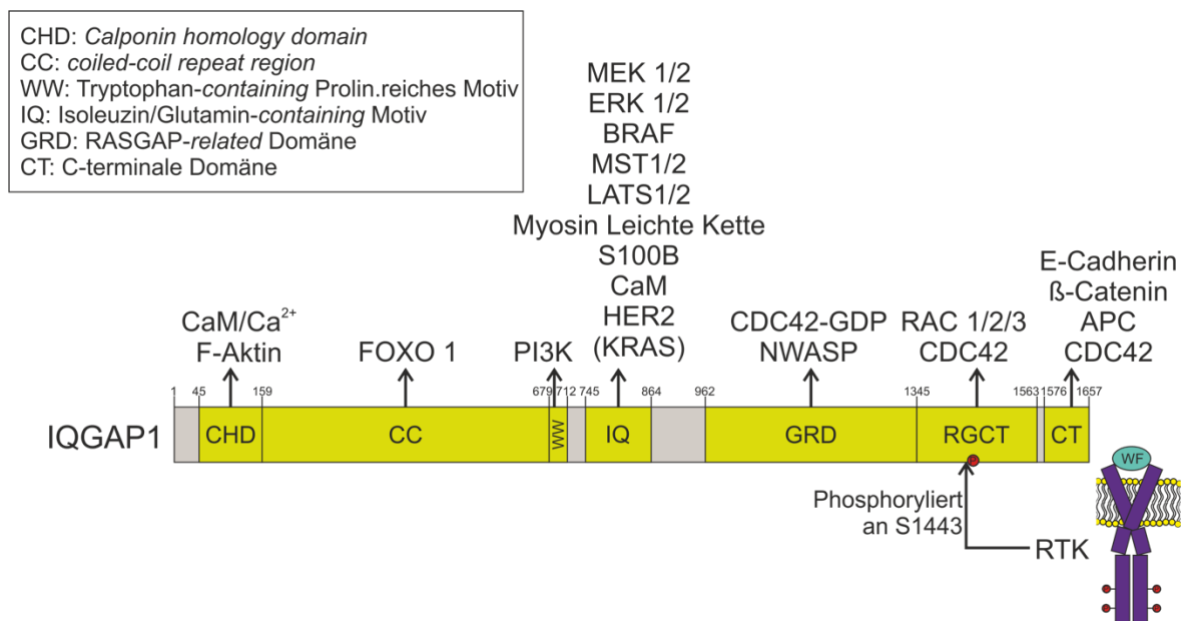


Abb. 3: Der Aufbau von IQGAP1 und eine Auswahl an Interaktionspartnern: IQGAP1 ist ein 1657 AS großes Mehrdomänenprotein mit vielen Interaktionspartnern (Weissbach et al., 1994, Weissbach et al., 1998, Smith et al., 2015). Dargestellt ist IQGAP schematisch in ganzer Länge mit den einzelnen bekannten Domänen und Interaktionspartnern, die in dieser Arbeit besprochen werden.

1.4 RASopathien

RASopathien sind eine Gruppe von Erbkrankheiten die durch Keimzellmutation in Proteinen die dem RTK-RAS-MAPK-Signalwegs angehören auftreten (Rauen, 2013). Eine große Anzahl an Erkrankungen wird durch Mutationen in akzessorischen Proteinen ausgelöst. Die meisten RASopathien haben Ähnlichkeiten wie Kleinwüchsigkeit, Gesichtsdysmorphie und kardiale Fehlbildungen jedoch haben alle eigene Charakteristika die von kutanen Läsionen bis hin zu umfassend einschränkenden Symptomen reichen können (Cizmarova et al., 2013). Alle haben die Dysregulation des MAPK-Signalwegs als pathophysiologische Grundlage und haben teilweise auch ein erhöhtes Lebenszeitrisko für das Auftreten von Krebserkrankungen (Rauen, 2013). Die meisten RASopathien werden unter verschiedenen

Syndromen zusammengefasst, also Krankheitsbilder, die durch die gleichen Symptome und Auffälligkeiten charakterisiert werden (Lilienfeld, 2013). Dabei kann das gleiche Syndrom durch verschiedene Mutationen verursacht werden, besitzt jedoch ähnliche Charakteristika.

Das Noonan Syndrom ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung und basiert meist auf einer Mutation des Proteins *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11* (PTPN11) und ist charakterisiert durch u.a. *Pterygium colli*, spezielle Gesichtsdysmorphie, Herzfehlern (es ist die zweithäufigste genetische Ursache für angeborene Herzfehler) (Siegrist et al., 2020) und Kryptorchismus (Allanson et al., 1985). Noonan-like syndrome werden ausgelöst durch beispielsweise SHOC2-Mutationen (Komatsuzaki et al., 2010). Das Syndrom hat auch Überlappungen zum Costello-Syndrom (ausgelöst durch eine HRAS-Mutation) und dem Kardio-fazio-kutanem Syndrom (meist ausgelöst durch BRAF-Mutation) (Rauen, 2013).

Neurofibromatose Typ1 wird durch eine Mutation im NF1-Gen verursacht, während Typ2 durch eine Mutation im Merlin-Gen verursacht wird. Beide sind gekennzeichnet durch unter anderem *Café-au-lait* Flecken und Neurofibromen (Jafry and Sidbury, 2020, Evans et al., 2016). Weitere RASopathien sind Legius-Syndrom (ausgelöst meist durch SPRED1-Mutation) (Jafry and Sidbury, 2020) und die hereditäre gingivale Fibromatose (ausgelöst durch SOS1-Mutation) (DeAngelo et al., 2007).

1.5 PI3K-AKT-Signalweg

AKT oder Proteinkinase B steht am Ende von 2 Signalwegen und wird hauptsächlich an zwei verschiedenen Stellen (T308 und S473) phosphoryliert. AKT-Aktivierung führt hauptsächlich zu Zellüberleben und Proliferation über FOXO und reguliert weitere metabolische Prozesse (Miricescu et al., 2019, Latronico et al., 2004)

PI3K besteht aus zwei Untereinheiten. Die Domäne p85 ist regulatorisch und besitzt zwei SH2 Domänen und assoziiert so mit phosphorylierten RTK. Mit der katalytischen Untereinheit p110 wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu PIP3 phosphoryliert (Vivanco and Sawyers, 2002). PIP3 interagiert mit der *pleckstrin homology* (PH) Domäne von AKT und rekrutiert AKT zur Membran, welches der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in dessen Aktivierung ist (Carnero et al., 2008, Ebner et al., 2017). Die PI3K-Untereinheit p110 kann auch direkt durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) oder RAS aktiviert werden. Letzteres macht PI3K einen wichtigen Effektor des RAS-Signalwegs (Castellano and Downward, 2011). *Phosphoinositide-dependent protein-kinase-1* (PDK1) ist PIP3-abhängig und phosphoryliert AKT an Stelle Thr308 (Stokoe et al., 1997).

Zur kompletten Aktivierung von AKT muss jedoch zusätzlich Ser473 phosphoryliert werden (Toker and Newton, 2000). Dies geschieht durch den *mammalian Target of rapamycin complex 2* (mTORC2) (Sarbasov et al., 2005, Jacinto et al., 2006). mTORC2 besteht aus vier Hauptproteinen: *mammalian target of rapamycin* (mTOR), dies ist die Kinase des Komplexes; *mammalian lethal with SEC13 protein 8* (mLST8), welches mit mTOR ein Heterodimer bildet; *Rapamycin-insensitive companion of mTOR* (RICTOR) und *stress-activated MAP kinase-interacting protein 1* (SIN1) (Chen et al., 2018). Letzteres ist wichtig für die Komplexbildung und besitzt eine RBD. SIN1-KO führt zu erniedrigter AKT-Aktivierung und ist embryonal lethal. mTORC2 wird über RTKs aktiviert, insbesondere durch den *Insulin like growth Factor* (IGF) (Tato et al., 2011). Der Komplex wird an die Membran durch PIP3 Interaktion rekrutiert und dadurch verringert sich die hemmende Aktivität von SIN1 auf die Kinaseaktivität des Komplexes (Liu et al., 2015). Phosphoryliertes AKT an Stellen Thr308 und Ser473 kann dann in einer Art positiven *Feedback* SIN1 phosphorylieren und die Aktivität des Komplexes weiter steigern (Yang et al., 2015). SIN1 interagiert über seine atypische RAS-Bindungsdomäne (RBD) mit RAS-Proteinen, insbesondere mit der KRAS4A-Isoform. Diese Interaktion beeinflusst jedoch weder die Assemblierung noch die Aktivität von mTORC2, was darauf hindeutet, dass SIN1 möglicherweise mTORC2-unabhängige Funktionen in der RAS-Signalübertragung besitzt und könnte so für Wechselwirkungen zwischen dem RAS-MAPK- und dem PI3K-AKT-Signalweg verantwortlich sein (Pudewell et al., 2022).

Wenn AKT nicht an beiden Phosphorylierungsstellen phosphoryliert ist, wird es vermehrt abgebaut durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg (Wei et al., 2019).

1.6 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem großen Feld der akzessorischen Proteine und deren Rolle in Signalwegen von Tumorzellen. Als Modellsystem wird der RTK-KRAS-MAPK-Signalweg untersucht, um akzessorische Proteine und deren regulatorische Funktionen in diesem Kontext zu analysieren. Ziel ist die funktionelle Charakterisierung des akzessorischen Proteins IQGAP1, insbesondere im Zusammenhang mit KRAS-*gain-of-function*-Mutationen. Dabei soll untersucht werden, inwiefern IQGAP1 die Signalweiterleitung beeinflusst und welche biologischen Prozesse, wie Proliferation oder Migration, dadurch moduliert werden.

Zunächst wird eine Expressionsanalyse relevanter akzessorischer Proteine durchgeführt, um ein Kandidatenprotein für weiterführende Untersuchungen zu identifizieren. Aufgrund unter anderen seiner bekannten Interaktion mit dem KRAS-Signalweg wurde IQGAP1 als Zielprotein ausgewählt. In weiteren Experimenten soll durch einen CRISPR-Cas9-vermittelten *Knockout* die Funktion von IQGAP1 untersucht werden. Der *Knockout* wird

durch *Western Blot*, Immunhistochemie und qPCR überprüft. Die Aktivierung relevanter Signalwege wird anhand der Phosphorylierung spezifischer Signalproteine mittels *Western Blot*-Analyse analysiert. Um die funktionellen Auswirkungen des *Knockouts* auf Zellproliferation und Migration zu bestimmen, werden Zellviabilitätstests und Scratch-Tests durchgeführt.

Obwohl akzessorische Proteine eine zentrale Rolle in der Signalwegregulation spielen, wurden sie in der Krebsforschung bislang wenig untersucht. Langfristig soll diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der Signalnetzwerke unter Einbeziehung akzessorischer Proteine beitragen, um neue Ansätze zur Überwindung von Therapieresistenzen zu ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

CAPAN1 ist eine Zelllinie entnommen aus Leber von metastatischen duktalem Pankreas Adenokarzinom eines 40-jährigen weißen Mannes mit homozygoter KRAS(G12V)-Mutation. Die Zellen exprimieren den *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) und sekretieren gastrische Muzine. (ATCC: HTB-79)

SW480 ist eine Zelllinie aus primärem Adenokarzinom des Kolons mit homozygoter KRAS(G12V)-Mutation eines 50-jährigen, weißen, männlichen Patienten. (ATCC: CCL-228)

HEK293 ist eine Zelllinie mit epithelialer Morphologie, entnommen aus einer humanen embryologischen Niere mit KRAS-Wildtyp. (ATCC: CRL-1573)

2.1.2 Zellkulturmedien und -zusätze

Name	Firma
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) with HEPES	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz & Gibco, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – high Glucose	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin f.c. 100U/ml	Life Technology, Darmstadt
Fetales Bovines Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Tabelle 1: Zellkulturmedien und -zusätze

2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Blockierlösung Licor (<i>Western blotting</i>)	1:3 Odyssey Blocking Buffer in TBS
Elektrophoresepuffer (Laufpuffer)	250 mM Tris-HCl pH 8 1,92 M Glycin 1% (v/v) SDS
FISH-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 1% IGEPAL CA-630 10% Glycerol 20 mM β -Glycerolphosphat

	1 mM Natriumorthovanadat 1 Tablette Protease-Inhibitor (in 50 ml) + 100ml dH ₂ O
Laemmli-Puffer 5x (SDS-PAGE)	10% (m/V) SDS 5% (m/V) beta-Mercaptoethanol 50% (m/V) Glycerol 125 mM Tris-HCl pH6,8 0,1% Bromphenolblau
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS -/-) pH 7,4	1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (m/V) SDS
Transferpuffer	250 mM Tris-HCl pH 8 192 mM Glycerol 0,01% (m/V) SDS 20% Methanol
Trenngelpuffer	250 mM Tris-HCl pH 8,0 1,92 mM Glycerol 1% (v/v) SDS
Tris gepufferte Salzlösung (TBS)	10 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl
TBS-T	1% Tween-20 in TBS

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

2.1.4 Antikörper und immunhistochemische Färbung

Primärer Antikörper	Organismus	Verdünnung	Hersteller
IQGAP1 (#NBP1-06529)	Kaninchen	1:1000	Novus Biologicals, Wiesbaden Nordernstedt
SHOC2 (#HPA009164)	Kaninchen	1:1000	Sigma Aldrich, Steinheim
Paxillin (#MAB3060)	Maus	1:1000	Sigma Aldrich, Steinheim
FHL1 (ab133661)	Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
SH-PTP2 (#sc-7384)	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
CNK1 (#sc-514607)	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
KSR1 (#sc-515924)	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
SPRED1 (#94063)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA
GAPDH (#218S)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA

GAPDH (#39-8600)	Maus	1:1000	ThermoFisher Scientific, Karlsruhe
alpha-Tubulin (#ab52866)	Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
ERK 1/2 (#9102)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA
pERK 1/2 (Thr202/Tyr204) (#9106S)	Maus	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA
AKT (#2920S)	Maus	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA
pAKT (Thr308) (#2965S)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA
pAKT (Ser473) (#9271)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA
STAT3 (#9139)	Maus	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA
pSTAT3 (Tyr705) (#4324)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA
SAPK/JNK (#9252S)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA
pSAPK/pJNK (Thr183/Thr185) (#9251)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA
YAP (#4912)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA
pYAP (Ser127) (#4911)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danver, USA
Sekundäre Antikörper für Western Blot			
IR®Dye 800CW anti-rabbit (#926-32213)	Esel	1:10 000	Licor, Lincoln, USA
IR®Dye 680RD anti-mouse (#926-68072)	Esel	1:10 000	Licor, Lincoln, USA
Immunhistochemie			
Alexa Fluor 546 (#A22283)	Phalloidin Labeling Probe	1:500	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 conjugated Anti-rabbit IgG (#A-21206)	Esel	1:500	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
DAPI (#D1306)	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Dihydrochlorid	-	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Tabelle 3: Antikörper und immunhistochemische Färbung

2.1.5 Biochemikalien und Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Merck, Darmstadt
Ammonium persulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Beta-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Blockierlösung	Licor, Lincoln, USA

Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
CellTiter® Blue	Promega, Madison, USA
Chloroform 99+%	Thermo Fisher scientific, Karlsruhe
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Qiagen, Hilden
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu Biotechnik, Wieblingen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Glutathione Agarose 4B	Macherey-Nagel, Düren
Glycerol	Roth, Karlsruhe
GTP	Merck, Darmstadt
IGEPAL CA-630	Merck, Darmstadt
Insulinlösung, human	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	VWR, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natrium Orthovanadat	Merck, Darmstadt
PageRuler Prestained	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS +/-) pH 7,4	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Protease Inhibitor Tabletten	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
RNAse ZAP	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Stickstoff, flüssig	Linde, Pullach
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
TRIzol™	Thermo Fisher Scientific Karlsruhe
Tween-20	Merck, Darmstadt

Trypan Blau	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
-------------	------------------------------------

