

**Die Bedeutung des *multi-site docking* Proteins Gab1
in der Epo-, Jak2-V617F- und IL-6-induzierten
Signaltransduktion**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von M. Sc. Hannes Bongartz

geb. am 19.12.1987 in Köthen/Anhalt

Gutachter: Prof. Dr. Fred Schaper

Prof. Dr. Karl-Heinz Friedrich

eingereicht am: 17.05.2017

verteidigt am: 23.11.2017

Veröffentlichungen

Wesentliche Teile der Arbeit wurden veröffentlicht in:

H. Bongartz, W. Hessenkemper, C. Müller, M. Fensky, J. Fritsch, K. Mandel, I. Behrmann, C. Haan, T. Fischer, S. M. Feller, F. Schaper, The multi-site docking protein Gab1 is constitutively phosphorylated independent from its recruitment to the plasma membrane in Jak2-V617F-positive cells and mediates proliferation of human erythroleukaemia cells., *Cell Signal* 35 (2017), 37-47.

A. Wolf, R. Eulenfeld, H. Bongartz, W. Hessenkemper, P. C. Simister, S. Lievens, J. Tavernier, S. M. Feller, F. Schaper, MAPK-induced Gab1 translocation to the plasma membrane depends on a regulated intramolecular switch., *Cell Signal* 27 (2) (2015), 340-352.

Weitere Veröffentlichungen:

J. Pinno, H. Bongartz, O. Klepsch, N. Wundrack, V. Poli, F. Schaper, A. Dittrich, Interleukin-6 influences stress-signalling by reducing the expression of the mTOR-inhibitor REDD1 in a STAT3-dependent manner., *Cell Signal* 28 (8) (2016), 907-916.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zytokine	1
1.2	Erythropoetin	1
1.2.1	Erythropoetin-Rezeptor	2
1.3	Interleukin-6	3
1.3.1	Interleukin-6 Rezeptor-Komplex	3
1.4	Tyrosinkinase der Janus Kinase-Familien	4
1.4.1	Die Jak2-Mutante Jak2-V617F und deren pathophysiologische Bedeutung	5
1.5	Die Jak/STAT Signaltransduktion	6
1.6	Die MAPK-Kaskade	9
1.7	Das <i>multi-site docking</i> Protein Gab1	10
1.7.1	Gab1 Membranrekrutierung	12
1.7.2	Bedeutung der Gab1 Membranrekrutierung für die Phosphorylierung von Gab1	13
1.7.3	Gab1 Komplexbildung und deren Bedeutung für die Verschaltung und Verstärkung von Signalwegen	14
2	Ziele der Arbeit	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Chemikalien	17
3.2	Zytokine	17
3.3	Antikörper	17
3.4	Plasmide	19
3.5	Oligonukleotide	22
3.5.1	Primer	22
3.6	Restriktionsenzyme	22
3.7	Prokaryontische Zellen und deren Kultivierung	22
3.7.1	Herstellung kompetenter Bakterien	23
3.7.2	Plasmid Minipräparation	23
3.7.3	Plasmid Maxipräparation	23
3.8	Klonierung	24
3.8.1	Restriktionsverdau	24
3.8.2	Aufreinigung der Restriktionsprodukte	24
3.8.3	Gelextraktion	24
3.8.4	Ligation	25
3.8.5	Mutagenese	25
3.8.6	Transformation	26
3.9	Eukaryontische Zellen und deren Kultivierung	26
3.9.1	Zelllinien	26
3.9.2	Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur	29
3.9.3	Kulturbedingungen für eukaryontische Zellen	29
3.10	Wachstumsassay	29
3.11	Liposomale Transfektion	30
3.12	Elektroporation	30
3.13	Zellysate	30
3.14	Proteinbestimmung nach Bradford	31
3.15	Immunpräzipitation von Proteinen aus dem Zellysat	31

3.16	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
3.17	Western-Blot	33
3.18	Immundetektion von Proteinen	34
3.19	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) und quantitative-Real-Time-PCR (qRT-PCR)	34
3.19.1	RNA Isolation aus eukaryontischen Zellen	34
3.19.2	Quantitative Bestimmung der Nukleinsäuren	34
3.19.3	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	35
3.19.4	qRT-PCR	35
3.20	Durchflusszytometrie	36
3.21	Luziferase-Assay	36
3.22	Konfokale Mikroskopie	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Die Regulation der Gab1 Plasmamembran-Translokation	39
4.2	Gab1 in der Jak2-V617F induzierten Signaltransduktion	44
4.3	Plasmamembran-Translokation und Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1 .	49
4.4	Bedeutung der PI3K- und MAPK-Aktivität für die Jak2-V617F- und Epo- induzierte Plasmamembran-Translokation und Phosphorylierung von Gab1	58
4.5	Jak2-V617F induziert die Rekrutierung von Interaktionspartnern an Gab1	63
4.6	Die Bedeutung der PH-Domänen-vermittelten Translokation für die Re- krutierung von Gab1-Interaktionspartnern	64
4.7	Die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R	67
4.8	Die Bedeutung der Interaktion von Gab1 mit SHP2 und Grb2 für die Epo-R vermittelte Signaltransduktion	71
4.9	Die Regulation der Gab1-Phosphorylierung in der gp130-vermittelten Si- gnaltransduktion	74
4.10	Die Bedeutung von Gab1 in der gp130-vermittelten Signaltransduktion . .	76
4.11	Zusammenfassung der Ergebnisse	79
5	Diskussion	81
5.1	Jak2-V617F induziert die konstitutive Aktivierung der Jak/STAT- und MAPK-Kaskade und die konstitutive Phosphorylierung von Gab1	81
5.2	Epo- und Jak2-V617F-induzierte Membrantranslokation von Gab1	82
5.3	Die Epo- und Jak2-V617F induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1 sind unabhängig von der Plasmamembranrekrutierung	84
5.4	Die Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1 ist abhängig von der Jak2-V617F- Kinaseaktivität	86
5.5	Die Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R ist unabhängig von der PH- Domänen vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran . .	87
5.6	Die Bindung von SHP2 an Gab1 ist unabhängig von der Phosphorylierung des Serins 552 und der PH-Domänen-vermittelten Plasmamembranrekru- tierung	91
5.7	Die Interaktion von Gab1 und SHP2 ist essentiell für die Amplifikation der Epo- und Jak2-V617F-induzierten MAPK-Aktivität	91
5.8	Die Gab1-abhängige Verschaltung der PI3K- und MAPK-Kaskade	92
5.9	Die Regulation der Phosphorylierung von Gab1 in der gp130-vermittelten Signaltransduktion	95
5.10	Die Bedeutung von Gab1 in der gp130-vermittelten Signaltransduktion . .	96

6	Ausblick	98
6.1	Gibt es weitere regulatorische intramolekulare Interaktionen oder auch regulatorische intermolekulare Interaktionen in Gab1?	98
6.2	Wie wird die Phosphorylierung von Gab1 reguliert?	98
6.3	Welche Signalwege werden Gab1-abhängig verstärkt oder verschaltet? . . .	98
6.4	Welchen Kinetiken folgen die Interaktionen der Bindungspartner von Gab1?	99
6.5	Welche Bedeutung haben Gab1-Mutanten in malignen Zellen?	99
7	Zusammenfassung	101
8	Summary	102
9	Literatur	119
10	Abkürzungen	120
11	Danksagung	123
12	Erklärung	124
13	Lebenslauf	125

1 Einleitung

1.1 Zytokine

Zytokine sind lösliche Peptide, die bereits im Piko- oder Nanogrammbereich wirksam sind und zur Kommunikation von Zellen in vielzelligen Organismen dienen. Anders als klassische Hormone werden Zytokine nicht von spezialisierten Drüsenzellen, sondern von nahezu allen Zelltypen produziert und ausgeschüttet. Die sezernierten Zytokine können autokrin auf die sezernierende Zelle selber, parakrin auf benachbarte Zellen oder, über den Blutkreislauf verteilt, endokrin auf weiter entfernte Zellen wirken. Zytokine aktivieren Zellen, indem sie an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und intrazelluläre Signalkaskaden auslösen, die die Transkription von Zielgenen beeinflussen. Eine funktionale Einteilung der Zytokine erfolgt in die fünf Hauptgruppen Interferone, Wachstumsfaktoren, Tumornekrosefaktoren, Chemokine und Interleukine.

Interferone entfalten vor allem antivirale und antitumorale Wirkungen in ihren Zielzellen. Wachstumsfaktoren, wie z.B. Erythropoetin, vermitteln proliferative Signale. Tumornekrosefaktoren sind an der Regulation von Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zytokinsekretion beteiligt. Chemokine steuern die Migration von Immunzellen. Die Interleukine, wie Interleukin-6, wirken als Schlüsselkomponenten in der Kommunikation von Immunzellen und regen Zellen des Immunsystems zu Wachstum, Reifung und Teilung an oder wirken inhibierend auf genau diese Prozesse.

Die Produktion und Sekretion von Zytokinen muss aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums stark reguliert werden. Dies geschieht über die pro- und anti-inflammatorische Wirkung verschiedener Zytokine und die Induktion und die Aktivierung von Inhibitoren. Kommt es zu einer Dysregulation des Zytokinsystems, kann dies zu chronisch entzündlichen Krankheiten und zum Wachstum von Tumorzellen führen.

1.2 Erythropoetin

Das Zytokin Erythropoetin (Epo) ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor. Epo besteht aus 165 Aminosäuren, die in vier antiparallelen α -Helices angeordnet sind und wird von der fötalen Leber bzw. der adulten Niere in das Blutplasma sezerniert [1]. Erythropoetin fördert das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von erythroiden Stammzellen im Knochenmark und ist wesentlich an der Reifung von erythroiden Vorläuferzellen zu Erythrozyten beteiligt [2]. Zudem wirkt Epo auch auf nicht-hämatopoetische Zellen, wie Myozyten, kortikale Neurone und Epithelzellen von Prostata, Ovar und Mamma [3]. Die Biosynthese von Erythropoetin und dessen Sekretion werden durch die Sauerstoffkonzentration im Körper reguliert. So induziert Sauerstoffmangel (Hypoxie) eine erhöhte Epo-Synthese, wohingegen eine erhöhte Sauerstoffkonzentration inhibierend auf die Synthese von Epo wirkt [1]. Eine dysregulierte Epo-Sekretion und die dadurch hervorgerufene Störung der Epo-induzierten Signaltransduktion in Epo-responsiven Zielzellen kann Erkrankungen auslösen. Eine verminderte Konzentration von Epo im Knochenmark führt z.B. durch die verminderte Reifung von Erythrozyten zu Anämien. Eine gesteigerte Epo-Synthese bedingt die Epo-induzierte Erhöhung der Anzahl von Erythrozyten im Blut, wodurch es zur Ausbildung von Thrombosen kommen kann [4]. Eine zu hohe Epo-Konzentration im Blut wirkt auch auf nicht hämatopoetische Zellen vor allem in soliden Tumoren. Dort kann es zu einer Epo-vermittelten Inhibition der Apoptose, Anregung der Angiogenese und Steigerung der Zellproliferation kommen, wodurch die Tumorprogression verstärkt wird [5, 6, 7].

1.2.1 Erythropoetin-Rezeptor

Der Erythropoetin-Rezeptor (Epo-R) ist ein Transmembranrezeptor aus der Superfamilie der Zytokin-Rezeptoren. Der Epo-R wird von erythroiden Stammzellen im Knochenmark und einigen nicht-hämatopoetischen Zellen, wie Myozyten, kortikalen Neuronen und Epithelzellen von Prostata, Ovar und Mamma, exprimiert [3]. Die Expression des Epo-R ist analog zur Epo-Synthese über die Sauerstoffkonzentration im Körper reguliert. Der Epo-R wird bei Hypoxie verstärkt exprimiert [8]. Die Hypoxie-induzierte Erhöhung der Epo-Konzentration im Blut und die erhöhte Expression von Epo-R ermöglichen eine verstärkte Erythrozytenreifung. Die erhöhte Anzahl an Erythrozyten wirkt durch vermehrten Sauerstofftransport der Hypoxie entgegen.

Der Epo-R besteht aus 507 Aminosäuren und setzt sich aus einer extrazellulären, einer Transmembran- und einer zytoplasmatischen Domäne zusammen.

Die extrazelluläre Domäne des Epo-R besitzt zwei Fibronectin Typ III Domänen D1 und D2 (Abb. 1). Die D1-Domäne besitzt ein 4-Cystein (CCCC)-Motiv, welches für die intramolekulare Stabilität und die Ligandenbindung bedeutend ist [9, 10]. Das in der Superfamilie der Zytokinrezeptoren hoch konservierte WSxWS Motiv, welches für die korrekte Proteinfaltung, die Ligandenbindung und die Signaltransduktion erforderlich ist, ist in der D2-Domäne lokalisiert [11, 12]. Der Epo-R liegt bereits vor Ligandenbindung durch Interaktion der extrazellulären Domänen als Homodimer vor [13].

Weiterhin sind die Leucine an den Aminosäure-Position 240 und 241 in der Transmembrandomäne entscheidend für die Prä-Dimerisierung und somit für die Epo-induzierte Aktivierung des Epo-R [14]. Die Transmembrandomäne ist bedeutend für den Erhalt der Orientierung zwischen der extrazellulären und der zytosolischen Domäne und hat somit einen sterischen Einfluss auf die Funktionalität des Epo-R [3].

In der zytoplasmatischen Juxtamembran-Region des Epo-R sind die Box-Motive Box1 und Box2 lokalisiert. Über diese Motive wird die Interaktion der Tyrosinkinase Janus Kinase 2 (Jak2) mit dem Epo-R vermittelt [15].

Die Bindung von Epo an die extrazellulären Domänen des dimerisierten Epo-R induziert eine Konformationsänderung in der D1 und D2 Domäne. Durch die Konformationsänderung werden die intrazellulären Domänen des Epo-R-Dimers in eine Orientierung gebracht, die die Transaktivierung der am Epo-R assoziierten Jak2 initiiert [16].

Die aktive Jak2 phosphoryliert zytoplasmatische Tyrosylreste im Epo-R. Die phosphorylierten Tyrosylreste stellen Bindestellen für Proteine mit *src-homolgy domain 2* (SH2)-Domänen, wie *signal transducers and activators of transcription* (STATs), *SH2 domain containing phosphatase 1/2* (SHP1 und SHP2), *supressor of cytokine signaling 3* (SOCS3), Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und *growth-factor-receptor-bound protein 2* (Grb2) dar. Nach Epo-induzierter Aktivierung des Epo-R werden so u.a. der Jak/STAT-Signalweg, die *mitogen activated protein kinase* (MAPK)-Kaskade und die PI3K-Kaskade aktiviert.

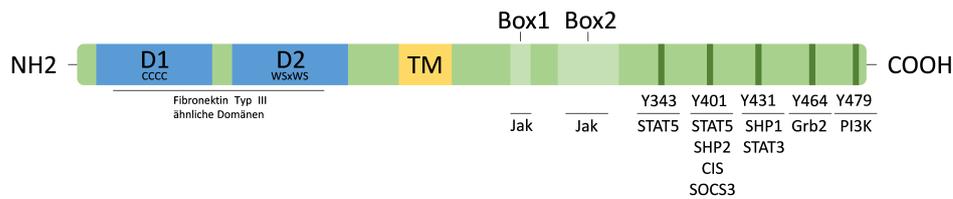


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Erythropoetin Rezeptors (Epo-R). Die extrazelluläre Domäne des Epo-R besteht aus zwei Fibronektin Typ III Domänen D1 und D2. Das in der Zytokin-Rezeptor Superfamilie konservierte 4-Cystein (CCCC)-Motiv befindet sich in der D1-Domäne und das WSxWS-Motiv in der D2-Domäne. Die Interaktion von Jak2 und dem Epo-R wird über die in der zytoplasmatischen Juxtamembran-Region des Epo-R lokalisierten Box1 und Box2 Motive vermittelt. Die C-terminalen Tyrosylreste im Epo-R dienen nach Phosphorylierung als Bindestellen von SH2-Domänen Proteinen, wie STAT, SHP1/2, SOCS3, Grb2 oder PI3K.

1.3 Interleukin-6

Das pleiotrope Zytokin Interleukin-6 (IL-6) besteht aus 184 Aminosäuren, die in vier Helices angeordnet sind. Die räumliche Struktur des IL-6 wird aus 2 Paaren von antiparallelen α -Helices gebildet [17].