Tabelle 4: Biochemikalien und Chemikalien

2.1.6 Kit-Systeme und Proteine

Kit System	Ziel	Hersteller
Cell Line Nucleofector Kit V	Nukleofektion	Lonza, Köln
ImProm-II reverse transcriptase system	cDNA-Synthese	Promega, Madison, USA
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	Mykoplasmen PCR	PromoCell GmbH, Heidelberg
SYBR®-Green Master Mix	qPCR	Eurogentec, Seraing, Belgien
Protein		Hersteller
True Cut Cas9-Protein v2 (#A36497)		Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Tabelle 5: Kit-Systeme und Proteine

2.1.7 Oligonukleotide

Gen	Vorwärts <i>Primer</i>	Rückwärts <i>Primer</i>
SHOC2	GGTCTCGTTTCTCTTGAGGTTCT	TGGGAAGAGTGGTCAACTGG
SPRED1	GATGAGCGAGGAGACGGCGAC	GTCTCTGAGTCTCTCTCCACGGA
MORG1	TCTCACGGGCTATGAAGACG	TGAAGTGGTGTGCTTGGGTC
CaM	ACTTCATCAGCTTTCTATTAGGACT	GCAATCTGTTCTTCGGTCAGC
Erbin	TAGAAAAGAAGCATCCCCAGACAT	GCCCATCTGTCCATTACTCAA
FHL1	ACAATCCTGGCACGACTA	AAAATGGGAGAAAAGACG
HPRT1	AAGTGTTGGATACAGGCCAGA	GGCTTTGTACTTGGCTTTTCC
IQGAP1	TCCAATAAGATGTTTCTGGGAGAT	GATGATTTACCAATGGAAATGTA
KSR1	AGTTTCTCCAGCATGTCCATC	GAATGAAGCGTGTCTGACT
MP1	ACCAGGTGGTTCAATTTAATCG	CTTCAAACAATGGAGCAAGTTC
Paxillin	ACGTCTACAGCTTCCCCAACAA	AGCAGGCGGTCTGAGTTCA
SHP2	AAGGTTGGACAAGGGAATACGG	ACAATGAACGTCCCTGTCCG
CNK1	AAAGTGGACATGATCAGAAGAAGAAA TATG	GTTCTGTGGAGTCAGAGGTCAAGAT
IQGAP2	GTGTAGGAAGGAGTTGTGGCAA	AAACTCCATTCCGGAGCCCT
IQGAP3	GATGAGCAGAGCCGGCAGAAT	GAACCACGGAGGGTGCAAAAC
Guide RNA für CRISPR-Cas9-KO mit Produktname		Hersteller
IQGAP1	CRISPR1045365_SGM (#A35533)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Tabelle 6: Oligonukleotide

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Cell culture plates and dishes	TPP, Trasadingen, Schweiz
Cryo tubes VWR, Darmstadt	VWR, Darmstadt
Eppendorf tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf GmbH, Hamburg
Falcon tubes (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Handschuhe Nitra-Tex	Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Warrington, UK
Nitrozellulose Membran (0,45 µm pore size)	Roth, Karlsruhe
Stripette Costar	Corning Incorporated, Coming, USA
TC10 System Counting Slides Dual Chamber	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Transwell Corning Costar cell culture inserts TC treated	Merck, Darmstadt
Whatman Paper	VWR, Darmstadt

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

2.1.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Biacore X100 Plus	GE Healthcare, Freiburg
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Konfokales Mikroskop LSM-510	Zeiss, Jena
Konfokales Mikroskop LSM-550	Zeiss, Jena
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kühlschrank +4°C	Liebherr GmbH, Rostock
Gefrierschrank -20°C	Liebherr GmbH, Rostock
Heating Dri-block DB3	Techne, Staffordshire, UK
Heracell VIOS 250i CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Herasafe Cleanbench	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
INTAS iX imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Licor Odyssey Fc imager	Licor, Bad Homburg
Lonza 4D Nucleofector	Lonza, Basel, Schweiz
Mastercycler	Eppendorf GmbH, Hamburg
Milli-Q	Merck, Darmstadt

Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-RAD Laboratories GmbH, München
NanoDrop ND-2000	Peglab, VWR Lief Science Competence Center, Erlangen
pH Meter	WTW, Weilheim
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten 1000µl, 200µl, 20µl, 2,5µl	Eppendorf GmbH, Hamburg
Photometer	Eppendorf GmbH, Hamburg
Power pac 300	Bio-RAD Laboratories GmbH, München
Shaker KS15A	Edmund Bühler, Bodelshausen
Shaker Infors HT	Biotron Labortechnik GmbH, Hilden
TC 10 CellCounter	Bi-Rad Laboratories GmbH, München
Tecan infinite M200 PRO reader	Tecan, Crailsheim
Ultracentrifuge Optima Max-XP	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
UV spectrometer	Eppendorf GmbH, Lauda Königshofen
Zeiss Primovert microscope	Carl Zeiss GmbH, Göttingen
7500 REAL-time PCR System	Applied Biosystems, Warrington, UK

Tabelle 8: Geräte

2.1.10 Programme

Programm	Hersteller
Word	Microsoft, Redmond, USA
Excel	Microsoft, Redmond, USA
Image Studio Lite	Licor, Lincoln, USA
Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Prism 9	GraphPad, La Jolla, USA
Prism 10	GraphPad, La Jolla, USA
Zen 3.4 Blue edition	Carl Zeiss GmbH, Göttingen
CorelDRAW	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
EndNote 20	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA

Tabelle 9: Programme

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 RNA Extraktion

Der Arbeitsplatz wird mit RNase ZAP gereinigt. Alle Arbeitsschritte werden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. 3×10^6 Zellen werden in drei Zyklen mit PBS gewaschen, um das Rest Medium auszuwaschen. Im Anschluss werden 1 ml TRIzol™ hinzugegeben. 200 µl Chloroform werden hinzugegeben und sechs- bis siebenmal hin und her gedreht. Bei RT wird die Lösung für zwei bis drei Minuten stehen gelassen und im Anschluss für 15 min bei 1200 g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß pipettiert. Eiskalte 500 µl Isopropanol werden hinzugefügt und geschüttelt. Dies wird für zehn Minuten inkubiert. Im Anschluss wieder bei 1200 g zentrifugiert. Danach wird 1 ml eiskaltes 70%iges Ethanol dazugegeben und das Pellet durch Schütteln gelöst. Erneute Zentrifugation für 5 min. Der Überstand wird entfernt und bei Raumluft trocknen gelassen. Bei komplett trockenem Zustand werden 40 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben. Mittels Spektrophotometrie (Nanodrop) wird die Konzentration bestimmt. Die RNA wird dann unmittelbar durch cDNA-Synthese in cDNA umgeschrieben.

2.2.1.2 cDNA-Synthese

DNase behandelte RNA wird in die komplementäre DNA (cDNA) transkribiert mittels reverser Transkriptase Polymerasenkettenreaktion mit dem ImProm-II reverse transcriptase system (Promega, USA) anhand des dazugehörigen Protokolls.

Mittels Nanodrop wird die Konzentration der cDNA bestimmt und in eine feste Konzentration verdünnt.

2.2.1.3 qPCR

Zuerst wird ein Mastermix erstellt mit 10 µl SYBR-Green, je 1 µl 10 µmol *Forward* und *Reverse Primer*, 6 µl Wasser, um ein Gesamtvolumen von 18 µl für jedes verwendete *well* zu erhalten. In einer 96-*well*-Platte werden je 18 µl Mastermix gegeben sowie 2 µl cDNA (50 ng). Es gibt je 3 *wells* mit dem gleichen Inhalt, um ein Triplikat zu untersuchen. Neben den zu untersuchenden Genexpressionen wird auch für jede zu untersuchende Zellvariante ein Triplikat auf ein Referenzgen untersucht, um sie untereinander vergleichbar zu machen. Außerdem wird ein Triplikat ohne cDNA untersucht als *Non-template control* (NTC).

Im Anschluss wird die 96-*well*-Platte mit einem durchsichtigen und klebenden Plastik verschlossen. Die Proben werden kurz auf den Boden der *wells* zentrifugiert. Die fertige Platte wird in das Applied Biosystems 7500 Real-time PCR-Instrument gestellt. Dort durchläuft es 35 Zyklen mit den Einstellungen: 60°C in der Annealing 95°C in der Denaturierungsphase, 72°C in der Elongationsphase. Im Programm Applied Biosystems

7500 Real-Time PCR System wird der ΔC_t -Wert und die Schmelzkurve angezeigt und analysiert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) (Shapiro et al., 1967, Laemmli, 1970) wird durchgeführt, um Proteinen analytisch aufzutrennen anhand ihres Molekulargewichts. Die aufzutrennenden Proteine liegen ohne Quartär-, Tertiär- oder Sekundärstruktur, also denaturiert als ellipsoide Strukturen vor. Dies wird durch den Laemmli-Probenpuffer erreicht. Die Proben werden versetzt mit 5-fach Laemmli-Probenpuffer und zunächst für einige Minuten bei 95°C vollständig denaturiert. Der Probenpuffer enthält das Detergenz SDS. Es trennt intra- und intermolekulare Wechselwirkungen auf, indem es an die Proteine bindet. Außerdem besitzt das SDS eine negative Kopfgruppe, welches die Eigenladung der Proteine maskieren kann. Somit wird gesichert, dass ein fast konstantes Verhältnis von Ladung und Molekulargewicht erreicht wird. Dies führt dazu, dass Eigenladungen der Proteine vernachlässigbar werden. Dem Puffer werden Reduktionsmittel beigesetzt (β -Mercaptoethanol, DTT oder DTE) welches für die Spaltung der Disulfidbrücken verantwortlich ist. Durch die Verwendung des Laemmli-Puffers und den Molekularsiebeigenschaften des Polyacrylamidgels sind die relativen Mobilitäten der Proteine umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts.

Die Herstellung der Gele wird mit dem in **Tabelle 10.** gezeigten Rezept durchgeführt. Je höher die Prozentzahl an Acrylamid, desto langsamer werden die Proteine aufgetrennt und somit sind auch kleinere Proteine besser aufzutrennen. Die Co-Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid wird durch eine radikalische Kettenreaktion mit Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator bewerkstelligt. Bevor die denaturierten Proteine durch das Trenngel laufen, durchlaufen sie in dem diskontinuierlichen SDS-PAGE, ein grobporiges Sammelgel, um eine Schärfung der Proteinbanden zu erzeugen.

Die Proteinproben werden in die Taschen gefüllt, sowie in eine Tasche eine Proteinleiter (PageRuler von Thermo Fisher Scientific), um das Molekulargewicht ablesen zu können. Dann wird zuerst bei 70 V die Ionen im Sammelgel zu sortieren, damit sie zusammen in das Trenngel eintreten. Anschließend durchlaufen die Banden das Trenngel bei 100 V.

Lösung	Sammelgel	7,5% Trenngel	10% Trenngel	12,5% Trenngel	15% Trenngel
H ₂ O	1,25 ml	1,5 ml	1 ml	0,5 ml	-
Acrylamid-lösung	0,3 ml	1,5 ml	2 ml	2,5 ml	3 ml
Trenngelpuffer	-	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Sammelgelpuffer	1,5 ml	-	-	-	-
10% (w/v) APS	20 µl	45 µl	45 µl	45 µl	45 µl
TEMED	10 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Tabelle 10: Rezepte Gele für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.2.2.2 Western Blot

Aufgetrennte Proteine werden aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert entlang eines elektrischen Gefälles.

Semidry Blotting:

In die Vorrichtung des Trans-Blot Turbo Transfer Systems (BioRad, München) werden drei in Transferpuffer (20% Methanol) eingeweichte Whatman Paper (VWR, Darmstadt) gelegt. Darauf in Transferpuffer (20% Methanol) eingeweichte Nitrozellulose Membran (Roth, Karlsruhe) gelegt, dann das SDS-Gel und zum Schluss wieder 3 eingeweichte Whatman Paper. Der Transfer findet statt bei 100 V über 30min.

Wet Blotting:

Für den Transfer von kleinen Proteinen wird das *Wet-blotting* Verfahren verwendet. Das SDS-Gel mit Nitrozellulose Membran zwischen 3 Whatman Paper (VWR, Darmstadt) auf jeder Seite eingespannt und in eine Kammer Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-RAD Laboratories GmbH, München) mit einem Liter Transferpuffer (10% Methanol). Der Transfer wurde für 40 Minuten bei 100 V durchgeführt

2.2.2.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Immunoblotting)

Nach dem Transfer von den Proteinen auf eine Nitrozellulose Membran, werden die Membranen geblockt mit 1 ml Odyssey blocking solution (Licor) und 2 ml TBS über 1 h. Primärantikörper werden in 1 ml Odyssey blocking solution (Licor) und 2 ml TBST verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend wird die Nitrozellulose Membran dreimal für je 5 Minuten mit TBS-T gewaschen.

Daraufhin werden die Sekundärantikörper in 1ml Odyssey blocking solution (Licor) und 2ml TBS-T verdünnt und auf die Membranen gegeben und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die *Blots* werden mithilfe Licor Odyssey Fc imager visuell aufgenommen und mit dem Programm Image Studio lite analysiert. Die Aufnahmen des *Western Blots* können getrennt in den zugehörigen Farbkanälen des Sekundärantikörpers geöffnet werden. Mittels des *Rectangle tools* wird die *Region of Interest* (ROI) festgelegt. Die Signalstärke kann dann relativ zum Hintergrund bestimmt und als Wert notiert werden.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Zellkultivierung

Alle eukaryotischen Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

CAPAN1 in IMDM (Lonza, Basel, Schweiz oder Gibco, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) mit 20% FBS (Life Technology, Darmstadt) und 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technology, Darmstadt)

SW480 und HEK293 in DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) mit 10% FBS (Life Technology, Darmstadt) und 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technology, Darmstadt).

2.2.3.2 Auftauen von Zellen

Kryoepipis werden aus dem Flüssigen Stickstoff genommen und unter Schwenken im warmen Wasserbad aufgetaut. Sobald die Suspension mit Zellen aufgetaut ist, wird sie in 15 ml Medium resuspendiert und in ein 50 ml Falcon gegeben. Anschließend wird für drei Minuten bei 1200 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert und auf eine Platte gegeben. Über Nacht werden die Zellen inkubiert und am nächsten Tag wird das Medium gewechselt.

2.2.3.3 Passagieren von Zellen

Sobald die Zellen ca. 80% Konfluenz erreicht haben, müssen sie passagiert werden, in neue Schalen oder Flaschen übertragen werden. Zuerst wird der Überstand abgesaugt. Daraufhin einmal mit PBS -/- gewaschen. Danach wird 2-5 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben (Life Technology, Darmstadt) und für 5-10 min bei 37°C inkubiert. Sobald die adhären Zellen vom Boden abgelöst sind, wird mindestens das doppelte an Medium dazugegeben, um Trypsin zu hemmen. Die Zellen werden aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und für 3 min bei 1200 g zentrifugiert. Der Überstand über dem Zellpellet wird abgesaugt und die Zellen in neuem Medium resuspendiert. Die Zellen werden in neuer Schale oder Flasche in niedrigerer Konzentration ausgesät.

2.2.3.4 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl an gebrauchten Zellen wird durch den automatisierten Zellzähler TC10 (BioRad) ermittelt. Dafür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypan Blau vermischt und in TC10 System Zählobjektträger geladen.

2.2.3.5 Kryokonservierung von Zellen

Zellen in Kultur werden einmal mit PBS +/- gewaschen und trypsinisiert wie unter „Passagieren von Zellen“ beschrieben. Das Zellpellet wird in einer vorher vorbereiteten Lösung resuspendiert und in ein Kryoeppi gefüllt. Lösung besteht aus 70% FBS, 20% Medium und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). Pro eine 10cm Schale Zellen wird ein Milliliter Lösung verwendet. In einem Eppi wird ein Milliliter Lösung mit resuspendierten Zellen gegeben. Die Eppis werden anschließend in eine Box (Nalgene™ Cryo 1°C freezing container) getan mit Isopropanol. Die Zellen frieren somit kontrolliert im -80°C Gefrierschrank ein.