IL-6 spielt eine entscheidende Funktion bei Entzündungen, Immunregulation, Hämatopoese und Onkogenese und wird unter anderem von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, Mastzellen, Osteoblasten und Epithelzellen sezerniert. IL-6 wirkt bei der Hämatopoese auf die Reifung von myeloischen Stammzellen, wie den Megakaryozyten, zu Thrombozyten [18]. Daneben induziert IL-6 die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen im extramedullärem Gewebe [19]. Eine IL-6-Überexpression kann daher eine starke extramedulläre Hämatopoese in der Milz und in der Leber bewirken [20]. Neben der Regulation von hämatopoetischen Zellen wirkt IL-6 auf die Entzündungs-induzierte Akutphase-Reaktion in Hepatozyten und auf Zellen des zentralen Nervensystems [21]. Fehlregulationen des IL-6 Signalweges führen zu Erkrankungen, wie z.B. multipler Sklerose, bronchialem Asthma, rheumatoider Arthritis, Arteriosklerose und bestimmten Krebserkrankungen, wie z.B. der chronischen myeloischen Leukämie (CML) [22, 23].

1.3.1 Interleukin-6 Rezeptor-Komplex

Der Interleukin-6 Rezeptor-Komplex setzt sich aus den Transmembran-Proteinen gp80 und gp130 zusammen. Beide IL-6-Rezeptor-Untereinheiten gp80 und gp130 weisen eine Ig-ähnliche Domäne (D1) und Fibronektin Typ III Domänen D2 und D3 auf [24]. In der D2-Domäne ist ein 4-Cystein-Motiv und in der D3-Domäne ein WSxWS-Motiv lokalisiert (Abb. 2) [25]. Das 4-Cystein (CCCC)- und das WSxWS-Motiv sind wichtig für die korrekte Proteinfaltung und Ligandenbindung. Daneben besitzt gp130 drei weitere extrazelluläre Fibronektin Typ III Domänen (D4-D6) [25]. Sowohl gp80 als auch gp130 weisen eine Transmembrandomäne auf. Die Rezeptoruntereinheit gp80 besitzt in der zytoplasmatischen Domäne 82 Aminosäuren und ist bei der IL-6-Signaltransduktion nicht an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt [26]. Dagegen weist die Rezeptoruntereinheit gp130 in der Juxtamembran Region die Box-Motive Box1 und Box2 auf. Diese Box-Motive vermitteln die Interaktion von gp130 mit den Tyrosinkinase der Janus Kinase-Familie (Jak) Jak1, Jak2 oder Tyk2 [27, 28, 29].

Die Bildung des Interleukin-6 Rezeptorkomplexes wird durch die Bindung von IL-6 an gp80 induziert. Der IL-6:gp80-Komplex bindet an gp130. Es wird vermutet, dass es anschließend zur Dimerisierung zweier IL-6:gp80:gp130-Komplexe kommt, die ein Hexamer

ausbilden [30]. Es ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, ob ein prä-dimerisiertes gp130 mit zwei IL-6:gp80-Komplexen interagiert [31] oder ob die Dimerisierung zweier IL-6:gp80:gp130-Tetramere zur Ausbildung des funktionellen Rezeptorhexamers führen [32]. Die aus der Rezeptorassembly resultierende räumliche Annäherung der am gp130 assoziierten Jaks führt zu deren Transaktivierung [33]. Die Aktivierung der Jak Tyrosinkinasen induziert die Phosphorylierung von Tyrosinen im zyttoplasmatischen Abschnitt des gp130. Die phosphorylierten Tyrosylreste dienen wiederum als Bindestellen für Proteine mit SH2-Domänen, wie STAT3, SHP2 und SOCS3. Bei der IL-6-induzierten Signaltransduktion werden die Jak/STAT- und MAPK-Signalkaskade aktiviert [17, 22].

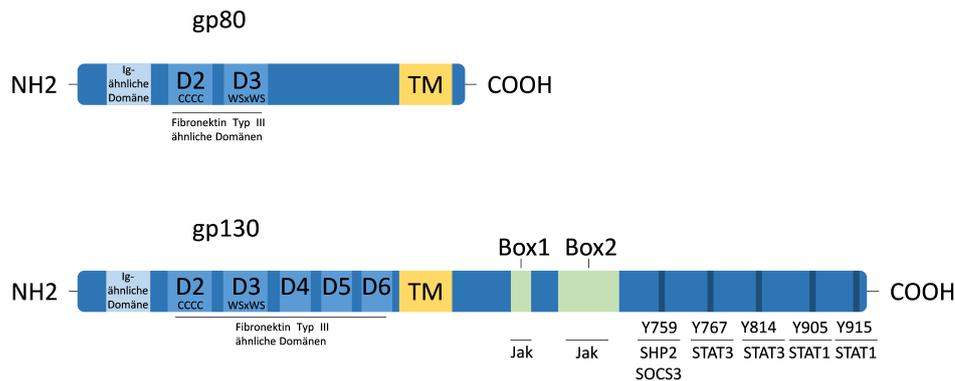


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der IL-6-Rezeptoruntereinheiten gp80 und gp130. Die extrazelluläre Domäne des gp80 und des gp130 besitzen jeweils eine Ig-ähnliche Domäne (D1) und zwei Fibronektin Typ III Domänen D2 und D3. Die in der Zytokin-Rezeptor Superfamilie konservierten 4-Cystein (CCCC)- und das WSxWS-Motive befinden sich in der D2- und D3-Domäne. Zusätzlich weist gp130 drei weitere Fibronektin Typ III ähnliche Domänen im extrazellulären Bereich auf. Über die in der Juxtamembran Region befindlichen Box-Motive Box1 und Box2 wird die Interaktion von Jaks mit gp130 vermittelt. Die C-terminalen Tyrosylreste im gp130 dienen nach Phosphorylierung als Bindestellen von SH2-Domänen Proteine, wie STAT3, SHP2 und SOCS3.

1.4 Tyrosinkinasen der Janus Kinase-Familien

Die Janus Kinase-Familie besteht aus den Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2, die essentielle Funktionen u.a. in der Hämatopoese und in der Immunregulation aufweisen. Jaks interagieren mit den Box-Motiven in Zytokinrezeptoren, wie dem Epo-R oder gp130.

Die Jak-Familie besitzt eine konservierte Domänenstruktur die in sieben Jak-Homologie (JH) Domänen unterteilt wird (Abb. 3). Die N-terminalen Domänen JH7 bis JH5 bilden die FERM-Domäne der Jaks. Die SH2-Domäne ist in der JH4 und JH3 Domäne lokalisiert. Die FERM- und die SH2-Domäne interagieren direkt mit Zytokinrezeptoren und vermitteln so die Rezeptorassoziation der Jak [34]. Die FERM-Domäne in den Jaks interagiert dabei mit den Box-Motiven Box1 bzw. Box2 in den Zytokinrezeptoren [35]. Die Bedeutung der Interaktion der SH2-Domäne in Jak mit phosphorylierten Tyrosinen im Zytokinrezeptor ist bisher nicht eindeutig geklärt. Aber diese Interaktion könnte für die korrekte Konformation und somit Funktion für die Jak wichtig sein [36].

Die verschiedenen Mitglieder der Jak-Familie weisen unterschiedliche Affinitäten zu einzelnen Zytokinrezeptoren auf. So ist bekannt, dass Jak2 im Vergleich zu anderen Jaks eine hohe Affinität zum Epo-R besitzt und der Epo-R daher vornehmlich mit Jak2 interagiert [37]. Die IL-6-Rezeptoruntereinheit gp130 dagegen weist hohe Affinitäten sowohl zu Jak1, Jak2 als auch Tyk2 auf [27, 28, 38].