2.2.3.6 Zellyse

Für die Lyse von adhärenenten Zellen wird zuerst das Medium entfernt und die Zellen mit PBS +/- gewaschen. Anschließend werden die Zellen in der Schale mit FISH-Puffer lysiert. Daraufhin werden die Zellen mit einem Zellschaber aus Gummi von der Platte gelöst und in ein Eppi übertragen. Die Zell-Puffermischung bleibt auf Eis für 15 Minuten und das Eppi wird mehrfach in diesem Zeitraum gevortext. Im Anschluss wird das Lysat für zehn Minuten bei 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand ist das fertige Zelllysate, welches in ein neues Eppi gegeben wird.

2.2.3.7 Proliferations-Assay

Es werden $5 \cdot 10^3$ Zellen pro Well in 96-Well Platten ausgesät. Zu dem Zeitpunkt wenn gemessen werden soll, wird 20 µl Cell-Titer Blue (Promega, Madison, USA) in das Medium hinzugegeben und die Fluoreszenz bei 560 / 590 nm im Tecan infinite M200 PRO reader gemessen. Die Zellen werden in den Inkubator gestellt und nach 2 h erneut die Fluoreszenz gemessen. Der Unterschied in Fluoreszenz ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen.

2.2.3.8 Migrations-Assay

Es werden $1,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in einer 12-Well Platte ausgesät und bis knapp 100% Konfluenz anwachsen lassen. Dann wird mit Hilfe einer 200 µl Pipettenspitze ein Kreuz in den Zellteppich geritzt.

Lichtmikroskopisch werden Bilder gemacht zu den Zeitpunkten 0 h, 3 h, 6 h, 9 h und 24 h. Der Abstand zwischen den Rändern des *Scratches* wird mit dem Programm CoreDraw gemessen und mit dem Zeitpunkt 0 h verglichen. Die Analyse wird mithilfe der Programme Excel und Prism 10 durchgeführt.

2.2.3.9 Stimulation-Assay

Es werden $2,5 \cdot 10^5$ Zellen in 6-Well Platten ausgesät und anwachsen lassen. Am nächsten Tag werden die Zellen mit PBS -/- gewaschen und mit dem entsprechenden Medium ohne Zusatz von fetalen Kälberserum über Nacht inkubiert (*Starving*). Im Anschluss wird die gewünschte Konzentration eines Stimulus, bspw. Insulin, auf die Zellen gegeben. Nach der gewünschten Zeit wird das Medium abgesaugt und einmal mit PBS -/- gewaschen und wie beschrieben lysiert.

2.2.3.10 CRISPR-Cas9

Die sgRNA wird in 15 µl Wasser suspendiert. 82 µl der Nucleofection Lösung und 18 µl der *Supplement* Lösung von Lonza werden mit 1 µl (5mg/ml) Cas9 Protein von Thermo Fisher Scientific und 2 µg sgRNA gemischt und für 30 min inkubiert. Es werden eine Millionen Zellen in der fertigen Lösung resuspendiert. Im Anschluss wird eine Elektroporation am Gerät Lonza 4D Nucleofector durchgeführt. Es werden die Zellen nach der Elektroporation mit vorgewärmtem Medium vermischt und über Nacht inkubiert.

2.2.3.11 Konfokale Mikroskopie

Jeweils 20 000 Zellen werden in 24-well Platten gegeben und über Nacht inkubiert, damit sie anwachsen. Das Medium wird am nächsten Tag entfernt und die Zellen einmalig mit PBS +/- gewaschen. Im Anschluss wird 1 ml 4% PFA hinzugegeben und für 20 min inkubiert. Danach wird mit PBS +/- einmalig gewaschen und danach 500 µl 0,25% Triton X-100 hinzugefügt und für 5 min stehen gelassen. Im Anschluss wird ein weiteres Mal mit PBS +/- gewaschen und danach 500 µl 3% BSA in 0,25% Triton X-100 in PBS ein bis 2 h bei Raumtemperatur und langsamen Schwenken gelassen. Die Lösung wird entfernt. Über Nacht werden die Zellen mit 3 ml 1% BSA und dem primären Antikörper inkubiert. Am darauffolgenden Tag werden die Zellen dreifach mit PBS-/- gewaschen und im Anschluss zwei Stunden bei Raumtemperatur und 150 µl sekundären Antikörper inkubiert.

Die konfokale Mikroskopie wird dann mit dem Zeiss Mikroskop LSM 510 oder 550 durchgeführt. Die Bilder werden mittels des Programms Zen 3.4 Blue edition verwertet.

3. Resultate

3.1 RNA-Expression akzessorischer Proteine des RTK-RAS-MAPK-Signalwegs

Es wurden verschiedene bekannte akzessorischen Proteine des RTK-KRAS-MAPK-Signalwegs ausgesucht und Primer bestellt. Mittels qPCR wurde dann die RNA-Expression festgestellt. Hierfür wurden nur die Zelllinien CAPAN1 sowie SW480 verwendet, da diese eine KRAS(G12V)-Mutation aufweisen und die Expression bei diesen Zelllinien zur Auswahl eines Proteins für die weiteren Untersuchungen in der ersten Phase des Projektes am wichtigsten waren. Als Referenzgen wurde hier die Expression von Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) gewählt. Alle Daten als technisches Triplikat.

Die Resultate sind der **Abb. 4** zu entnehmen. Hier konnten alle untersuchten Proteine auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. IQGAP1 zeigte die höchste Expression in beiden Zelllinien.

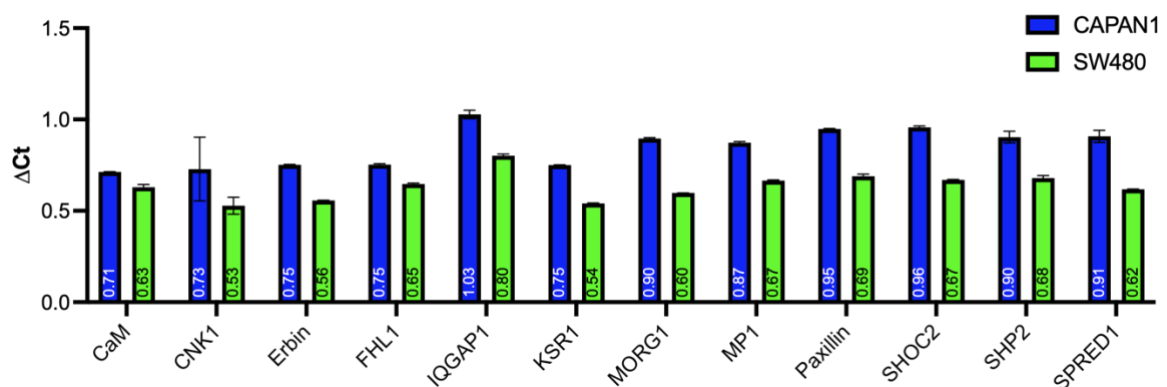


Abb. 4: Vergleich der RNA-Expressionen verschiedener akzessorischer Proteine in den Zelllinien CAPAN1 und SW480. Hier wurde der ΔC_t -Wert (*cycle threshold*) der einzelnen Proteine dargestellt, verglichen mit dem C_t -Wert des Referenzgens HPRT1. Primer sind Tabelle 6 zu entnehmen. Durchgeführt in zwei Zelllinien (CAPAN1 in blau; SW480 in grün) und vergleichend dargestellt. Die Balken zeigen den Mittelwert eines technischen Triplikats $\pm$ Standardabweichung.

3.2 Western Blot Expressionsanalysen verschiedener Akzessorischer Proteine

Zur weiteren Expressionsanalysen wurden Laemmli-Proben der Zelllinien CAPAN1 sowie SW480 mittels *Western Blot* und *Immunblotting*nachweis auf die Expression der Proteine CNK1, FHL1, IQGAP1, SHP2, SHOC2 und SPRED1 untersucht. Die Auswahl der Proteine stützte sich auf den Ergebnissen der qPCR-Analyse sowie der Verfügbarkeit von Antikörpern. Die Antikörper konnten so auch auf dessen Funktion geprüft werden. Als Referenzgen wurde hier Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Resultate in **Abb. 5**. Eine ausreichende Expression ist nur für die Proteine IQGAP1 sowie SHOC2 zu sehen. SHP2 wies eine niedrige Expression laut *Western Blot* Analyse in beiden Zelllinien auf. Die anderen, untersuchten Proteine waren teils nur in einer der untersuchten Zelllinien nachweisbar mit den vorhandenen Antikörpern.

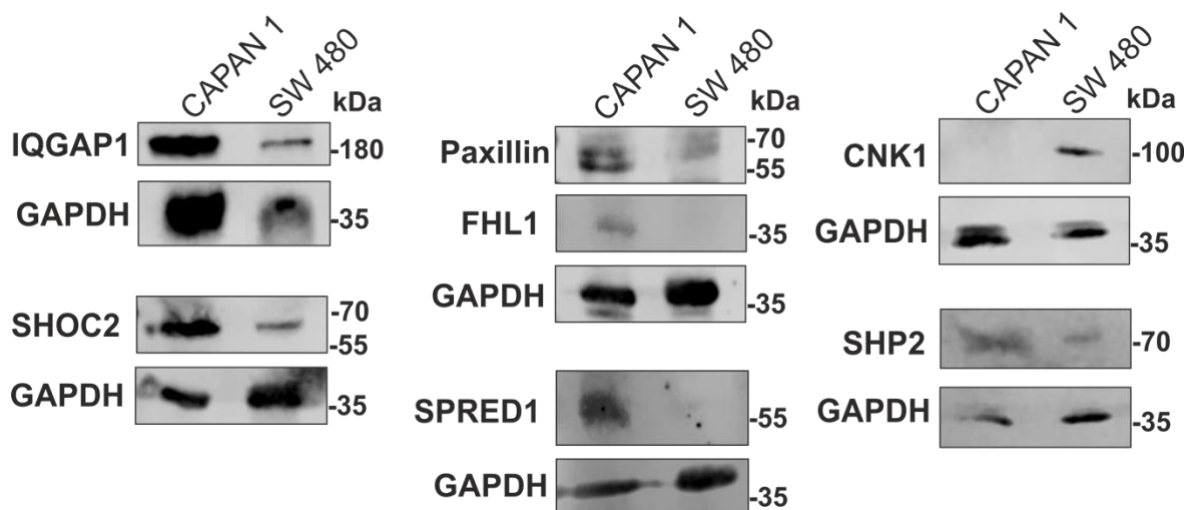


Abb. 5: Western Blot Analyse verschiedener akzessorischer Proteine. Zu sehen sind die Ergebnisse der Analyse für die beiden Zelllinien vergleichend nebeneinandergestellt. Das zugehörige Referenzprotein (GAPDH) ist unter den Proteinen zu sehen. Es wurden je 20 µg Zelllysate geladen. Antikörper sind Tabelle 3 zu entnehmen.

3.3 Mykoplasmen-PCR

Alle drei Zelllinien (CAPAN1, HEK293 und SW480) wurden mehrfach mit und nach Anweisungen des Kits von PromoKine aus Heidelberg PCR Mycoplasma Test Kit I/C auf Mykoplasmenverunreinigungen untersucht und es konnte keine Kontamination festgestellt werden.

3.4 Knockout-Validierung mittels Western Blot

Zur Untersuchung der Rolle eines akzessorischen Proteins wurde ein *Knockout* (KO) mittels CRISPR-Cas9 des Proteins IQGAP1 durchgeführt. Nach Durchführung des *Knockouts* wie im Methodenteil beschrieben, wurde eine Validierung des *Knockouts* mittels *Western Blot* und Immunoblot-Verfahren durchgeführt. Dafür wurde im Falle von CAPAN-1 Laemmli-Proben vom Wildtyp CAPAN1, Zelllysate in Laemmli der Zellen nach CRISPR-Cas9-Durchführung, sowie Zelllysate in Laemmli weiterer Zelllinien verglichen. Für alle Spuren des Blots wurden 20 µg-Protein geladen, wenn nicht anders angegeben. Für HEK293 und SW480 wurden nur wildtypische und behandelte Zellen als Lysate in Laemmli verglichen.

Wie in **Abb. 6** zu sehen konnte in allen drei Zelllinien eine polyklonale Zellpopulation nach *Knockout* validiert werden. Im Vergleich beider Zellpopulation der jeweiligen Zelllinie wiesen die behandelten Zelllinien eine Expression von IQGAP1 von <10% auf im Vergleich zu den wildtypischen Zellen

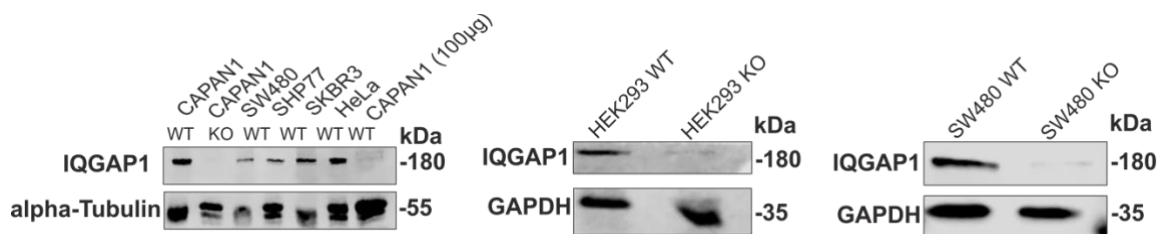


Abb. 6: Knockout-Validierung auf Proteinebene: 20 µg von Laemmli-Proben der Zelllysate (wenn nicht anders angegeben) mit oder ohne *Knockout* wurden geladen und dann mit IQGAP1-Antikörper und dem Referenzgen (links: alpha-Tubulin für CAPAN1; Sonstige: GAPDH für mittig HEK293 und rechts SW480) analysiert. Antikörper sind Tabelle 3 zu entnehmen.

3.5 Knockout-Validierung mittels qPCR

Zur weiteren Validierung des *Knockouts* wurde eine qPCR-Analyse vergleichend beider Zellpopulation jeder Zelllinie durchgeführt. Dafür wurde die gleiche Anzahl an Zellen verwendet für die RNA-Extraktion. Anschließend wurde die RNA mittels cDNA-Synthese zu DNA umgeschrieben. Die DNA wurde für die qPCR-Analyse verwendet. Neben der KO-Validierung wurden die Proben auch auf die Isoform von IQGAP1, IQGAP2 und IQGAP3, untersucht, um herauszufinden, ob eine Hochregulierung nach Verlust von IQGAP1 stattfand. Außerdem sollte ausgeschlossen werden, dass die Isoformen durch die Behandlung mit CRISPR-Cas9 ausgeknockt wurde.

Wie in **Abb. 7** zu sehen, zeigte sich in den Ergebnissen der KO-Zellen eine auf das Referenzgen HPRT1 normalisierte signifikant erniedrigte Expression von IQGAP1 im Vergleich zu WT-Zellen in CAPAN1. Bei der Isoform IQGAP3 zeigte sich kein Expressionsunterschied zwischen den KO- und WT-Zellen in den untersuchten Zelllinien CAPAN1, HEK293, SW480. Die Ergebnisse für IQGAP2 waren teilweise undefiniert oder zeigten einen Ct-Wert >35 in KO- und WT-Zellen.