Die JH2-Domäne der Jak-Familie zeigt eine schwache Tyrosinkinase-Aktivität, deren Funktion nicht abschließend geklärt ist [39]. Aufgrund dieser schwachen Kinase-Aktivität wird diese Domäne auch als Pseudokinase-Domäne bezeichnet. Die C-terminale JH1-Domäne weist eine Tyrosinkinaseaktivität auf. Für die Jaks ist eine autoinhibitorische Interaktion der JH2 und JH1 Domänen beschrieben, die die Kinaseaktivität der JH1 Domäne reguliert [40]. Die an Zytokin-Rezeptoren assoziierten Jaks sind im Ligandenungebundenem Zustand der Rezeptoren inaktiv. In diesem inaktiven Zustand interagiert die JH2-Domäne intramolekular mit der JH1-Domäne. Diese Interaktion blockiert das aktive Zentrum der Jak und wirkt inhibitorisch auf die Kinaseaktivität der JH1-Domäne [41]. Die Liganden-induzierte Konformationsänderung des Rezeptors führt auch zur Konformationsänderung in Jak. Dadurch wird die inhibitorische Interaktion der JH1 und der JH2 Domänen in Jak aufgehoben [42]. In dieser Konformation ist die Tyrosinkinase-Domäne katalytisch aktiv [43]. Im C-terminalen Bereich der Jak-Familie sind Tyrosine konserviert, die in Folge der Aktivierung des Zytokin-Rezeptors und der Jaks durch die Jaks autophosphoryliert werden. Die Autophosphorylierung dieser Tyrosine bedingt eine Konformation der Jaks, in der die Jaks in der Lage sind Substrate binden und phosphorylieren zu können [44, 45].

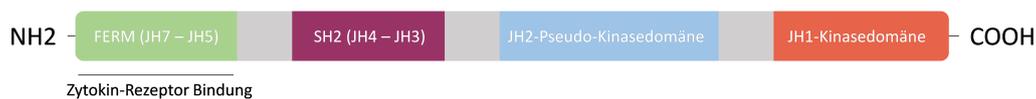


Abbildung 3: Domänenstruktur der Janus Kinase Familie. Jaks besitzen sieben Jak-Homologie (JH) Domänen. Die N-terminale FERM Domäne ist in den JH-Domänen 7 bis 5 und die SH2-Domäne in der JH4 und JH3 lokalisiert. Die FERM- und die SH2-Domänen interagieren mit Zytokin-Rezeptoren. Die JH2-Domäne besitzt eine schwache Kinaseaktivität und wird Pseudokinasedomäne genannt. Die JH1-Domäne ist die Kinasedomäne der Jaks.

1.4.1 Die Jak2-Mutante Jak2-V617F und deren pathophysiologische Bedeutung

Die Jak2-V617F ist eine in Patienten beschriebene Mutante der Janus-Kinase 2. Eine somatische Punktmutation des Nukleotids 1849 in *Jak2* in Exon 14 resultiert in einem Austausch der Aminosäure Valin zu Phenylalanin an der Aminosäureposition 617 [46]. Dieser Aminosäure-Austausch hat zur Folge, dass die inhibierende Interaktion der JH2-Domäne mit der JH1-Kinasedomäne aufgehoben wird [47, 40, 48] (Abb. 4). Die fehlende inhibitorische Interaktion hat zur Folge, dass die Kinase in der JH1-Domäne der Jak2-V617F Mutante konstitutiv aktiv ist. Wie der Jak2-Wildtyp ist auch die Mutante Jak2-V617F mit dem Epo-R assoziiert. Darüber hinaus wurde die Interaktion von Jak2-V617F mit den ebenfalls auf der Zelloberfläche von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimierten Rezeptoren für *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF-R) und Thrombopoetin (Tpo-R) beschrieben [49]. Durch die Assoziation der konstitutiv aktiven Jak2-V617F mit den Rezeptoren für Epo, G-CSF oder Tpo kommt es in hämatopoetischen Vorläuferzellen zu einer konstitutiven Rezeptor-vermittelten Aktivierung von Proliferations-, Differenzierungs- und anti-apoptotischen Signalen. So werden in diesen Zellen durch Jak2-V617F die Jak/STAT-, MAPK- und PI3K-Kaskade konstitutiv aktiviert [46, 50]. Diese konstitutive Signaltransduktion in Jak2-V617F exprimierenden Zellen führt zur Ausbildung unterschiedlicher Krankheitsmuster in von der Mutation betroffenen Patienten. Eine Kategorie der durch Jak2-V617F induzierten Krankheiten wird als myeloproliferative Neoplasien bezeichnet.

Myeloproliferative Neoplasien (MPN) sind eine Gruppe verschiedener chronischer Er-

krankungen des Knochenmarks. Dabei kommt es zur dysregulierten Hämatopoese pluripotenter Stammzellen aus dem Knochenmark zu zellulären Blutbestandteilen, wie den Leukozyten, Erythrozyten oder Thrombozyten. Zu den häufigsten Formen der MPN gehören die Polyzythämie vera (PV), die essentielle Thrombozythämie (ET), die primäre Myelofibrose (PMF) und die chronische myeloische Leukämie (CML). Im Jahr 2005 wurde Jak2-V617F erstmals mit MPN in Verbindung gebracht [51, 52, 53, 46]. Die Expression von Jak2-V617F ist mit der Ausbildung des Krankheitsbildes in nahezu allen PV-Patienten und in ca. der Hälfte aller ET und PMF-Patienten assoziiert. Die mit der Jak2-V617F verbundene konstitutive Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen wirkt ähnlich einer erhöhten Epo-Konzentration im Blut und induziert eine Überproduktion von Blutzellen und somit fester Blutbestandteile. Aufgründdessen bilden Patienten Symptome, wie Thrombose, eine erhöhte Blutungsneigung bzw. verlängerte Blutungen und, im fortgeschrittenen Stadium, eine Hepato- und Splenomegalie aus [54].

Patienten die eine Jak2-V617F assoziierte MPN aufweisen, werden vornehmlich mit Inhibitoren für Janus-Kinasen behandelt. Jedoch bilden viele Patienten eine Resistenz gegenüber diesen Jak-Inhibitoren aus [55]. Für die Entwicklung neuer Therapieansätze, die die pathologische konstitutive Aktivierung der Jak/STAT-, MAPK- oder PI3K/Akt-Signalwege in Jak2-V617F-positiven Zellen inhibieren können, ist es nötig nach anderen potentiellen Zielproteinen in diesen Signalwegen zu forschen. Um neue mögliche Zielproteine für Therapieansätze zu identifizieren, müssen die Signaltransduktionsnetzwerke und molekularen Wirkmechanismen der daran beteiligten Signalmoleküle besser verstanden und charakterisiert werden.

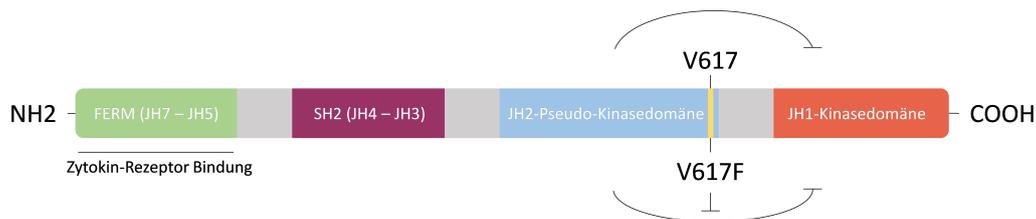


Abbildung 4: Domänenstruktur der Janus-Kinase 2 (Jak2) und deren konstitutiv aktive Mutante Jak2-V617F. Jak2 besitzt eine Kinasedomäne (JH1) und eine Pseudokinasedomäne (JH2). Im Jak2-Wildtyp interagiert die JH2-Domäne mit der JH1-Domäne und inhibiert so die Aktivität der in der JH1-Domäne lokalisierten Kinase. In der Jak2-V617F ist durch den Austausch von Valin zu Phenylalanin an der Aminosäureposition 617 diese inhibitorische Interaktion der JH2- mit der JH1-Domäne gestört. Dadurch wird die konstitutive Aktivität der Jak2-V617F Mutante hervorgerufen.

1.5 Die Jak/STAT Signaltransduktion

Die Jak/STAT-Kaskade wird durch Ligandenbindung eines Jak-assoziierten Zytokinrezeptors oder durch die konstitutiv aktive an Zytokin-Rezeptoren assoziierte Jak2-V617F Mutante induziert. Sowohl in der Epo- als auch in der IL-6-induzierten Signaltransduktion erfolgt nach Liganden-abhängiger Aktivierung der Zytokin-Rezeptoren die Autophosphorylierung der Jaks. Durch diese Phosphorylierung erhöht sich die Aktivität der Tyrosinkinase-Domäne der Jaks [56]. Die konsitutiv aktive Jak2-V617F dagegen ist liganden-unabhängig phosphoryliert und aktiv [46]. Die phosphorylierten Jaks (pJak) phosphorylieren Tyrosylreste im zytoplasmatischen Teil des Zytokin-Rezeptors. Die phosphorylierten Tyrosylreste stellen Bindungsstellen dar, die durch Moleküle, die eine SH2-Domäne beinhalten, erkannt und gebunden werden. Zu diesen Molekülen gehören u.a. die STATs.

Momentan sind 6 Mitglieder der STAT-Familie (STAT1-6) bekannt [57]. In der Epo-R-vermittelten Signaltransduktion werden STAT3 und STAT5 Epo-abhängig an den Epo-R rekrutiert. Die phosphorylierten Tyrosylreste 343 und 401 im Epo-R stellen Bindestellen für STAT5 dar [58] (Abb. 1 und 5A). STAT3 bindet das phosphorylierte Y431 im Epo-R. In der IL-6-induzierten Signaltransduktion werden unterdessen STAT1 und STAT3 an gp130 rekrutiert [59]. Die STAT-Faktoren binden an die phosphorylierten Tyrosylreste 767, 814, 905 und 915 des gp130 [60] (Abb. 2 und 5B).

Sowohl die am Epo-R als auch die an gp130 assoziierten Jaks phosphorylieren die gebundenen STAT-Moleküle. Danach dissoziieren die phosphorylierten STAT-Faktoren von den Zytokin-Rezeptoren. Die phosphorylierten STATs bilden nach Dissoziation vom Rezeptor Homo- oder Heterodimere aus, die in den Zellkern translozieren. Im Zellkern dienen die STAT-Dimere als Transkriptionsfaktoren, die an Promotoren und Enhancer-Elemente von Zielgenen binden [61]. In der Epo-R-vermittelten Jak/STAT-Kaskade sind u.a. anti-apoptotische und Zellzyklus modulierende Zielgene, wie *Bcl-xl* und *cyclin D2*, beschrieben, deren Induktion die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen u.a. zu Erythrozyten und deren Proliferation bewirken [62, 63, 64]. IL-6-abhängig werden STAT-abhängige Zielgene u.a. für *cell division control 25a* (*Cdc25a*) und *major histocompatibility complex 1* (MHC1) induziert, die auf den Zellzyklus wirken oder immunmodulatorische Bedeutung haben [65, 66].

Eine persistente Aktivierung der Jak/STAT-Signaltransduktion wird u.a. durch die Induktion von *feedback* Inhibitoren verhindert. So sind weitere Zielgene der STAT-Transkriptionsfaktoren u.a. SOCS -Familie kodierende Gene. Derzeit sind acht Mitglieder der SOCS-Familie bekannt. Dazu gehören *cytokine-inducible SH2 domain containing protein* (CIS) und SOCS1 bis -7. SOCS sind klassische *feedback*-Inhibitoren, deren Expression durch Zytokine, wie Epo oder IL-6 induziert wird.

Die Epo-R-vermittelte STAT-Aktivierung induziert die Expression der *feedback* Inhibitoren CIS und SOCS1-3. Die IL-6-abhängige STAT-Aktivierung führt zur Expression von SOCS1 und SOCS3 [67, 68] (Abb. 5). Dabei ist die Wirkung der verschiedenen SOCS-Familie Proteine unterschiedlich. CIS, SOCS1 und SOCS3 wirken negativ auf die Epo-induzierte STAT3 und STAT5-Phosphorylierung, wohingegen SOCS2 keinen Einfluss auf die Epo-induzierte Signaltransduktion zu nehmen scheint [69]. In der IL-6-induzierten Signaltransduktion inhibieren SOCS1 und SOCS3 die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3. Als Negativregulatoren wirken SOCS1 und SOCS3 inhibierend auf die Kinaseaktivität von Jaks [70]. Mittels seiner SH2-Domäne bindet SOCS3 an den phosphorylierten Tyrosylrest 401 im Epo-R [71] bzw. an das phosphorylierte Tyrosin 759 in gp130 [72]. Für SOCS1 ist dagegen keine Bindestelle im Epo-R und gp130 beschrieben. Jedoch weisen sowohl SOCS1 als auch SOCS3 eine *kinase inhibitory region* (KIR)-Domäne auf. Die Bindung der KIR-Domäne von SOCS1 und SOCS3 an Jak inhibiert die Kinaseaktivität von Jak [70]. SOCS1 und SOCS3 rekrutieren zudem Komponenten eines E3 Ubiquitin-Ligase Komplexes und induzieren somit die Ubiquitinylierung und die proteasolame Degradation von Jak [73, 74, 75]. Der Epo-induzierte *feedback* Inhibitor CIS bindet an das phosphorylierte Tyrosin 401 im Epo-R [76, 77]. Durch die Bindung von CIS am phosphorylierten Tyrosin 401 wird die Bindung von STAT5 an dieses phosphorylierte Tyrosin sterisch inhibiert [78] (Abb. 5). Die Rekrutierung von CIS an den Epo-R inhibiert die Epo- und Jak2-V617F-induzierte Proliferation [79].

Neben den durch STAT induzierten *feedback* Inhibitoren wirken auch konstitutiv exprimierte Phosphatasen, wie SHP1 und SHP2 durch die Dephosphorylierung und Inaktivierung von Signalproteinen als Negativregulatoren der Zytokin-induzierten Signaltransduktion.

Sowohl SHP1 als auch SHP2 weisen zwei N-terminale SH2-Domänen, eine Phosphatase Domäne und C-terminale Tyrosylreste auf.

SHP1 wird vor allem in hämatopoetischen Zellen exprimiert [80] wohingegen SHP2 ubiquitär exprimiert wird [81]. SHP1 bindet an das phosphorylierte Tyrosin 431 im Epo-R [82] (Abb. 5A). Der genaue Regulationsmechanismus der Aktivierung der Phosphatasefunktion von SHP1 und die Bedeutung der Bindung von SHP1 an den Epo-R ist noch nicht verstanden. Bisher ist aber bekannt, dass durch eine direkte Interaktion von SHP1 mit Jak2 die Dephosphorylierung und somit Inaktivierung von Jak2 katalysiert wird [83].

Der Regulationsmechanismus der Phosphataseaktivität von SHP2 ist bereits detaillierter aufgeklärt. Zunächst interagiert die N-terminale SH2-Domäne von SHP2 intramolekular mit der Phosphatasedomäne. In dieser Konformation wird die Phosphatasedomäne sterisch blockiert und ist nicht in der Lage phosphorylierte Substrate zu binden [84, 85]. Liganden-induziert bindet SHP2 mittels seiner SH2-Domänen an das phosphorylierte Tyrosin 401 im Epo-R bzw. an das phosphorylierte Tyrosin 759 im gp130 [86, 60] (Abb. 5). Die Bindung der N-terminalen SH2-Domäne an diese Phosphotyrosine induziert die Konformationsänderung von SHP2. Diese Konformationsänderung bewirkt die Auflösung der intramolekularen autoinhibitorischen Interaktion der N-terminalen SH2-Domäne mit der Phosphatasedomäne [87]. In dieser Konformation ist die Phosphatasedomäne freigelegt und kann phosphorylierte Substrate binden und dephosphorylieren. Substrate von SHP2 sind u.a. phosphorylierte Jak und STAT [88, 89, 90].

Die C-terminalen Tyrosylreste in SHP1 und SHP2 werden Zytokin-induziert durch Jak phosphoryliert [91]. Die Phosphorylierung dieser C-terminalen Tyrosine bedingt die intramolekulare Interaktion der phosphorylierten Tyrosine mit den N-terminalen SH2-Domänen von SHP2. Aber auch die SH2-Domänen des Proteins Grb2 binden an die C-terminalen phosphorylierten Tyrosine in SHP1 und SHP2 [92, 93, 94]. Somit besitzen SHP1 und SHP2 sowohl Funktionen als Phosphatasen als auch als Adapterproteine. Die Rekrutierung von SHP1 und SHP2 an den phosphorylierten Epo-R bzw. an gp130 und die Bindung von Grb2 an SHP1 bzw. SHP2 führt auch zur Aktivierung der Epo- und IL-6-induzierten MAPK-Kaskade [95].