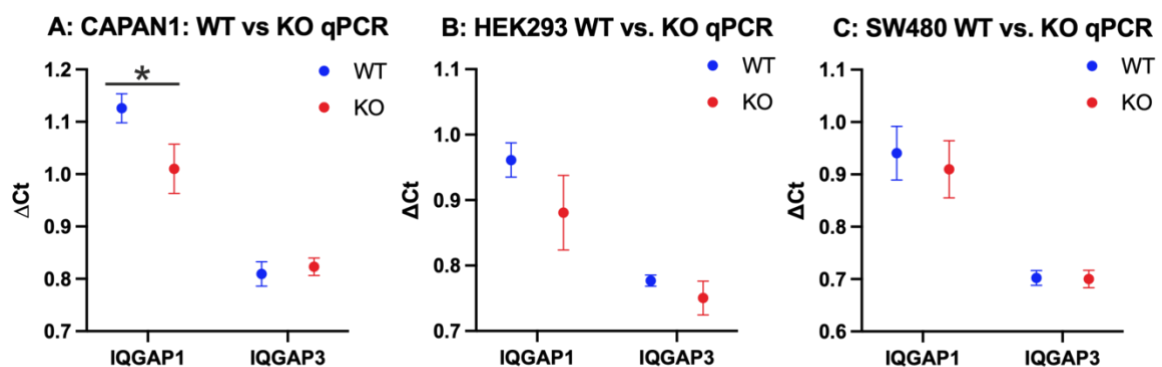


Abb. 7: Knockout-Validierung qPCR: Die Proben von WT- und KO-Zellen wurden quantitativ auf IQGAP1-, IQGAP2-, IQGAP3- und dem Referenzgen HPRT1-RNA untersucht. Dargestellt sind die Δ Ct-Werte für IQGAP1, IQGAP3 in den Zelllinien, A: CAPAN1, B: HEK293 und C: SW480 (jeweils WT: blau, KO: rot), im Vergleich zum Referenzgen HPRT1 als Durchschnitt des technischen Triplikats $\pm$ Standardabweichung. Es zeigte sich nur bei CAPAN1 eine signifikant niedrigere Expression von IQGAP1. IQAP3 war in den untersuchten Zelllinien nicht signifikant verändert. Signifikanz mittels Welch-t-Test ermittelt ($p < 0.05$: *). Primer sind Tabelle 6 zu entnehmen.

3.6 IQGAP1-Knockout-Validierung mittels konfokaler Mikroskopie und IQGAP1 kolokalisiert mit Aktin zellgrenznah

Wie im Methodenteil beschrieben wurde eine immunzytochemische Untersuchung der Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich kaum nachweisbare IQGAP1 Proteine in der Probe der KO-Zellen. In **Abb. 8** zu sehen konnte IQGAP1 in WT-CAPAN1-Zellen gut nachgewiesen werden, kolokalisierend mit Aktin. In KO-Zellen sah man fast kein Signal.

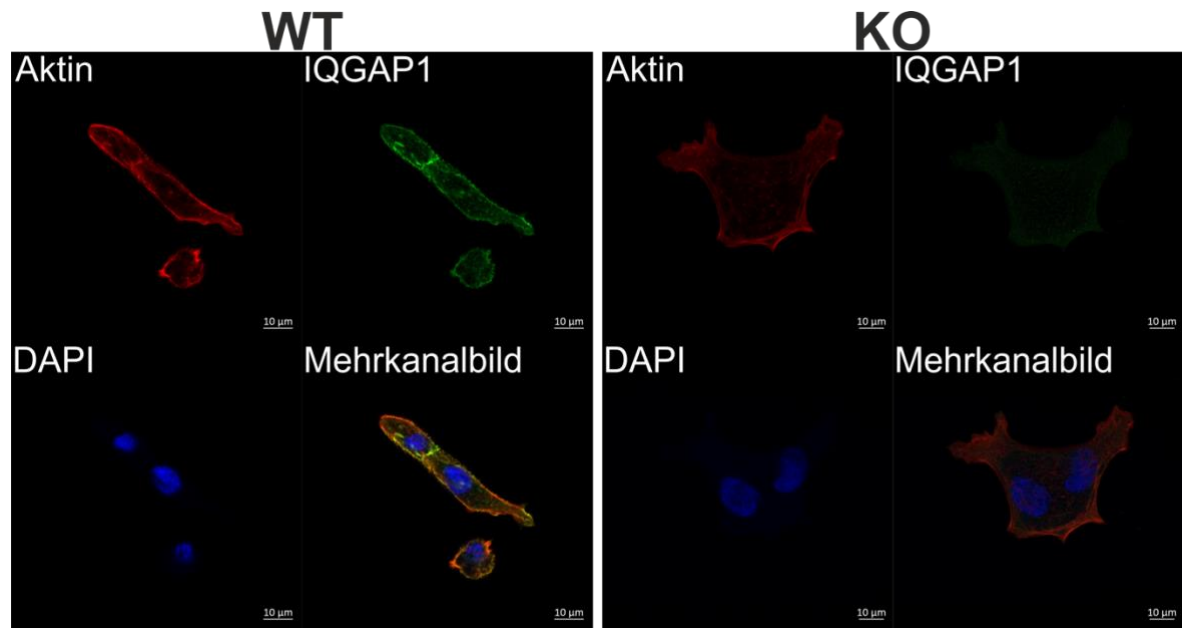


Abb. 8: Knockout-Validierung und Lokalisation von IQGAP1: Mittels konfokaler Mikroskopie wurde IQGAP1 (grün), Aktin (rot) angefärbt, sowie DAPI (blau) zur Darstellung der DNA in WT und KO-CAPAN1-Zellen benutzt. Gleiche Einstellungen der Farbkanäle wurden im Programm Zen 3.4 Blue edition verwendet. Jeweils eine repräsentative Zelle wurde für den WT und KO ausgesucht. Die verschiedenen Farbkanäle wurden einzeln dargestellt und zusammengeführt (Mehrkanalbild). Antikörper sind Tabelle 3 zu entnehmen. Größenangabe unten rechts 10 µm.

3.7 IQGAP1-Knockout hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate von CAPAN1-Zellen

Es wurden je 5 000 WT- und KO-CAPAN1-Zellen in einer 96-well Platte ausgesäht. 6h später wurde zu je 3 wells je 20 µl CellTiter-Blue hinzugegeben. Im Gerät Tecan infinite M200 PRO reader wurde die Fluoreszenz zum Zeitpunkt null gemessen. Nach 2h wurde eine weitere Messung vorgenommen. Für 7 Tage wurde jeden Tag je 3 weitere wells in gleicher Weise untersucht.

Wie in **Abb. 9** zu sehen ergab sich kein signifikanter Unterschied in Proliferation zwischen WT- und KO-Zellen.

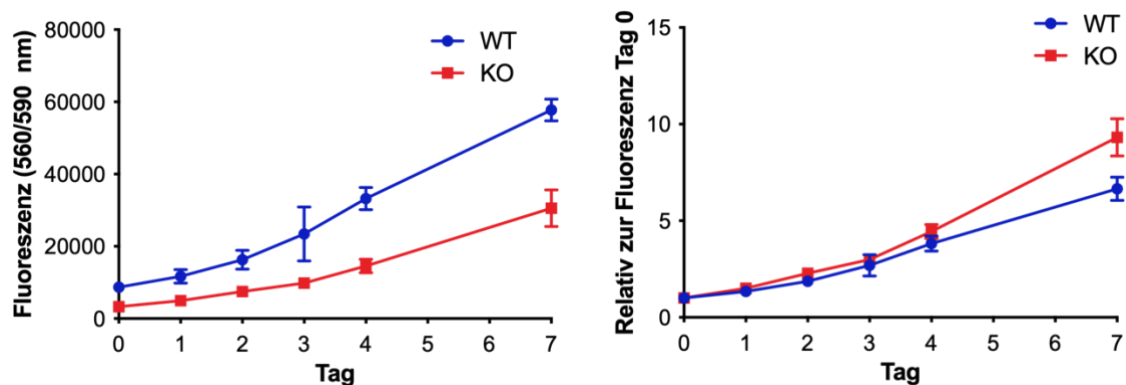


Abb. 9: Proliferations-Analyse: Je 5 000 Zellen wurde in eine 96-well Platte gegeben und die Veränderungen der Fluoreszenz mit CellTiter®-Blue über die Zeit graphisch dargestellt. Links in absoluten Zahlen der Fluoreszenz und rechts relativ zu Tag 0. Wildtypische CAPAN1-Zellen in blau, KO-Zellen in rot. Beide zeigen den Durchschnittswert des technischen Triplikats $\pm$ Standardabweichung

3.8 IQGAP1 *Knockout* hat keinen Einfluss auf die Migration in CAPAN1-Zellen

Die gleiche Menge an Zellen wurden in je ein *well* einer 12-*well*-Platte gegeben und gewartet bis sich ein geschlossener Zellteppich bildete. Ein standardisiertes Kreuz wurde in den Zellteppich geritzt. Unter dem Mikroskop wurde zur verschiedenen 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, und 24 h ein Foto gemacht und der Abstand, der durch das Ritzen entstanden ist gemessen. Graphisch wurde dann dargestellt, wie schnell sich dieser Abstand verringerte, um die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen darzustellen.

Es zeigte sich, wie in **Abb. 10** zu entnehmen, kein signifikanter Unterschied in der Migrationsfähigkeit zwischen den IQGAP1 WT- und KO- CAPAN1-Zellen.

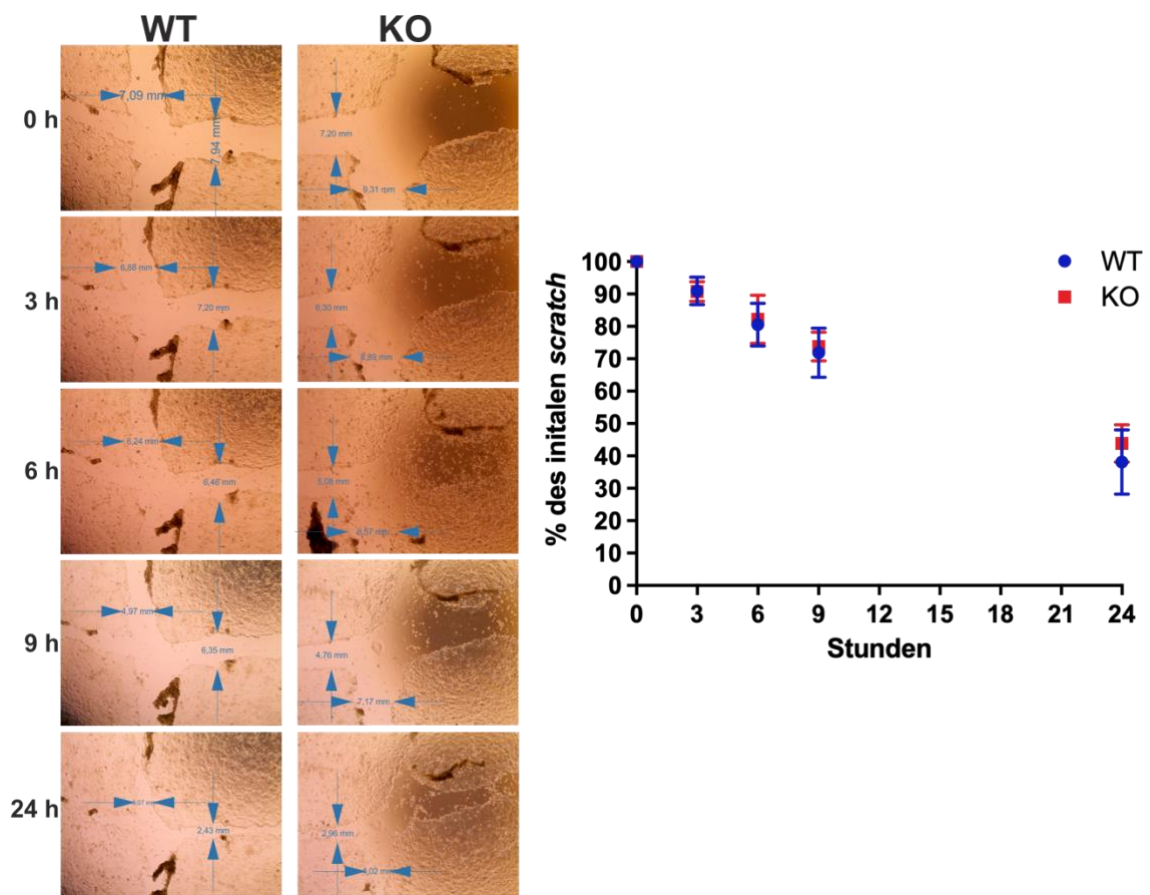


Abb. 10: Scratch Assay: Links die mikroskopischen Bilder der *Scratches* mit eingetragener Breite mit Angabe der Zeit seit dem *Scratch* der WT- und KO-Zellen. Rechts die graphische Darstellung des technischen Triplikats mit $\pm$ Standardabweichung. Wildtypische CAPAN1-Zellen in blau, KO-Zellen in rot.

3.9 IQGAP1 *Knockout* führt zu einer erhöhten Phosphorylierung von AKT an den Phosphorylierungsstellen T308 und S473 in CAPAN1-Zellen

Die gleiche Anzahl an *Knockout* und wildtypischen CAPAN-1 Zellen wurden ausgesät in 10 cm Platten und über Nacht anwachsen lassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden per Gelelektrophorese mit einer Proteinleiter getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran mittels *Western Blot* übertragen. Im Anschluss wurden die Proteine wie in **Abb. 11** mittels *Immunoblotting* nachgewiesen. Die Banden mittels Image Studio lite analysiert und im Anschluss die Aktivität bestimmt, indem die Stärke des Signals der phosphorylierten Proteine mit der Gesamtstärke des Proteins verglichen wurde. Dieser Anteil an phosphorylierten Anteil der Proteine konnte dann zwischen den KO- und WT-Zellen verglichen werden. Dieses Experiment wurde technisch tripliciert.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied am Anteil von phosphorylierten Proteinen bei STAT3, YAP und ERK. Jedoch zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen beim Anteil der phosphorylierten Proteine an beiden Phosphorylierungsstellen des Proteins AKT.

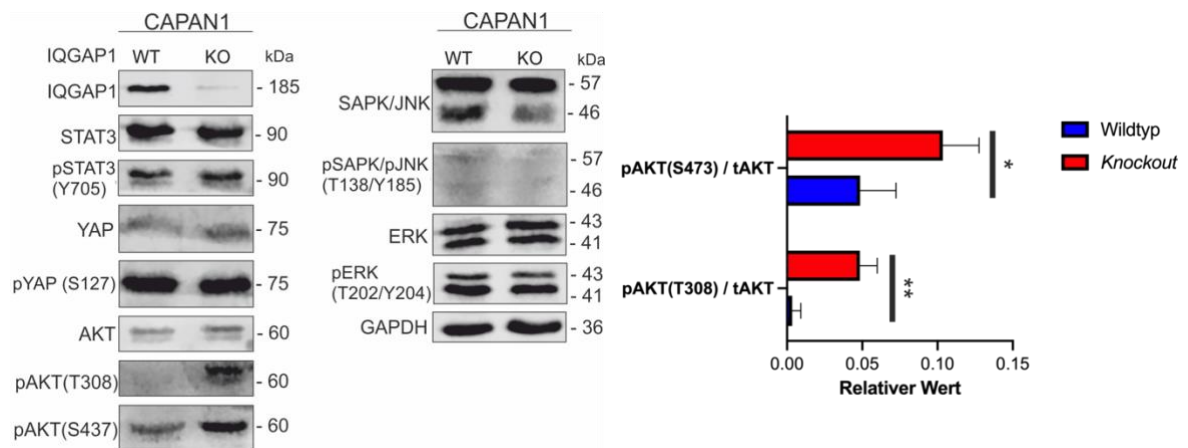


Abb. 11: Western Blots der Phosphorylierung von Proteinen verschiedener Signalwege: Links eine repräsentative Darstellung der *Western Blot* Ergebnisse. Rechts statistische Auswertung des technischen Triplikats des Grades der Phosphorylierung an AKT-Phosphorylierungsstellen verglichen zwischen den WT- (blau) und KO-Zellen (rot) $\pm$ Standardabweichung und Signifikanz (durch t-Test ermittelt $\rightarrow$ $p < 0.05$: * und $p < 0.01$: **). Antikörper sind Tabelle 3 zu entnehmen.