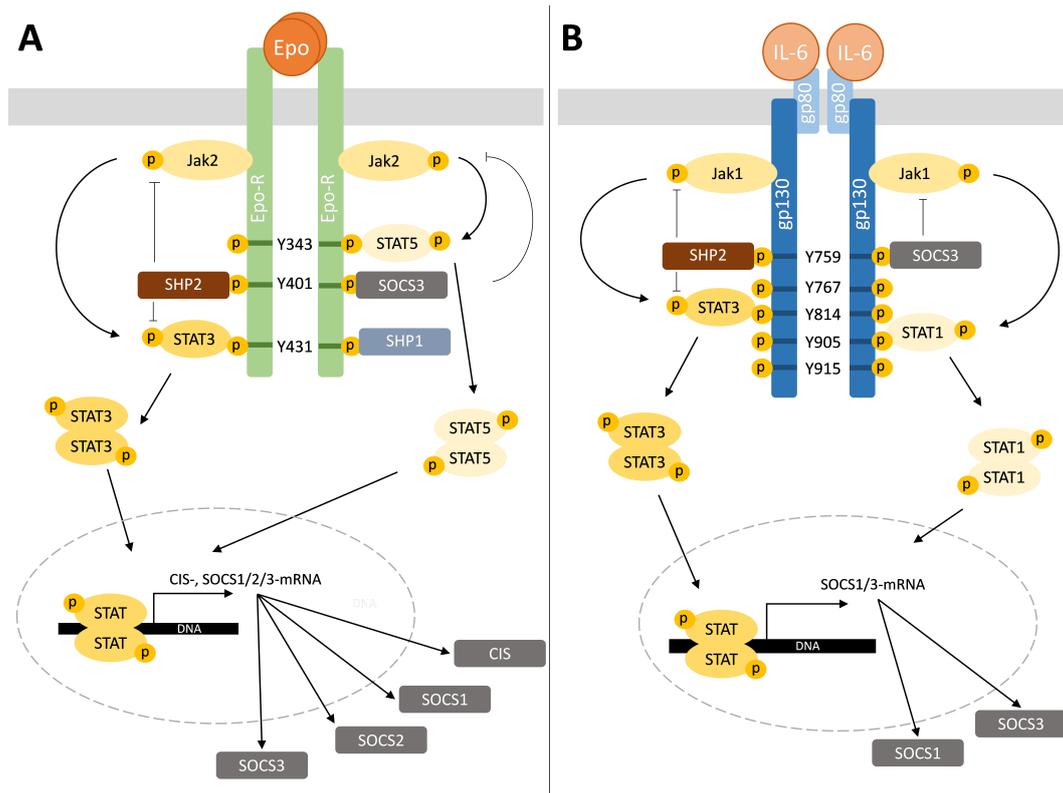


Abbildung 5: Schematische Darstellung der durch Epo- und IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion. Die Epo-induzierte Konformationsänderung des Epo-R hat die Transphosphorylierung der mit Epo-R (A) und die IL-6-induzierte Rezeptorkomplexassemblierung hat die Transphosphorylierung der mit gp130 (B) assoziierten Jak zur Folge. Phosphorylierte und aktivierte Jak phosphorylieren Tyrosine im intrazellulären Abschnitt des Epo-R bzw. des gp130. Die phosphorylierten Tyrosylreste sind Bindungsstellen für STAT. Nach Bindung von STAT an den Epo-R oder gp130 wird STAT phosphoryliert. Infolgedessen dissoziiert STAT vom Rezeptor und bildet STAT-Dimere. Die STAT-Dimere translokieren in den Zellkern und induzieren Epo-abhängig u.a. die Expression von SOCS1-3 und CIS (A) oder IL-6-abhängig u.a. die Expression von SOCS1 und SOCS3. Sowohl die Bindung von SHP1/2 als auch die Bindung von CIS/SOCS an den Epo-R bzw. gp130 wirken inhibierend auf die Phosphorylierung von STAT. Somit wirken sowohl *feedback* Inhibitoren der SOCS-Familie als auch Phosphatasen, wie SHP1/2, inhibierend auf den Jak/STAT-Signalweg.

1.6 Die MAPK-Kaskade

Janus Kinasen sind in der Lage die Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2 nach deren SH2-vermittelter Bindung an den Epo-R oder an gp130 zu phosphorylieren [86, 96]. Sowohl in SHP1 als auch in SHP2 dienen C-terminale Tyrosine im phosphorylierten Zustand dem Protein Grb2 als Bindestellen [93, 94] (Abb. 6). Im Gegensatz zu gp130 besitzt der Epo-R zudem nach Phosphorylierung des Tyrosins 464 eine Bindestelle für Grb2, an die Grb2 unabhängig von SHP1 oder SHP2 bindet [97] (Abb. 6A).

Grb2 bindet konstitutiv an *son of sevenless* (SOS). Der Grb2:SOS-Komplex wird sowohl bei der Interaktion mit SHP1 bzw. SHP2 als auch mit dem Epo-R in die Nähe der Plasmamembran rekrutiert. SOS ist ein *guanine nucleotide exchange factor* (GEF). SOS katalysiert den Austausch von an *Rat sarcoma* (Ras) gebundenem Guanidin-Diphosphat (GDP) durch Guanidin-Triphosphat (GTP). Dadurch wird Ras sterisch neu konfiguriert, wodurch es in der Lage ist mit *rat fibrosarcoma* (Raf) zu interagieren. Durch die Interaktion von Raf mit Ras wird Raf aktiviert. Raf ist eine von drei nacheinander geschalteten Serin/Threonin-Kinasen die durch Phosphorylierung aktiviert werden. Aktivierte

Raf phosphoryliert anschliessend die nachfolgende dualspezifische Serin/Threonin- und Tyrosinkinase MAPK Kinase (Mek). Am Ende dieser Kaskade wird die Serin/Threonin-Kinase *extracellular signal regulated kinase* (Erk/MAPK) von Mek phosphoryliert. Erk phosphoryliert im aktivierten Zustand u.a. Transkriptionsfaktoren (Abb. 6). Die phosphorylierten und somit aktivierten Transkriptionsfaktoren induzieren die Transkription bestimmter z. B. anti-apoptotischer Zielgene, wie *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) oder proliferativer Zielgene, die z.B. für Zytokine kodieren [98].

Neben der durch aktivierte Zytokin-Rezeptoren vermittelten Aktivierung der MAPK-Kaskade haben *multi-site docking* Proteine aus der *Src homologous-collagen homologue* (SHC)- oder *Grb2-associated binder* (Gab)-Familie starken Einfluss auf die Aktivierung der MAPK-Kaskade. Die Rekrutierung von Grb2 oder SHP2 an *multi-site docking* Proteine verstärkt u.a. die IL-6-induzierte Aktivierung der MAPK-Kaskade [99, 100, 101].

In Jak2-V617F-positiven Zellen ist eine zytokin-unabhängige konstitutive Aktivierung der MAPK-Kaskade zu beobachten [102, 103]. Die Bedeutung von *multi-site docking* Proteinen für die pathologische Aktivierung der MAPK in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion ist aber noch nicht untersucht. Die *multi-site docking* Proteine könnten auch in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion einen amplifizierenden Effekt auf die MAPK-Kaskade und somit auf die pathologische Proliferation von Blutzellen haben. Die durch *multi-site docking* Proteine vermittelten Protein-Protein-Interaktionen bzw. deren Regulation könnten somit mögliche neue Ziele therapeutischer Maßnahmen zur Verminderung der krankheits-assoziierten Symptome bei von myeloproliferativen Neoplasien betroffenen Patienten sein.

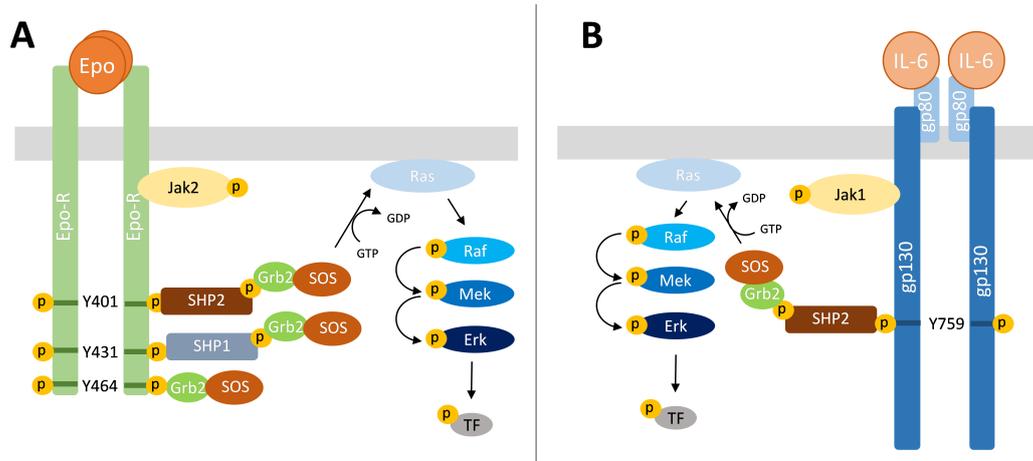


Abbildung 6: Aktivierungsmechanismen der Epo- und der IL-6-induzierten MAPK-Kaskade. Die Rekrutierung von SHP1/2 an den EpoR (A) und SHP2 an gp130 (B) hat die Phosphorylierung von SHP2 durch Jak zur Folge. Phosphorylierte SHP1/2 rekrutiert den Grb2:SOS-Komplex an die Plasmamembran. Der Epo-R (B) besitzt nach Phosphorylierung Bindestellen für den Grb2:SOS-Komplex, wodurch SOS SHP1/2-unabhängig an den Rezeptor und in die Nähe der Plasmamembran rekrutiert werden kann. SOS induziert im Membran-assoziierten Ras den Austausch von GDP zu GTP und eine Konformationsänderung. Ras ist in dieser Konformation in der Lage mit Raf zu interagieren und Raf somit zu aktivieren. Aktiviertes Raf phosphoryliert und aktiviert Mek. Mek wiederum phosphoryliert und aktiviert Erk. Erk aktiviert u.a. Transkriptionsfaktoren (TF), die die Genexpression MAPK-abhängiger anti-apoptotischer und proliferativer Zielgene induzieren.

1.7 Das *multi-site docking* Protein Gab1

Das *multi-site docking* Protein Gab1 ist Mitglied der Gab-Familie. Bisher sind 3 Gab-Proteine in Säugerzellen beschrieben [104, 105, 106]. Alle Gab-Proteine weisen eine

ähnliche Struktur auf. Sie besitzen gefaltete N-terminale Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen und einen ungeordneten C-terminalen Bereich (Abb. 7). Daher gehören Gab-Proteine zu den intrinsisch ungeordneten Proteinen (*intrinsically disordered proteins* (IDP)) [107, 108, 109]. Die N-terminale PH-Domäne interagiert mit in der Plasmamembran lokalisiertem Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) [110, 111, 101].

In der Epo-R- und gp130-vermittelten Signaltransduktion wird Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert [58, 112, 113]. PI3-Kinasen sind aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen Untereinheit (p110) aufgebaut. Aktiviertes p110 katalysiert die Phosphorylierung der 3'-OH-Gruppe von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu PIP3 in der Plasmamembran [114]. Die Epo- und IL-6-induzierte Signaltransduktion induziert somit die PH-vermittelte Translokation von PH-Domänen-Proteinen, wie Gab1 [101, 103].

Im ungeordneten C-terminalen Bereich der Gab-Proteine befinden sich u.a. Prolin-reiche Regionen (Abb. 7). Die Aminosäurepositionen 518 bis 528 umfassende Prolin-reiche Region in Gab1 wird von der SH3-Domäne von Grb2 konstitutiv gebunden [104, 115]. Im Gegensatz zu Gab2 und Gab3 besitzt Gab1 mit der c-Met Bindedomäne (MBD) eine weitere Prolin-reiche Region (Abb. 7). Diese Prolin-reiche Region in Gab1 kann mit dem Rezeptor c-Met interagieren [116].

Gab1 wird in der Epo- und IL-6-induzierten Signaltransduktion, aber auch Jak2-V617F-induziert, an Serinen, Threoninen und Tyrosinen phosphoryliert [117, 118, 103]. Die Bedeutung der Phosphorylierung der Serine und Threonine in Gab1 ist bisher nur wenig verstanden. Dagegen ist bekannt, dass die phosphorylierten Tyrosine in den Gab-Proteinen als Bindestellen für SH2-Domänen Proteine dienen. Die Rekrutierung von SH2-Domänen Proteinen an Gab-Proteine führt zur Bildung eines Gab-Komplexes. Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob die ungeordnete Konformation des C-terminalen Bereichs Auswirkungen auf die Regulation der Phosphorylierung und der Komplexbildung der Gab-Proteine hat [108].

Phosphoryliertes Tyrosin 317 in Gab1 dient als Bindestelle für *Ras GTPase activating protein* (RasGAP). Nach Phosphorylierung des Tyrosylrestes 472 in Gab1 bindet PI3K an dieses phosphorylierte Tyrosin. SHP2 bindet an die phosphorylierten Tyrosine 627 und 659 in Gab1 [100] (Abb. 7). Gab1 dient somit als Plattform zur Bindung verschiedener Signalproteine u.a. auch in der Epo- und IL-6-induzierten Signaltransduktion [117, 118]. Dagegen ist die Rekrutierung von Interaktionspartnern an Gab1 in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion bisher kaum untersucht.

Die an Gab1 rekrutierten Proteine wirken auf Membran-assoziierte Moleküle und Proteine, wie PIP2 und Ras. Die Zytokin-induzierte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran könnte daher entscheidend für die Wirkung der an Gab1 rekrutierten Proteine auf ihre Zielproteine sein.

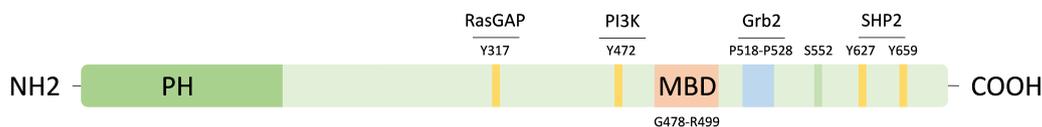


Abbildung 7: Domänenstruktur von Gab1. Gab1 besitzt eine N-terminale PH-Domäne. Im C-terminalen Bereich von Gab1 sind Prolin-reiche Regionen wie die Grb2 Bindestelle und die c-Met-Bindedomäne (MBD). Tyrosine, die im phosphorylierten Zustand RasGAP, PI3K, Grb2 und SHP2 als Bindestellen dienen, sind ebenfalls im C-terminalen Bereich von Gab1 lokalisiert.

1.7.1 Gab1 Membranrekrutierung

Gab1 kann über mehrere Mechanismen an oder in die Nähe der Plasmamembran rekrutiert werden.

Eine Möglichkeit für die Rekrutierung von Gab1 in die Nähe der Plasmamembran ist in der *hepatocyte growth factor* (HGF)-induzierten Signaltransduktion beschrieben. In der HGF-induzierten Signaltransduktion wird Gab1 durch die Interaktion der c-Met-Bindedomäne mit c-Met in die Nähe der Plasmamembran rekrutiert [119] (Abb. 8).

Gab1 kann auch durch Grb2 an Rezeptoren rekrutiert werden [120]. Einige phosphorylierte Tyrosine in Zytokin-Rezeptoren, wie dem *epidermal growth factor receptor* (EGF-R) oder dem Epo-R (Abb. 6A), stellen Bindestellen für die SH2-Domäne von Grb2 dar [121]. Die *epidermal growth factor* (EGF)-induzierte Phosphorylierung des EGF-R induziert die Rekrutierung des Grb2:Gab1-Komplexes an den EGF-R [122] (Abb. 8). Bisher ist nicht bekannt, ob die Rekrutierung von Grb2 an den Epo-R die Rekrutierung des Grb2:Gab1-Komplexes an den Epo-R bewirkt.

Ein weiterer Mechanismus zur Translokation von Gab-Proteinen an die Plasmamembran wird über die N-terminale PH-Domäne der Gab-Proteine vermittelt [123]. Die PH-Domäne interagiert mit PIP3 in der Plasmamembran [110, 111]. Die Aktivierung der PI3K ist essentiell für die PH-Domänen-vermittelte Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran [111, 101] (Abb. 8). Die PH-Domänen-vermittelte Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran wird u.a. durch IL-6 und die konstitutiv aktive Jak2-V617F Mutante induziert [101, 103].