4. Diskussion

IQGAP1 ist ein großes Protein mit über 100 Interaktionspartnern und ist somit in vielen Prozessen und Signalwegen involviert (Smith et al., 2015). KRAS ist eines der am häufigsten mutierten Onkogenen und ist in seiner Funktion nicht nur auf die wichtigsten Signalproteine, sondern auch auf akzessorische Proteine angewiesen, welche die Signalkaskaden beeinflussen. Um die Rolle und den Einfluss des akzessorischen Proteins IQGAP1 auf KRAS mutierte Zellen zu untersuchen, wurde in dieser Dissertation ein *knockout* mittels CRISPR-Cas9 in den Zelllinien CAPAN1, SW480 und HEK293 durchgeführt. Es entstanden stabile, polyklonale IQGAP1-KO Zellen. In CAPAN1 konnte dann die Kolokalisation von IQGAP1 mit Aktin gezeigt werden, jedoch kein signifikanter Einfluss auf Migration oder Proliferation. Die Untersuchung verschiedener RAS-abhängiger Signalwege in CAPAN1 zeigte eine signifikant erhöhte Phosphorylierung von AKT an beiden Phosphorylierungsstellen, T308 und S473, was auf eine gesteigerte AKT-Aktivität hinweist. Zur gleichen Zeit zeigte sich interessanterweise keine signifikante Änderung in der Aktivität anderer untersuchter Signalwegen.

Zu Beginn des Projekts wurde die Expression einer großen Bandbreite an akzessorischen Proteinen mittels qPCR untersucht. Die Proteine, die eine gute Expression in beiden KRAS-mutierten Zelllinien, CAPAN1 und SW480, zeigten, wurden dann mittels *Western Blot* auf Proteinebene untersucht. Hier zeigten sich schon interessanterweise sehr unterschiedliche Expressionen der akzessorischen Proteine vergleichend in beiden Zelllinien. Hier stellt sich die Frage, wie diese akzessorischen Proteine gewebespezifisch reguliert werden.

Es wurde sich dann für den KO des Proteins IQGAP1 entschieden, da die Expression des Proteins in beiden Zelllinien, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, hoch war und die Qualität der Primer und des AK waren gut. Außerdem wurden in der Arbeitsgruppe schon verschiedene Domänen des Proteins untersucht und somit konnte auf schon vorhandenes Wissen zurückgegriffen werden (Mosaddeghzadeh et al., 2022). Des Weiteren wurde die Funktion und Relevanz von IQGAP1 als Gerüstprotein der RAF-MEK-ERK-Kaskade noch nicht eingehend untersucht.

Der polyklonale Knockout konnte in den Zelllinien CAPAN1, SW480 und HEK293 auf Proteinebene bestätigt werden. Auf mRNA-Ebene zeigte sich jedoch nur eine leicht verringerte Expression von IQGAP1. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass der CRISPR-Cas9-Knockout zu Frameshift-Mutationen oder vorzeitigen Stopp-Codons führt. Dadurch wird zwar weiterhin eine fehlerhafte mRNA transkribiert, jedoch kein funktionelles Protein mehr synthetisiert. Dies könnte daran liegen, dass entweder der Nonsense-Mediated Decay (NMD) ineffizient wirkt oder ein verkürztes, instabiles Protein entsteht, das rasch abgebaut oder vom verwendeten Antikörper nicht erkannt wird. Des

Weiteren konnte eine kompensatorische Erhöhung der Expression der Isoform IQGAP3 mittels qPCR nicht nachgewiesen werden, während die Ct-Werte für IQGAP2 entweder undefiniert blieben oder >35 lagen. Somit ist die Expression von IQGAP2 in diesen Zelllinien entweder vor und nach dem KO fast nicht nachweisbar, oder das Primerpaar funktionierte nicht. Obwohl alle Isoformen ähnlich aufgebaut sind, üben sie verschiedene Funktionen aus. IQGAP2 ist stark in Leberzellen exprimiert und es zeigte sich, dass es die Funktion eines Tumorsuppressors in hepatozellulären Karzinome einnimmt (White et al., 2009, Schmidt, 2012). IQGAP1 und IQGAP3 weisen, im Gegensatz dazu, eine positive Korrelation mit der Tumorigenese auf (Song et al., 2023, White et al., 2009).

Die Rolle von IQGAP1 in MAPK- und PI3K-AKT-Signalwegen ist besonders interessant in den Zellen mit konstitutiv aktivem KRAS. Während die direkte Interaktion von IQGAP1 mit KRAS noch unklar ist (Matsunaga et al., 2014, Morgan et al., 2019), ist IQGAP1 ein Gerüstprotein für die MAP-Kinasen. Wir fanden durch IQGAP1-KO in CAPAN1-Zellen eine unveränderte ERK-Phosphorylierung, aber eine vermehrte Phosphorylierung an beiden Phosphorylierungsstellen AKT(T308) und AKT(S473).

In einer Studie konnte in IQGAP1-KO Mäusen eine erniedrigte ERK- und AKT-Phosphorylierung in Kardiomyozyten nach Stress im Vergleich zu wildtypischen Mäusen gezeigt werden (Sbroggio et al., 2011b). Die Unterschiede aus diesem Modell und unseren Ergebnissen könnte damit erklärt werden, dass IQGAP1 ein Bestandteil des Melusin-Komplexes ist, welcher MAPK bindet und so ERK-Aktivierung als Antwort auf eine Drucküberlastung bewerkstelligt (Sbroggio et al., 2011a). Dies tritt jedoch nicht in der *in vitro* Kultivierung unserer KO-Zellen auf. Außerdem unterstützt wird diese These weiter damit, dass unter normalen Umständen die ERK- und AKT-Phosphorylierung sich nicht in IQGAP-KO Kardiomyozyten im Vergleich zu Wildtypen unterschiedlich zeigte (Sbroggio et al., 2011b).

Li et al. hat 2019 eine erniedrigte ERK-Phosphorylierung und keine Änderungen der Phosphorylierung von AKT in CAPAN1- und PANC1-Zellen nach IQGAP1 *knockdown* feststellen können (Li et al., 2019). Die erniedrigte ERK-Phosphorylierung konnte auch nach Nutzung von WW-Domänen Peptiden erzielt werden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Hier könnte die unterschiedliche Art der IQGAP1-Reduktion eine Rolle spielen. Während Li et al. *small hairpin RNA* (shRNA) nutzte und somit in der Zelle nur eine unvollständige Reduktion der Genexpression auf mRNA-Ebene erreichen konnte, wurde in dieser Arbeit ein durchgehender, polyklonaler *Knockout* mittels CRISPR-Cas9 auf DNA-Ebene hergestellt. Da die Zelllinie in unserer Arbeit über viele Generationen einen stabilen *Knockout* zeigte, sind

Kompensationsmechanismen hier als mögliche Erklärung der Unterschiede in den Ergebnissen anzusehen (Li et al., 2019).

AKT wird über PI3K und den mTORC2-Komplex phosphoryliert. Nur durch Phosphorylierungen an beiden Stellen, T308 und S473, ist es vollständig aktiv (Toker and Newton, 2000). IQGAP1 ist nicht nur ein Gerüstprotein für RAF, MEK und ERK über seine IQ-Motive (Bardwell et al., 2017), sondern auch für Bestandteile des PI3K-AKT-Signalwegs insbesondere über das IQ3-Motiv. Deletion dieses Motivs hemmt IQGAP1-Bindung an Komponenten des PI3K-AKT-Signalwegs, während es die Bindung an die genannten MAPK nicht beeinflusst (Chen et al., 2019). IQGAP1 bindet PI3K α mit der WW-Domäne und unterstützt so den PI3K-AKT-Signalweg (Bardwell et al., 2023).

AKT wird an S473 durch den mTORC2 phosphoryliert (Yang et al., 2015). Während keine direkten Interaktionen von IQGAP1 mit dem mTORC2 bekannt sind, gibt es gut beschriebene Interaktion mit dem mTORC1. Es wurde auch ein negativer *Feedback-loop* durch das EGFR phosphorylierte IQGAP1 entdeckt. pIQGAP1 hemmt p70S6Kinase (pS6K), welches wiederum die AKT-Phosphorylierung an S473 hemmt (Tekletsadik et al., 2012). Somit könnte ein Wegfall von IQGAP1 die Phosphorylierung von AKT(S473) durch die Hemmung der Hemmung verstärken.

Es wurde angenommen, dass IQGAP1 als Schalter zwischen ERK- und AKT-Signalwegen fungiert, indem es phosphoryliertes *forkhead box transcription factors 1* (FOXO1) bindet und sich die Konformation so ändert, dass die Bindung und Funktion als Gerüstprotein zu den MAP-Kinasen erschwert wird. FOXO1 wird durch AKT aktiviert (Choi and Anderson, 2017). Der RAF-MEK-ERK- Signalweg, sowie der PI3K-AKT-Signalweg konkurrieren um IQGAP1 und dessen Konzentration könnte somit die Aktivität beider Signalwege bestimmen. Choi und Anderson (2017) beschreiben, wie eine hohe IQGAP1-Konzentration den AKT-Signalweg bevorzuge und ERK hemme. Bei niedriger Konzentration sei es andersherum (Choi and Anderson, 2017). In unserer Arbeit zeigte sich jedoch kein Unterschied im ERK-Signal bei IQGAP1-KO, aber ein verstärktes AKT-Signal. Ursächlich könnte das konstitutiv aktive KRAS sein. In KRAS-mutierten Zellen könnte IQGAP1 durch das starke ERK-Signal den AKT-Signalweg hemmen. Durch Wegfall des „Schalters“ wäre auch der Wegfall der Hemmung des AKT-Signalwegs möglich. Es sollte weiter untersucht werden, ob dann akzessorische Proteine wie CaM, das beispielsweise KRAS und PI3K bindet und somit PI3K in KRAS-gesteuerten, aber nicht in NRAS- oder HRAS-gesteuerten Krebszellen vollständig aktiviert (Nussinov et al., 2018), den PI3K-AKT-Signalweg verstärken.

Anhand des Zellviabilitäts-assays konnte auf keinen signifikanten Unterschied der Proliferation zwischen KO und wildtypischen Zellen geschlossen werden. Andere Studien

zeigten jedoch einen Unterschied in der Proliferation (Jadeski et al., 2008, Li et al., 2019), jedoch nutzte keine der benannten Studien den gleichen Versuchsaufbau. In der vorliegenden Arbeit zeigten die wildtypischen Zellen trotz gleicher Anzahl, von Tag 0 an, einen höheren Metabolismus des CellTiter®-Blues. Der CellTiter-Blue® Assay bestimmt die Zellviabilität, indem er die Umwandlung von Resazurin in das fluoreszierende Resorufin durch metabolisch aktive Zellen misst. Diese Reduktion erfolgt durch zelluläre Enzyme, die in lebenden, aber nicht in toten Zellen aktiv sind, und dient als indirekter Indikator für die ATP-Produktion und damit für den Zellstoffwechsel, die Proliferation und die allgemeine Zellgesundheit. Ein erniedrigter Metabolismus bei IQGAP1-Verlust deckt sich mit Studien von IQGAP1-KO Mäusen. In einer Studie zum Beispiel zeigte sich eine erniedrigte Ketose in Leberzellen (Erickson and Anakk, 2018). Die Aussagekraft der Ergebnisse unserer Arbeit sind aber kritisch zu diskutieren bei unterschiedlichen Ergebnissen schon an Tag 0, sowie kein Fokus auf die Untersuchung des Metabolismus bei der Planung des Versuchs.

Die Kolokalisation von IQGAP1 mit Aktin deckt sich mit dem aktuellen Stand der Forschung. Schon 2002 konnte Mateer et al. dies zeigen, einmal *in vivo*, die Kolokalisation am Zellkortex, sowie *in vitro* Bindung von IQGAP1 an F-Aktin. Diese Bindung wird durch CaM/Ca²⁺ reguliert. Je höher das intrazelluläre Kalzium, desto mehr Bindung von CaM an IQGAP1 und dadurch eine erniedrigte Assoziation mit kortikalen Aktinfilamenten (Mateer et al., 2004).

IQGAP1 spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der Zellmotilität und Aktindynamik. Es stimuliert Aktinpolymerisation durch den N - *Wiskott-Aldrich Syndrome protein* (NWASP) – *actin related protein* (ARP2/3) – Signalweg (Le Clainche et al., 2007). Außerdem beeinflusst IQGAP1 Zelladhäsion, -polarität und Migration über seine Interaktion mit CDC42 und RAC1 (Nouri et al., 2016, Nouri et al., 2020).

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Zellmigration in einem *Scratch*-Test zwischen den KO-Zellen und den wildtypischen Zellen erkannt werden. Das gleiche, schon oben beschriebene Paper, von Li et al., welches shRNA nutzte, um einen IQGAP1 *knockdown* durchzuführen, konnte eine erniedrigte Migration mittels *Scratch*-Tests und *Transwell*-Migrations-Assay in CAPAN1, jedoch nicht in PANC1, eine KRAS G12D-mutierte Pankreasadenokarzinomzelllinie, beobachten (Li et al., 2019). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Der Grund dafür könnte, wie oben schon argumentiert, an der Art der Runterregulierung und damit gegebenenfalls unterschiedliche Kompensationsmechanismen liegen. Auch zu hinterfragen sind die unterschiedlichen Ergebnisse in den beiden untersuchten Zelllinien des Papers, obwohl beide KRAS *gain-of-function*-Mutationen aufweisen und ihren Ursprung in Pankreasadenokarzinomen haben (Li et al., 2019).

Trotz der neuen Erkenntnisse zur Rolle von IQGAP1 in KRAS-mutierten Pankreaskarzinomzellen gibt es einige Limitationen, die berücksichtigt werden müssen.

Ein zentraler Punkt ist die Zelllinienspezifität der Ergebnisse. In dieser Arbeit wurde primär die CAPAN1-Zelllinie (KRAS G12V-mutiert) verwendet, wodurch unklar bleibt, inwiefern die beobachteten Effekte in anderen Pankreaskarzinomzelllinien oder Tumorentitäten anderer Gewebe reproduzierbar sind. Eine Validierung in weiteren Zelllinien mit unterschiedlichen KRAS-Mutationen, wie PANC1 (mit G12D-Mutation), oder anderen Geweben, wie SW480 (Kolonkarzinom mit G12V-Mutation), kann zur besseren Einordnung der Ergebnisse beitragen.

Ein weiterer Aspekt ist die polyklonale Natur der erzeugten *Knockout*-Zelllinie. Der *Knockout* wurde durch CRISPR-Cas9 vermittelt und sowohl auf Proteinebene (*Western Blot*, Immunfluoreszenz) bestätigt. Eine klonale Selektion einzelner Zellen kann helfen, potenzielle Heterogenität innerhalb der polyklonalen Population auszuschließen und Effekte spezifischer zu validieren. Jedoch sollte angemerkt werden, dass real auch eher polyklonale Tumore vorliegen und Einzelklone zu untypischen Artefakten führen können.

Hinsichtlich der Validierungsmethoden wurden alternative Ansätze genutzt, jedoch nicht in allen Bereichen. Während der KO von IQGAP1 experimentell auf Proteinebene bestätigt wurde, erfolgte die qPCR-Analyse der IQGAP-Familie nur sicher für IQGAP3, jedoch nicht ausreichend für IQGAP2. Um Kompensationsmechanismen durch Expressionsveränderung der Isoformen sicher auszuschließen, müssen die polyklonalen IQGAP1-KO Zelllinien dahingehend erneut untersucht werden.

Ein kritischer Punkt ist die Analyse der Zellmigration. Während keine signifikanten Veränderungen festgestellt wurden, bleibt offen, ob andere Migrations-Tests (z.B. Einzelzell-*Tracking* oder *Live-Cell-Imaging*) möglicherweise feinere Unterschiede sichtbar machen. Zusätzlich ist eine Ergänzung durch funktionelle Rettungs-Experimente, beispielsweise durch Re-Expression von IQGAP1, interessant, um die spezifischen Effekte des *Knockouts* in Zukunft weiter zu validieren.

Ähnlich verhält es sich mit der Proliferationsanalyse. Es wurde anhand der Stoffwechselung von CellTiter®-Blue in einem Zellviabilitäts-assay auf die Proliferation geschlossen. Trotz gleicher Anzahl an Zellen zeigte sich an Tag 0 ein Unterschied. Somit kann gegebenenfalls auf einen Unterschied im Metabolismus geschlossen werden, jedoch ist im Verlauf dadurch die Aussagekraft gegenüber der Proliferation eingeschränkt. Eine direkte Analyse der Proliferation beispielsweise mittels einer Neubauer-Zählkammer sollte durchgeführt werden.

Zusammenfassend bietet diese Arbeit neue Einblicke in die Rolle von IQGAP1 in KRAS-mutierten Pankreaskarzinomzellen, jedoch mit bestimmten methodischen Einschränkungen. Es zeigt wie komplex Signalnetzwerke und deren Kompensationsmechanismen sind und, dass selbst methodische Unterschiede Ursachen für abweichende Ergebnisse sein könnten. Weitere Untersuchungen in zusätzlichen Zelllinien, mit funktionellen Rescue-Experimenten und detaillierteren Signalweganalysen, sowie die Untersuchung anderer involvierter akzessorischer Proteine könnten die Ergebnisse weiter stärken und ihre Übertragbarkeit auf andere Modelle verbessern.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- AGAZIE, Y. M. & HAYMAN, M. J. 2003. Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol*, 23, 7875-86.
- AIGNER, K. R., STEPHENS, F. O., ALLEN-MERSH, T., HORTOBAGYI, G., KHAYAT, D., PICKSLEY, S. M., SUGARBAKER, P., TAGUCHI, T. & THOMPSON, J. F. 2016. Was ist eine maligne Erkrankung? *Onkologie Basiswissen*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- ALDEA, M., ANDRE, F., MARABELLE, A., DOGAN, S., BARLESI, F. & SORIA, J. C. 2021. Overcoming Resistance to Tumor-Targeted and Immune-Targeted Therapies. *Cancer Discov*, 11, 874-899.
- ALLANSON, J. E., HALL, J. G., HUGHES, H. E., PREUS, M. & WITT, R. D. 1985. Noonan syndrome: the changing phenotype. *Am J Med Genet*, 21, 507-14.
- AMIT, I., CITRI, A., SHAY, T., LU, Y., KATZ, M., ZHANG, F., TARCIC, G., SIWAK, D., LAHAD, J., JACOB-HIRSCH, J., AMARIGLIO, N., VAISMAN, N., SEGAL, E., RECHAVI, G., ALON, U., MILLS, G. B., DOMANY, E. & YARDEN, Y. 2007. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nature Genetics*, 39, 503-512.
- AN, S., YANG, Y., WARD, R., LIU, Y., GUO, X. X. & XU, T. R. 2015. A-Raf: A new star of the family of raf kinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 50, 520-31.
- ARNDT, V., DAHM, S. & KRAYWINKEL, K. 2021. Krebsprävalenz in Deutschland 2017. *Der Onkologe*, 27, 717-723.
- ARRUEBO, M., VILABOA, N., SAEZ-GUTIERREZ, B., LAMBEA, J., TRES, A., VALLADARES, M. & GONZALEZ-FERNANDEZ, A. 2011. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers (Basel)*, 3, 3279-330.
- BARDWELL, A. J., LAGUNES, L., ZEBARJEDI, R. & BARDWELL, L. 2017. The WW domain of the scaffolding protein IQGAP1 is neither necessary nor sufficient for binding to the MAPKs ERK1 and ERK2. *J Biol Chem*, 292, 8750-8761.
- BARDWELL, A. J., PAUL, M., YONEDA, K. C., ANDRADE-LUDENA, M. D., NGUYEN, O. T., FRUMAN, D. & BARDWELL, L. 2023. The WW domain of IQGAP1 binds directly to the p110alpha catalytic subunit of PI 3-kinase. *Biochem J*.
- BELANGER, L. F., ROY, S., TREMBLAY, M., BROTT, B., STEFF, A. M., MOURAD, W., HUGO, P., ERIKSON, R. & CHARRON, J. 2003. Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol*, 23, 4778-87.
- BOLLAG, G., HIRTH, P., TSAI, J., ZHANG, J., IBRAHIM, P. N., CHO, H., SPEVAK, W., ZHANG, C., ZHANG, Y., HABETS, G., BURTON, E. A., WONG, B., TSANG, G., WEST, B. L., POWELL, B., SHELLOOE, R., MARIMUTHU, A., NGUYEN, H., ZHANG, K. Y., ARTIS, D. R., SCHLESSINGER, J., SU, F., HIGGINS, B., IYER, R., D'ANDREA, K., KOEHLER, A., STUMM, M., LIN, P. S., LEE, R. J., GRIPPO, J., PUZANOV, I., KIM, K. B., RIBAS, A., MCARTHUR, G. A., SOSMAN, J. A., CHAPMAN, P. B., FLAHERTY, K. T., XU, X., NATHANSON, K. L. & NOLOP, K. 2010. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, 467, 596-9.
- BOS, J. L., REHMANN, H. & WITTINGHOFFER, A. 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129, 865-77.
- BRIGGS, M. W. & SACKS, D. B. 2003. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep*, 4, 571-4.
- BUNDA, S., BURRELL, K., HEIR, P., ZENG, L., ALAMSAHEBPOUR, A., KANO, Y., RAUGHT, B., ZHANG, Z. Y., ZADEH, G. & OHH, M. 2015. Inhibition of SHP2-mediated dephosphorylation of Ras suppresses oncogenesis. *Nat Commun*, 6, 8859.
- BURACK, W. R. & STURGILL, T. W. 1997. The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive. *Biochemistry*, 36, 5929-33.
- BUROTTA, M., CHIOU, V. L., LEE, J. M. & KOHN, E. C. 2014. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*, 120, 3446-56.
- CANTOR, A. J., SHAH, N. H. & KURIYAN, J. 2018. Deep mutational analysis reveals functional trade-offs in the sequences of EGFR autophosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E7303-E7312.

- CARNERO, A., BLANCO-APARICIO, C., RENNER, O., LINK, W. & LEAL, J. F. 2008. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*, 8, 187-98.
- CASTELLANO, E. & DOWNWARD, J. 2011. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer*, 2, 261-74.
- CHARDIN, P., CAMONIS, J. H., GALE, N. W., VAN AELST, L., SCHLESSINGER, J., WIGLER, M. H. & BARSAGI, D. 1993. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science*, 260, 1338-43.
- CHEN, M., CHOI, S., JUNG, O., WEN, T., BAUM, C., THAPA, N., LAMBERT, P. F., RAPRAEGER, A. C. & ANDERSON, R. A. 2019. The Specificity of EGF-Stimulated IQGAP1 Scaffold Towards the PI3K-Akt Pathway is Defined by the IQ3 motif. *Scientific Reports*, 9, 9126.
- CHEN, X., LIU, M., TIAN, Y., LI, J., QI, Y., ZHAO, D., WU, Z., HUANG, M., WONG, C. C. L., WANG, H. W., WANG, J., YANG, H. & XU, Y. 2018. Cryo-EM structure of human mTOR complex 2. *Cell Res*, 28, 518-528.
- CHEN, Y., VERBEEK, F. J. & WOLSTENCROFT, K. 2021. Establishing a consensus for the hallmarks of cancer based on gene ontology and pathway annotations. *BMC Bioinformatics*, 22, 178.
- CHOI, S. & ANDERSON, R. A. 2017. And Akt-ion! IQGAP1 in control of signaling pathways. *EMBO J*, 36, 967-969.
- CHOU, Y. T. & BIVONA, T. G. 2022. Inhibition of SHP2 as an approach to block RAS-driven cancers. *Adv Cancer Res*, 153, 205-236.
- CIZMAROVA, M., KOSTALOVA, L., PRIBILINCOVA, Z., LASABOVA, Z., HLAVATA, A., KOVACS, L. & ILENCIKOVA, D. 2013. Rasopathies - dysmorphic syndromes with short stature and risk of malignancy. *Endocr Regul*, 47, 217-22.
- COLICELLI, J. 2004. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE*, 2004, RE13.
- COX, A. D. & DER, C. J. 2002. Ras family signaling: therapeutic targeting. *Cancer Biol Ther*, 1, 599-606.
- COX, A. D., DER, C. J. & PHILIPS, M. R. 2015. Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? *Clin Cancer Res*, 21, 1819-27.
- CROWE, D. L. & OHANNESSIAN, A. 2004. Recruitment of focal adhesion kinase and paxillin to beta1 integrin promotes cancer cell migration via mitogen activated protein kinase activation. *BMC Cancer*, 4, 18.
- CSEH, B., DOMA, E. & BACCARINI, M. 2014. "RAF" neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Lett*, 588, 2398-406.
- CUI, Y., MA, L., SCHACKE, S., YIN, J. C., HSUEH, Y. P., JIN, H. & MORRISON, H. 2021. Merlin cooperates with neurofibromin and Spred1 to suppress the Ras-Erk pathway. *Hum Mol Genet*, 29, 3793-3806.
- DAVIES, M. A. & SAMUELS, Y. 2010. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*, 29, 5545-5555.
- DEAKIN, N. O. & TURNER, C. E. 2008. Paxillin comes of age. *J Cell Sci*, 121, 2435-44.
- DEANGELO, S., MURPHY, J., CLAMAN, L., KALMAR, J. & LEBLEBICIOGLU, B. 2007. Hereditary gingival fibromatosis--a review. *Compend Contin Educ Dent*, 28, 138-43; quiz 144, 152.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR GASTROENTEROLOGIE, V.-U. S. D. 2021. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe.
- DU, Z. & LOVLY, C. M. 2018. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*, 17, 58.
- EBNER, M., LUCIC, I., LEONARD, T. A. & YUDUSHKIN, I. 2017. PI(3,4,5)P(3) Engagement Restricts Akt Activity to Cellular Membranes. *Mol Cell*, 65, 416-431 e6.
- ELLIOTT, S. F., ALLEN, G. & TIMSON, D. J. 2012. Biochemical analysis of the interactions of IQGAP1 C-terminal domain with CDC42. *World J Biol Chem*, 3, 53-60.
- ERDMANN, F., SPIX, C., KATALINIC, A., CHRIST, M., FOLKERTS, J., HANSMANN, J., KRANZHÖFER, K., KUNZ, B., MANEGOLD, K., PENZKOFER, A., TREML, K., VOLLMER, G., WEG-REMERS, S., BARNES, B., BUTTMANN-SCHWEIGER, N., DAHM, S., FIEBIG, J., FRANKE, M., GURUNG-

- SCHÖNFELD, I., HABERLAND, J., IMHOFF, M., KRAYWINKEL, K., STARKER, A., VON BERENBERG-GOSSLER, P. & WIENECKE, A. 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Robert Koch-Institut.
- ERICKSON, H. L. & ANAKK, S. 2018. Identification of IQ motif-containing GTPase-activating protein 1 as a regulator of long-term ketosis. *JCI Insight*, 3.
- EVANS, D., MAGRO, G., MAIOLINO, L., MUGLIA, M., PRATICÒ, A. & RUGGIERI, M. 2016. Biochemical Insights into Merlin/NF2 Pathophysiology and Biologically Targeted Therapies in Childhood NF2 and Related Forms. *Journal of Pediatric Biochemistry*, 05, 120-130.
- FANALE, D., IOVANNA, J. L., GIORDANO, A., RUSSO, A. & BAZAN, V. 2021. Tumor Biology and Natural History. In: RUSSO, A., PEETERS, M., INCORVAIA, L. & ROLFO, C. (eds.) *Practical Medical Oncology Textbook*. Cham: Springer International Publishing.
- FEARON, E. R. & VOGELSTEIN, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-67.
- FEDERICI, L. & FALINI, B. 2013. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: a tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Sci*, 22, 545-56.
- FERRO, E. & TRABALZINI, L. 2010. RalGDS family members couple Ras to Ral signalling and that's not all. *Cell Signal*, 22, 1804-10.
- FISCHER, A., MUHLHAUSER, W. W. D., WARSCHIED, B. & RADZIWILL, G. 2017. Membrane localization of acetylated CNK1 mediates a positive feedback on RAF/ERK signaling. *Sci Adv*, 3, e1700475.
- FUKATA, M., KURODA, S., NAKAGAWA, M., KAWAJIRI, A., ITOH, N., SHOJI, I., MATSUURA, Y., YONEHARA, S., FUJISAWA, H., KIKUCHI, A. & KAIBUCHI, K. 1999. Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J Biol Chem*, 274, 26044-50.
- GALMICHE, A., FUELLER, J., SANTEL, A., KROHNE, G., WITTIG, I., DOYE, A., ROLANDO, M., FLATAU, G., LEMICHEZ, E. & RAPP, U. R. 2008. Isoform-specific interaction of C-RAF with mitochondria. *J Biol Chem*, 283, 14857-66.
- GIROUX, S., TREMBLAY, M., BERNARD, D., CARDIN-GIRARD, J. F., AUBRY, S., LAROUCHE, L., ROUSSEAU, S., HUOT, J., LANDRY, J., JEANNOTTE, L. & CHARRON, J. 1999. Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol*, 9, 369-72.
- GONZALEZ, F. A., SETH, A., RADEN, D. L., BOWMAN, D. S., FAY, F. S. & DAVIS, R. J. 1993. Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J Cell Biol*, 122, 1089-101.
- GOTO, T., SATO, A., SHIMIZU, M., ADACHI, S., SATOH, K., IEMURA, S., NATSUME, T. & SHIBUYA, H. 2013. IQGAP1 functions as a modulator of dishevelled nuclear localization in Wnt signaling. *PLoS One*, 8, e60865.
- GRIZZI, F., DI IEVA, A., RUSSO, C., FREZZA, E. E., COBOS, E., MUZZIO, P. C. & CHIRIVA-INTERNATI, M. 2006. Cancer initiation and progression: an unsimplifiable complexity. *Theor Biol Med Model*, 3, 37.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HARMON, R. M., SIMPSON, C. L., JOHNSON, J. L., KOETSIER, J. L., DUBASH, A. D., NAJOR, N. A., SARIG, O., SPRECHER, E. & GREEN, K. J. 2013. Desmoglein-1/Erbin interaction suppresses ERK activation to support epidermal differentiation. *J Clin Invest*, 123, 1556-70.
- HATTORI, S., FUKUDA, M., YAMASHITA, T., NAKAMURA, S., GOTOH, Y. & NISHIDA, E. 1992. Activation of mitogen-activated protein kinase and its activator by ras in intact cells and in a cell-free system. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 20346-20351.
- HIBINO, K., SHIBATA, T., YANAGIDA, T. & SAKO, Y. 2011. Activation kinetics of RAF protein in the ternary complex of RAF, RAS-GTP, and kinase on the plasma membrane of living cells: single-molecule imaging analysis. *J Biol Chem*, 286, 36460-8.
- HLAVACEK, W. S., FAEDER, J. R., BLINOV, M. L., PERELSON, A. S. & GOLDSTEIN, B. 2003. The complexity of complexes in signal transduction. *Biotechnol Bioeng*, 84, 783-94.

- HO, Y. D., JOYAL, J. L., LI, Z. & SACKS, D. B. 1999. IQGAP1 integrates Ca²⁺/calmodulin and Cdc42 signaling. *J Biol Chem*, 274, 464-70.
- HOBBS, G. A., DER, C. J. & ROSSMAN, K. L. 2016. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci*, 129, 1287-92.
- HOFFMAN-CENSITS, J. & MALDONADO, L. 2022. Targeted Treatment of Locally Advanced and Metastatic Urothelial Cancer: Enfortumab Vedotin in Context. *Onco Targets Ther*, 15, 1519-1529.
- HU, J., STITES, E. C., YU, H., GERMINO, E. A., MEHARENA, H. S., STORK, P. J. S., KORNEV, A. P., TAYLOR, S. S. & SHAW, A. S. 2013. Allosteric activation of functionally asymmetric RAF kinase dimers. *Cell*, 154, 1036-1046.
- HUANG, C. Y. & FERRELL, J. E., JR. 1996. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 10078-83.
- HUANG, T., KARSY, M., ZHUGE, J., ZHONG, M. & LIU, D. 2013. B-Raf and the inhibitors: from bench to bedside. *J Hematol Oncol*, 6, 30.
- HUBBARD, S. R. 1999. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol*, 71, 343-58.
- HUNTER, T. 2000. Signaling--2000 and beyond. *Cell*, 100, 113-27.
- HYMOWITZ, S. G. & MALEK, S. 2018. Targeting the MAPK Pathway in RAS Mutant Cancers. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.
- INDER, K. L., LAU, C., LOO, D., CHAUDHARY, N., GOODALL, A., MARTIN, S., JONES, A., VAN DER HOEVEN, D., PARTON, R. G., HILL, M. M. & HANCOCK, J. F. 2009. Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras plasma membrane interactions and MAPK signal transduction. *J Biol Chem*, 284, 28410-28419.
- IVAKHNO, S. & ARMSTRONG, J. D. 2007. Non-linear dimensionality reduction of signaling networks. *BMC Syst Biol*, 1, 27.
- JACINTO, E., FACCHINETTI, V., LIU, D., SOTO, N., WEI, S., JUNG, S. Y., HUANG, Q., QIN, J. & SU, B. 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*, 127, 125-37.
- JADESKI, L., MATARAZA, J. M., JEONG, H. W., LI, Z. & SACKS, D. B. 2008. IQGAP1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of human breast epithelial cells. *J Biol Chem*, 283, 1008-17.
- JAFRY, M. & SIDBURY, R. 2020. RASopathies. *Clin Dermatol*, 38, 455-461.
- JAMBRINA, P. G., BOHUSZEWICZ, O., BUCHETE, N. V., KOLCH, W. & ROSTA, E. 2014. Molecular mechanisms of asymmetric RAF dimer activation. *Biochem Soc Trans*, 42, 784-90.
- JAMBRINA, P. G., RAUCH, N., PILKINGTON, R., RYBAKOVA, K., NGUYEN, L. K., KHOLODENKO, B. N., BUCHETE, N. V., KOLCH, W. & ROSTA, E. 2016. Phosphorylation of RAF Kinase Dimers Drives Conformational Changes that Facilitate Transactivation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 55, 983-6.
- JELINEK, T., DENT, P., STURGILL, T. W. & WEBER, M. J. 1996. Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 16, 1027-34.
- JEYAKUMAR, A. & YOUNIS, T. 2012. Trastuzumab for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: Clinical and Economic Considerations. *Clin Med Insights Oncol*, 6, 179-87.
- JI, R. R., GEREAU, R. W. T., MALCANGIO, M. & STRICHARTZ, G. R. 2009. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev*, 60, 135-48.
- JIANG, B. H. & LIU, L. Z. 2009. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res*, 102, 19-65.
- JOYAL, J. L., ANNAN, R. S., HO, Y. D., HUDDLESTON, M. E., CARR, S. A., HART, M. J. & SACKS, D. B. 1997. Calmodulin modulates the interaction between IQGAP1 and Cdc42. Identification of IQGAP1 by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *J Biol Chem*, 272, 15419-25.
- KARASARIDES, M., CHILOECHES, A., HAYWARD, R., NICULESCU-DUVAZ, D., SCANLON, I., FRIEDLOS, F., OGILVIE, L., HEDLEY, D., MARTIN, J., MARSHALL, C. J., SPRINGER, C. J. & MARAIS, R. 2004. B-Raf is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene*, 23, 6292-8.

- KARRETH, F. A., FRESE, K. K., DENICOLA, G. M., BACCARINI, M. & TUVESON, D. A. 2011. C-Raf is required for the initiation of lung cancer by K-Ras(G12D). *Cancer Discov*, 1, 128-36.
- KATO, K., COX, A. D., HISAKA, M. M., GRAHAM, S. M., BUSS, J. E. & DER, C. J. 1992. Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 6403-7.
- KENT, D. G. & GREEN, A. R. 2017. Order Matters: The Order of Somatic Mutations Influences Cancer Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7.
- KESHET, Y. & SEGER, R. 2010. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol*, 661, 3-38.
- KHOLODENKO, B. N., HANCOCK, J. F. & KOLCH, W. 2010. Signalling ballet in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 414-26.
- KIM, E. K. & CHOI, E. J. 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1802, 396-405.
- KOMATSUZAKI, S., AOKI, Y., NIIHORI, T., OKAMOTO, N., HENNEKAM, R. C., HOPMAN, S., OHASHI, H., MIZUNO, S., WATANABE, Y., KAMASAKI, H., KONDO, I., MORIYAMA, N., KUROSAWA, K., KAWAME, H., OKUYAMA, R., IMAIZUMI, M., RIKIISHI, T., TSUCHIYA, S., KURE, S. & MATSUBARA, Y. 2010. Mutation analysis of the SHOC2 gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies. *J Hum Genet*, 55, 801-9.
- KURELLA, V. B., RICHARD, J. M., PARKE, C. L., LECOUR, L. F., JR., BELLAMY, H. D. & WORTHYLAKE, D. K. 2009. Crystal structure of the GTPase-activating protein-related domain from IQGAP1. *J Biol Chem*, 284, 14857-65.
- KURZBAUER, R., TEIS, D., DE ARAUJO, M. E., MAURER-STROH, S., EISENHABER, F., BOURENKOV, G. P., BARTUNIK, H. D., HEKMAN, M., RAPP, U. R., HUBER, L. A. & CLAUSEN, T. 2004. Crystal structure of the p14/MP1 scaffolding complex: how a twin couple attaches mitogen-activated protein kinase signaling to late endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 10984-9.
- KWON, J. J. & HAHN, W. C. 2021. A Leucine-Rich Repeat Protein Provides a SHOC2 the RAS Circuit: a Structure-Function Perspective. *Mol Cell Biol*, 41.
- L'ALLEMAIN, G. 1994. Deciphering the MAP kinase pathway. *Prog Growth Factor Res*, 5, 291-334.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LATRONICO, M. V., COSTINEAN, S., LAVITRANO, M. L., PESCHLE, C. & CONDORELLI, G. 2004. Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 1015, 250-60.
- LE CLAINCHE, C., SCHLAEPFER, D., FERRARI, A., KLINGAUF, M., GROHMANOVA, K., VELIGODSKIY, A., DIDRY, D., LE, D., EGILE, C., CARLIER, M. F. & KROSCHESKI, R. 2007. IQGAP1 stimulates actin assembly through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem*, 282, 426-35.
- LEEVERS, S. J., PATERSON, H. F. & MARSHALL, C. J. 1994. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*, 369, 411-4.
- LEMMON, M. A. & SCHLESSINGER, J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141, 1117-34.
- LI, J. H., MCMILLAN, R. H., BEGUM, A., GOCKE, C. B. & MATSUI, W. 2019. IQGAP1 Maintains Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Clonogenic Growth and Metastasis. *Pancreas*, 48, 94-98.
- LIANG, Y., BRADFORD, W. H., ZHANG, J. & SHEIKH, F. 2018. Four and a half LIM domain protein signaling and cardiomyopathy. *Biophys Rev*, 10, 1073-1085.
- LILIENFELD, S. O. 2013. Is psychopathy a syndrome? Commentary on Marcus, Fulton, and Edens. *Personal Disord*, 4, 85-6.
- LIU, E. & WEISSMAN, B. 1992. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Treat Res*, 63, 1-13.
- LIU, J., XIAO, Q., XIAO, J., NIU, C., LI, Y., ZHANG, X., ZHOU, Z., SHU, G. & YIN, G. 2022. Wnt/beta-catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther*, 7, 3.

- LIU, P., GAN, W., CHIN, Y. R., OGURA, K., GUO, J., ZHANG, J., WANG, B., BLENIS, J., CANTLEY, L. C., TOKER, A., SU, B. & WEI, W. 2015. PtdIns(3,4,5)P₃-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discov*, 5, 1194-209.
- LOPEZ-COLOME, A. M., LEE-RIVERA, I., BENAVIDES-HIDALGO, R. & LOPEZ, E. 2017. Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *J Hematol Oncol*, 10, 50.
- LU, N. & MALEMUD, C. J. 2019. Extracellular Signal-Regulated Kinase: A Regulator of Cell Growth, Inflammation, Chondrocyte and Bone Cell Receptor-Mediated Gene Expression. *Int J Mol Sci*, 20.
- LUNIN, V. V., MUNGER, C., WAGNER, J., YE, Z., CYGLER, M. & SACHER, M. 2004. The structure of the MAPK scaffold, MP1, bound to its partner, p14. A complex with a critical role in endosomal map kinase signaling. *J Biol Chem*, 279, 23422-30.
- LUO, J. 2021. KRAS mutation in pancreatic cancer. *Semin Oncol*, 48, 10-18.
- MA, Q. C., ENNIS, C. A. & APARICIO, S. 2012. Opening Pandora's Box--the new biology of driver mutations and clonal evolution in cancer as revealed by next generation sequencing. *Curr Opin Genet Dev*, 22, 3-9.
- MADAULE, P. & AXEL, R. 1985. A novel ras-related gene family. *Cell*, 41, 31-40.
- MANNING, G., WHYTE, D. B., MARTINEZ, R., HUNTER, T. & SUDARSANAM, S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298, 1912-34.
- MARUSYK, A. & POLYAK, K. 2010. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*, 1805, 105-17.
- MATEER, S. C., MORRIS, L. E., CROMER, D. A., BENSON, L. B. & BLOOM, G. S. 2004. Actin filament binding by a monomeric IQGAP1 fragment with a single calponin homology domain. *Cell Motil Cytoskeleton*, 58, 231-41.
- MATSUNAGA, H., KUBOTA, K., INOUE, T., ISONO, F. & ANDO, O. 2014. IQGAP1 selectively interacts with K-Ras but not with H-Ras and modulates K-Ras function. *Biochem Biophys Res Commun*, 444, 360-4.
- MATSUNAGA-UDAGAWA, R., FUJITA, Y., YOSHIKI, S., TERA, K., KAMIOKA, Y., KIYOKAWA, E., YUGI, K., AOKI, K. & MATSUDA, M. 2010. The scaffold protein Shc2/SUR-8 accelerates the interaction of Ras and Raf. *J Biol Chem*, 285, 7818-26.
- MBELE, G. O., DELOULME, J. C., GENTIL, B. J., DELPHIN, C., FERRO, M., GARIN, J., TAKAHASHI, M. & BAUDIER, J. 2002. The zinc- and calcium-binding S100B interacts and co-localizes with IQGAP1 during dynamic rearrangement of cell membranes. *J Biol Chem*, 277, 49998-50007.
- MCCLATCHEY, A. I. & CICHOWSKI, K. 2012. SPRED proteins provide a NF-ty link to Ras suppression. *Genes Dev*, 26, 1515-9.
- MCDONELL, L. M., KERNOHAN, K. D., BOYCOTT, K. M. & SAWYER, S. L. 2015. Receptor tyrosine kinase mutations in developmental syndromes and cancer: two sides of the same coin. *Hum Mol Genet*, 24, R60-6.
- MCNULTY, D. E., LI, Z., WHITE, C. D., SACKS, D. B. & ANNAN, R. S. 2011. MAPK Scaffold IQGAP1 Binds the EGF Receptor and Modulates Its Activation *. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 15010-15021.
- MENDOZA, M. C., ER, E. E. & BLENIS, J. 2010. ERK-MAP Kinase signaling in the cytoplasm. *Methods Mol Biol*, 661, 185-203.
- MIRICESCU, D., TOTAN, A., STEFANI, C., STĂNESCU, I.-I., STANESCU, A. M. A., RUSU, I. R., RADULESCU, R., RUSU, G. C. & GREABU, M. 2019. Structure, activation and biological effects of AKT or protein kinase B. *Romanian Journal of Medical Practice*, 14, 246-250.
- MORGAN, C. J., HEDMAN, A. C., LI, Z. & SACKS, D. B. 2019. Endogenous IQGAP1 and IQGAP3 do not functionally interact with Ras. *Sci Rep*, 9, 11057.
- MORRISON, D. K. 2001. KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci*, 114, 1609-12.
- MOSADDEGHZADEH, N., PUDEWELL, S., BAZGIR, F., KAZEMEIN JASEMI, N. S., KRUMBACH, O. H. F., GREMER, L., WILLBOLD, D., DVORSKY, R. & AHMADIAN, M. R. 2022. CDC42-IQGAP Interactions Scrutinized: New Insights into the Binding Properties of the GAP-Related Domain. *Int J Mol Sci*, 23.

- MOSESSON, Y., MILLS, G. B. & YARDEN, Y. 2008. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8, 835-850.
- MOUCHEL-VIELH, E., ROUGEOT, J., DECOVILLE, M. & PERONNET, F. 2011. The MAP kinase ERK and its scaffold protein MP1 interact with the chromatin regulator Corto during Drosophila wing tissue development. *BMC Dev Biol*, 11, 17.
- MÜLLER, T. 2024. Enfortumab-Vedotin neuer First-Line-Standard beim Urothelkarzinom. *Im Fokus Onkologie*, 27, 57-57.
- MUNSHI, A. & RAMESH, R. 2013. Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. *Genes Cancer*, 4, 401-8.
- NGUYEN, A., BURACK, W. R., STOCK, J. L., KORTUM, R., CHAIKA, O. V., AFKARIAN, M., MULLER, W. J., MURPHY, K. M., MORRISON, D. K., LEWIS, R. E., MCNEISH, J. & SHAW, A. S. 2002. Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol Cell Biol*, 22, 3035-45.
- NOURI, K., FANSA, E. K., AMIN, E., DVORSKY, R., GREMER, L., WILLBOLD, D., SCHMITT, L., TIMSON, D. J. & AHMADIAN, M. R. 2016. IQGAP1 Interaction with RHO Family Proteins Revisited: KINETIC AND EQUILIBRIUM EVIDENCE FOR MULTIPLE DISTINCT BINDING SITES. *J Biol Chem*, 291, 26364-26376.
- NOURI, K., TIMSON, D. J. & AHMADIAN, M. R. 2020. New model for the interaction of IQGAP1 with CDC42 and RAC1. *Small GTPases*, 11, 16-22.
- NUSSINOV, R., ZHANG, M., TSAI, C. J. & JANG, H. 2018. Calmodulin and IQGAP1 activation of PI3Kalpha and Akt in KRAS, HRAS and NRAS-driven cancers. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864, 2304-2314.
- OMEROVIC, J. & PRIOR, I. A. 2009. Compartmentalized signalling: Ras proteins and signalling nanoclusters. *FEBS J*, 276, 1817-25.
- PAYNE, D. M., ROSSOMANDO, A. J., MARTINO, P., ERICKSON, A. K., HER, J. H., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F., WEBER, M. J. & STURGILL, T. W. 1991. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J*, 10, 885-92.
- PETER C. HEINRICH, M. M., LUTZ GRAEVE 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*.
- POULIKAKOS, P. I., PERSAUD, Y., JANAKIRAMAN, M., KONG, X., NG, C., MORICEAU, G., SHI, H., ATEFI, M., TITZ, B., GABAY, M. T., SALTON, M., DAHLMAN, K. B., TADI, M., WARGO, J. A., FLAHERTY, K. T., KELLEY, M. C., MISTELI, T., CHAPMAN, P. B., SOSMAN, J. A., GRAEBER, T. G., RIBAS, A., LO, R. S., ROSEN, N. & SOLIT, D. B. 2011. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*, 480, 387-90.
- PUDEWELL, S. & AHMADIAN, M. R. 2021. Spotlight on Accessory Proteins: RTK-RAS-MAPK Modulators as New Therapeutic Targets. *Biomolecules*, 11.
- PUDEWELL, S., LISSY, J., NAKHAEIZADEH, H., MOSADDEGHZADEH, N., NAKHAEI-RAD, S., DVORSKY, R. & AHMADIAN, M. R. 2022. New mechanistic insights into the RAS-SIN1 interaction at the membrane. *Front Cell Dev Biol*, 10, 987754.
- PUDEWELL, S., WITTICH, C., KAZEMEIN JASEMI, N. S., BAZGIR, F. & AHMADIAN, M. R. 2021. Accessory proteins of the RAS-MAPK pathway: moving from the side line to the front line. *Commun Biol*, 4, 696.
- QUINN, N. P., GARCIA-GUTIERREZ, L., DOHERTY, C., VON KRIEGSHEIM, A., FALLAHI, E., SACKS, D. B. & MATALLANAS, D. 2021. IQGAP1 Is a Scaffold of the Core Proteins of the Hippo Pathway and Negatively Regulates the Pro-Apoptotic Signal Mediated by This Pathway. *Cells*, 10.
- RAABE, T. & RAPP, U. R. 2002. KSR--a regulator and scaffold protein of the MAPK pathway. *Sci STKE*, 2002, pe28.
- RACHMIN, I., TSHORI, S., SMITH, Y., OPPENHEIM, A., MARCHETTO, S., KAY, G., FOO, R. S., DAGAN, N., GOLOMB, E., GILON, D., BORG, J. P. & RAZIN, E. 2014. Erbin is a negative modulator of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 5902-7.
- RAUEN, K. A. 2013. The RASopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 14, 355-69.
- REINER, D. J. & LUNDQUIST, E. A. 2018. Small GTPases. *WormBook*, 2018, 1-65.

- REN, J.-G., LI, Z. & SACKS, D. B. 2007. IQGAP1 modulates activation of B-Raf. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 10465-10469.
- ROCHELEAU, C. E., RONNLUND, A., TUCK, S. & SUNDARAM, M. V. 2005. Caenorhabditis elegans CNK-1 promotes Raf activation but is not essential for Ras/Raf signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 11757-62.
- ROSKOSKI, R., JR. 2010. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 399, 313-7.
- ROSKOSKI, R., JR. 2019. Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacol Res*, 142, 151-168.
- ROY, M., LI, Z. & SACKS, D. B. 2004. IQGAP1 Binds ERK2 and Modulates Its Activity *. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 17329-17337.
- ROY, M., LI, Z. G. & SACKS, D. B. 2005. IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 25, 7940-7952.
- SARBASSOV, D. D., GUERTIN, D. A., ALI, S. M. & SABATINI, D. M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-101.
- SAYEDYAHOSSEIN, S., LI, Z., HEDMAN, A. C., MORGAN, C. J. & SACKS, D. B. 2016. IQGAP1 Binds to Yes-associated Protein (YAP) and Modulates Its Transcriptional Activity. *J Biol Chem*, 291, 19261-73.
- SBROGGIO, M., BERTERO, A., VELASCO, S., FUSELLA, F., DE BLASIO, E., BAHOU, W. F., SILENGO, L., TURCO, E., BRANCACCIO, M. & TARONE, G. 2011a. ERK1/2 activation in heart is controlled by melusin, focal adhesion kinase and the scaffold protein IQGAP1. *J Cell Sci*, 124, 3515-24.
- SBROGGIO, M., CARNEVALE, D., BERTERO, A., CIFELLI, G., DE BLASIO, E., MASCI, G., HIRSCH, E., BAHOU, W. F., TURCO, E., SILENGO, L., BRANCACCIO, M., LEMBO, G. & TARONE, G. 2011b. IQGAP1 regulates ERK1/2 and AKT signalling in the heart and sustains functional remodelling upon pressure overload. *Cardiovasc Res*, 91, 456-64.
- SCHMIDT, V. A. 2012. Watch the GAP: Emerging Roles for IQ Motif-Containing GTPase-Activating Proteins IQGAPs in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Hepatol*, 2012, 958673.
- SHAPIRO, A. L., VINUELA, E. & MAIZEL, J. V., JR. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, 28, 815-20.
- SHEIKH, F., RASKIN, A., CHU, P. H., LANGE, S., DOMENIGHETTI, A. A., ZHENG, M., LIANG, X., ZHANG, T., YAJIMA, T., GU, Y., DALTON, N. D., MAHATA, S. K., DORN, G. W., 2ND, BROWN, J. H., PETERSON, K. L., OMENS, J. H., MCCULLOCH, A. D. & CHEN, J. 2008. An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *J Clin Invest*, 118, 3870-80.
- SIEGRIST, K. K., DEEGAN, R. J., DUMAS, S. D. & EAGLE, S. S. 2020. Severe Cardiopulmonary Disease in a Parturient With Noonan Syndrome. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, 24, 364-368.
- SIEMIATYCKI, J., RICHARDSON, L., STRAIF, K., LATREILLE, B., LAKHANI, R., CAMPBELL, S., ROUSSEAU, M. C. & BOFFETTA, P. 2004. Listing occupational carcinogens. *Environ Health Perspect*, 112, 1447-59.
- SIEVERS, C. K., GRADY, W. M., HALBERG, R. B. & PICKHARDT, P. J. 2017. New insights into the earliest stages of colorectal tumorigenesis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 11, 723-729.
- SIMANSHU, D. K., NISSLEY, D. V. & MCCORMICK, F. 2017. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170, 17-33.
- SINKALA, M., NKHOMA, P., MULDER, N. & MARTIN, D. P. 2021. Integrated molecular characterisation of the MAPK pathways in human cancers reveals pharmacologically vulnerable mutations and gene dependencies. *Commun Biol*, 4, 9.
- SMITH, J. M., HEDMAN, A. C. & SACKS, D. B. 2015. IQGAPs choreograph cellular signaling from the membrane to the nucleus. *Trends Cell Biol*, 25, 171-84.
- SONG, F., DAI, Q., GRIMM, M. O. & STEINBACH, D. 2023. The Antithetic Roles of IQGAP2 and IQGAP3 in Cancers. *Cancers (Basel)*, 15.

- SPADA, A. P. & MYERS, M. R. 2008. Patent Update: Oncologic, Endocrine & Metabolic Small molecule inhibitors of tyrosine kinase activity. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 5, 805-817.
- STOKOE, D., MACDONALD, S. G., CADWALLADER, K., SYMONS, M. & HANCOCK, J. F. 1994. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*, 264, 1463-7.
- STOKOE, D., STEPHENS, L. R., COPELAND, T., GAFFNEY, P. R., REESE, C. B., PAINTER, G. F., HOLMES, A. B., MCCORMICK, F. & HAWKINS, P. T. 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*, 277, 567-70.
- STOWE, I. B., MERCADO, E. L., STOWE, T. R., BELL, E. L., OSES-PRIETO, J. A., HERNANDEZ, H., BURLINGAME, A. L. & MCCORMICK, F. 2012. A shared molecular mechanism underlies the human rasopathies Legius syndrome and Neurofibromatosis-1. *Genes Dev*, 26, 1421-6.
- SU, X., DITLEV, J. A., HUI, E., XING, W., BANJADE, S., OKRUT, J., KING, D. S., TAUNTON, J., ROSEN, M. K. & VALE, R. D. 2016. Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction. *Science*, 352, 595-9.
- TATO, I., BARTRONS, R., VENTURA, F. & ROSA, J. L. 2011. Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling. *J Biol Chem*, 286, 6128-42.
- TEKLETSADIK, Y. K., SONN, R. & OSMAN, M. A. 2012. A conserved role of IQGAP1 in regulating TOR complex 1. *J Cell Sci*, 125, 2041-52.
- TIAN, T., HARDING, A., INDER, K., PLOWMAN, S., PARTON, R. G. & HANCOCK, J. F. 2007. Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction. *Nat Cell Biol*, 9, 905-14.
- TOKER, A. & NEWTON, A. C. 2000. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem*, 275, 8271-4.
- TOLLOT, M., VRANESIC, A. C. & VON EYSS, B. 2020. Der Hippo-Signalweg in der Regeneration und im Krebs. *BIOspektrum*, 26, 154-157.
- TONG, X., TANG, R., XU, J., WANG, W., ZHAO, Y., YU, X. & SHI, S. 2022. Liquid-liquid phase separation in tumor biology. *Signal Transduct Target Ther*, 7, 221.
- TRAN, T. H., CHAN, A. H., YOUNG, L. C., BINDU, L., NEALE, C., MESSING, S., DHARMAIAH, S., TAYLOR, T., DENSON, J. P., ESPOSITO, D., NISSLEY, D. V., STEPHEN, A. G., MCCORMICK, F. & SIMANSHU, D. K. 2021. KRAS interaction with RAF1 RAS-binding domain and cysteine-rich domain provides insights into RAS-mediated RAF activation. *Nat Commun*, 12, 1176.
- ULLRICH, A. & SCHLESSINGER, J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61, 203-12.
- VILLALONGA, P., LOPEZ-ALCALA, C., BOSCH, M., CHILOECHES, A., ROCAMORA, N., GIL, J., MARAIS, R., MARSHALL, C. J., BACHS, O. & AGELL, N. 2001. Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras, and modulates its downstream signaling. *Mol Cell Biol*, 21, 7345-54.
- VILLALONGA, P., LOPEZ-ALCALA, C., CHILOECHES, A., GIL, J., MARAIS, R., BACHS, O. & AGELL, N. 2002. Calmodulin prevents activation of Ras by PKC in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 277, 37929-35.
- VINCENZI, B., ZOCCOLI, A., PANTANO, F., VENDITTI, O. & GALLUZZO, S. 2010. Cetuximab: from bench to bedside. *Curr Cancer Drug Targets*, 10, 80-95.
- VIVANCO, I. & SAWYERS, C. L. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2, 489-501.
- VOGELSTEIN, B., PAPADOPOULOS, N., VELCULESCU, V. E., ZHOU, S., DIAZ, L. A. & KINZLER, K. W. 2013. Cancer Genome Landscapes. *Science*, 339, 1546-1558.
- VOMASTEK, T., SCHAEFFER, H. J., TARCSAFALVI, A., SMOLKIN, M. E., BISSONETTE, E. A. & WEBER, M. J. 2004. Modular construction of a signaling scaffold: MORG1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 6981-6.
- WAGENER, C. & MÜLLER, O. 2010. *Molekulare Onkologie*.
- WANG, B., ZHANG, L., DAI, T., QIN, Z., LU, H., ZHANG, L. & ZHOU, F. 2021. Liquid-liquid phase separation in human health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*, 6, 290.

- WANG, D., LIU, G., MENG, Y., CHEN, H., YE, Z. & JING, J. 2024. The Configuration of GRB2 in Protein Interaction and Signal Transduction. *Biomolecules*, 14.
- WEBB, E. S., LIU, P., BALEEIRO, R., LEMOINE, N. R., YUAN, M. & WANG, Y. H. 2018. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *J Biomed Res*, 32, 317-326.
- WEI, Y., ZHOU, J., YU, H. & JIN, X. 2019. AKT phosphorylation sites of Ser473 and Thr308 regulate AKT degradation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 83, 429-435.
- WEISSBACH, L., BERNARDS, A. & HERION, D. W. 1998. Binding of myosin essential light chain to the cytoskeleton-associated protein IQGAP1. *Biochem Biophys Res Commun*, 251, 269-76.
- WEISSBACH, L., SETTLEMAN, J., KALADY, M. F., SNIJDERS, A. J., MURTHY, A. E., YAN, Y. X. & BERNARDS, A. 1994. Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs. *J Biol Chem*, 269, 20517-21.
- WELLBROCK, C., KARASARIDES, M. & MARAIS, R. 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 875-85.
- WENGLER, A., ROMMEL, A., PLASS, D., GRUHL, H., LEDDIN, J., ZIESE, T., LIPPE, E. V. & GROUP, B. S. 2021. Years of Life Lost to Death-A Comprehensive Analysis of Mortality in Germany Conducted as Part of the BURDEN 2020 Project. *Dtsch Arztebl Int*, 118, 137-144.
- WENNERBERG, K., ROSSMAN, K. L. & DER, C. J. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*, 118, 843-6.
- WERTZ, I. E. & DIXIT, V. M. 2010. Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death & Differentiation*, 17, 14-24.
- WHITE, C. D., BROWN, M. D. & SACKS, D. B. 2009. IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Lett*, 583, 1817-24.
- WITSCH, E., SELA, M. & YARDEN, Y. 2010. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology*, 25, 85-101.
- WORTZEL, I. & SEGER, R. 2011. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer*, 2, 195-209.
- WUNDERLICH, W., FIALKA, I., TEIS, D., ALPI, A., PFEIFER, A., PARTON, R. G., LOTTSPEICH, F. & HUBER, L. A. 2001. A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol*, 152, 765-76.
- XU, H., ZHANG, J., ZHOU, Y., ZHAO, G., CAI, M., GAO, J., SHAO, L., SHI, Y., LI, H., JI, H., ZHAO, Y. & WANG, H. 2022. Mechanistic Insights into Membrane Protein Clustering Revealed by Visualizing EGFR Secretion. *Research (Wash D C)*, 2022, 9835035.
- XU, Z., WANG, W., CAO, Y. & XUE, B. 2023. Liquid-liquid phase separation: Fundamental physical principles, biological implications, and applications in supramolecular materials engineering. *Supramolecular Materials*, 2.
- YANG, G., MURASHIGE, D. S., HUMPHREY, S. J. & JAMES, D. E. 2015. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep*, 12, 937-43.
- YERRAMILI, V. S., LIN, G., REISINGER, J. L., HEMMERLIN, R. M., LINDBERG, S. K., PLANTE, K., ROSS, A. H., GERICKE, A. & SCARLATA, S. 2024. The scaffolding protein IQGAP1 enhances EGFR signaling by promoting oligomerization and preventing degradation. *J Biol Chem*, 300, 107844.
- YOU, X., DOU, L., TAN, M., XIONG, X. & SUN, Y. 2024. SHOC2 plays an oncogenic or tumor-suppressive role by differentially targeting the MAPK and mTORC1 signals in liver cancer. *Life Med*, 3, Inae023.
- YU, J., BLACKFORD, A. L., DAL MOLIN, M., WOLFGANG, C. L. & GOGGINS, M. 2015. Time to progression of pancreatic ductal adenocarcinoma from low-to-high tumour stages. *Gut*, 64, 1783-9.
- YUAN, T. L. & CANTLEY, L. C. 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27, 5497-5510.
- ZHANG, M., MALONEY, R., JANG, H. & NUSSINOV, R. 2021. The mechanism of Raf activation through dimerization. *Chem Sci*, 12, 15609-15619.

- ZHAO, Q. & LEE, F. S. 1999. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem*, 274, 8355-8.
- ZHOU, X. & AGAZIE, Y. M. 2009. Molecular mechanism for SHP2 in promoting HER2-induced signaling and transformation. *J Biol Chem*, 284, 12226-34.
- ZHOU, Y., PRAKASH, P., GORFE, A. A. & HANCOCK, J. F. 2018. Ras and the Plasma Membrane: A Complicated Relationship. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.

Danksagung

Eine Seite reicht wahrscheinlich nicht wie viel Dank und Wertschätzung ich für so viele Menschen verspüre, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

Reza, ich danke dir, dass du mir die Chance gegeben hast in deinem Lab zu arbeiten. Ich danke für jeden Freiraum, für jeden Anschubser und für jeden Tipp und jede Weisheit, die du mit mir geteilt hast. Ohne deine wertschätzende und unterstützende Art hätte ich mir nicht so viel zugetraut.

Liebe Silke, von Tag eins konnte ich mich darauf verlassen, dass du da bist, falls ich mal wieder überfordert war. Deine Geduld und dein Talent komplexe Themen herunterzubrechen habe ich sehr zu schätzen gelernt. Einfach DANKE!

Niloufar, being in an office with you and Silke was the biggest stroke of luck I could have gotten. Thank you for being there, helping me and making the time in the lab as positively memorable as it was.

I want to thank the entire Group Ahmadian for always having an open ear for questions. Further, the entire Institute is full of kind and thoughtful people, that always went out of their way to help. Special thanks to Petra and Feri for administrative help and to Roland and Doreen for giving third or sometimes even fourth opinions, when something wasn't quite working.

Ich danke der Forschungskommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität für die Unterstützung in Form des Promotionsstipendiums.

Auch außerhalb des Labors gab es viele Menschen, ohne die ich dies nie geschafft hätte. Danke an meine gesamte Familie, die mich immer ermuntert haben an mich zu glauben, insbesondere an meine Mutter. Danke an meine Freunde, mit denen ich auch mal in verzweifelten Situationen herzlich lachen konnte und bei Außenstehenden meinen Frust loswerden konnte.

Vielen Dank an alle die mich begleitet haben. Ich bin froh so ein großartiges Umfeld zu haben!