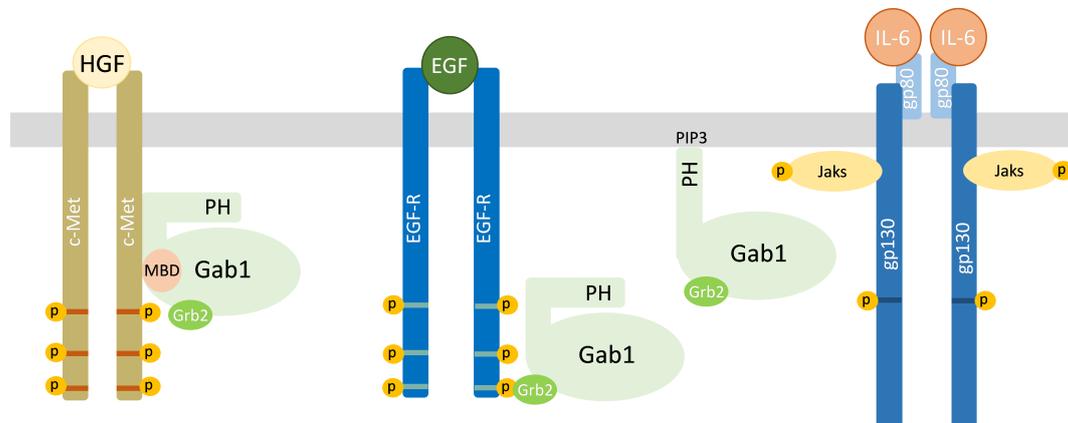


Abbildung 8: Rekrutierungsmechanismen von Gab1 an die Plasmamembran. Gab1 besitzt eine Met-Bindedomäne (MBD), die mit dem Liganden-gebundenem c-Met interagieren kann. Einige Rezeptoren, wie der *epidermal growth factor receptor* (EGF-R), weisen nach Tyrosinphosphorylierung Bindestellen für Grb2 auf. Die konstitutive Interaktion von Gab1 an Grb2 führt dann zur Grb2-vermittelten Rekrutierung des Gab1:Grb2-Komplexes an den phosphorylierten EGF-R. Alle Gab-Familien Proteine besitzen eine N-terminale PH-Domäne. Diese PH-Domäne ermöglicht es den Gabs, unabhängig von einer Interaktion mit Rezeptoren, an die Plasmamembran rekrutiert zu werden.

Jedoch wird die PH-Domänen vermittelte Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran nicht nur durch die PI3K-Aktivität reguliert. Die Translokation von Gab1 wird vielmehr durch ein Zusammenspiel der aktivierten PI3K- und der MAPK-Kaskade induziert [101, 103]. Es konnte ein Serin an der Aminosäureposition 552 in Gab1 identifiziert werden, welches bei der Regulation der Translokation von Gab1 an PIP3 eine Rolle spielt [101]. Aktiviertes Erk2 phosphoryliert Gab1 an mehreren Serin- und Threoninres-

ten [124, 125]. Das Serin 552 in Gab1 könnte daher auch MAPK-abhängig phosphoryliert werden (Abb. 9). Die Phosphorylierung des Serins 552 im ungeordneten C-terminalen Bereich von Gab1 könnte eine Konformationsänderung hervorrufen. In der veränderten Konformation wäre die PH-Domäne in der Lage an PIP3 in der Plasmamembran zu binden (Abb. 9). Ob und wie dieser Mechanismus der PH-vermittelten Membrantranslokation von Gab1 z.B. in der Epo- oder IL-6-induzierten Signaltransduktion reguliert ist, ist bisher nicht verstanden. Es ist auch unbekannt, ob ein solcher Mechanismus in Jak2-V617F exprimierenden Zellen dysreguliert ist und welche Auswirkungen eine potentielle Dysregulation auf die Signaltransduktion dieser Jak2-V617F-positiven Zellen hat.

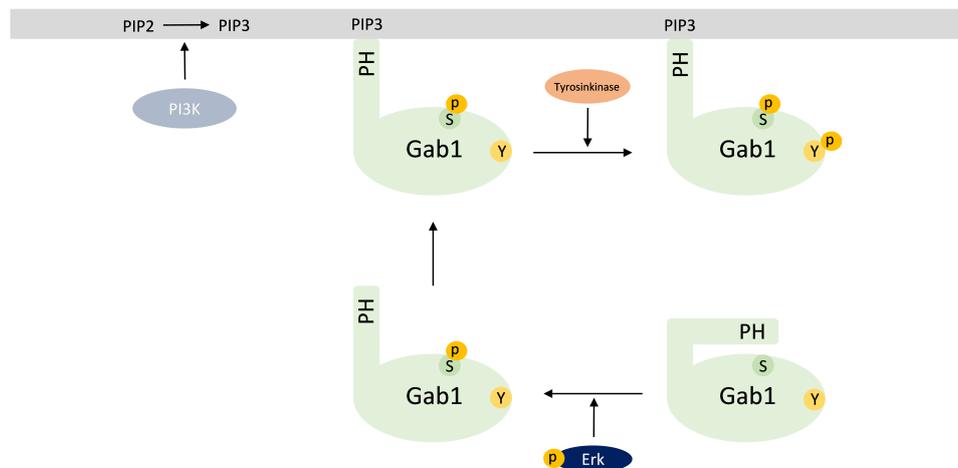


Abbildung 9: Hypothese zum Mechanismus der PH-vermittelten Gab1 Membrantranslokation. Die Erk-abhängige Phosphorylierung des Serins 552 könnte in Gab1 eine Konformationsänderung induzieren. Infolgedessen wäre die PH-Domäne in der Lage mit PIP3 in der Plasmamembran zu interagieren, wodurch Gab1 an die Plasmamembran rekrutiert wird. Durch die Lokalisation an der Plasmamembran könnte Gab1 durch Tyrosinkinasen, die z.B. wie Jaks an Membranrezeptoren lokalisiert sind, phosphoryliert werden.

1.7.2 Bedeutung der Gab1 Membranrekrutierung für die Phosphorylierung von Gab1

Bisher ist nicht eindeutig geklärt, welche Kinasen Gab1 in Abhängigkeit von dessen zellulären Lokalisation phosphorylieren. Bei fehlender Membrantranslokation von Gab1 in der gp130-vermittelten Signaltransduktion, wird Gab1 nicht am Tyrosin 627 phosphoryliert wird [101].

In der Epo- und IL-6-induzierten Signaltransduktion könnte Gab1 ein potentielles Substrat der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen der Jak-Familie sein.

In anderen Studien wird Gab1 auch als Substrat der Tyrosinkinasen der Src-Kinasen-Familie (SFK) beschrieben [126, 127, 128, 129]. So ist die in hämatopoetischen Zellen exprimierte Src-Familie Kinase *hematopoietic cell kinase* (Hck) essentiell für die IL-6-induzierte Tyrosinphosphorylierung von Gab1 und Gab2 [127]. SFKs werden posttranslational myristoyliert und palmitoyliert. Dabei werden die Fettsäuren Myristin- und Palmitinsäure an Glycine und Cysteine von Proteinen konjugiert. Diese posttranslationalen Modifikationen ermöglichen die direkte Interaktion der modifizierten Proteine mit Zellmembranen. SFKs können daher an der Plasmamembran lokalisiert sein [130, 131].

Gab1 würde somit erst nach Rekrutierung an die Plasmamembran in die Nähe der Jaks

oder SFKs gelangen und an seinen Tyrosinen phosphoryliert werden können (Abb. 9).

Werden die Tyrosine in Gab1 phosphoryliert, binden die Interaktionspartner, die eine SH2-Domäne besitzen, an Gab1. Die Funktion von Gab1 als Plattform zur Bindung von Signalproteinen würde somit stark von dessen Lokalisation an der Plasmamembran abhängen.

1.7.3 Gab1 Komplexbildung und deren Bedeutung für die Verschaltung und Verstärkung von Signalwegen

Die Zytokin-induzierte Phosphorylierung des *multi-site docking* Proteins Gab1 induziert die Bindung von verschiedenen Proteinen mit SH2-Domänen an Gab1. Die Regulation der Gab1-vermittelten Komplexbildung in der IL-6- und Epo-induzierten Signaltransduktion ist bisher nur wenig verstanden. Es ist auch unbekannt, ob es zu einer Jak2-V617F-induzierten Komplexbildung von Gab1 und dessen Interaktionspartnern kommt und welchen Einfluss die Komplexbildung auf die dysregulierte Signaltransduktion in Jak2-V617F positiven Zellen hat.

Nach Phosphorylierung von Gab1 bindet SHP2 an die phosphorylierten Tyrosine 627 und 659 in Gab1 [132]. Es ist nicht bekannt, ob phosphoryliertes SHP2 an Gab1 bindet oder ob SHP2 erst nach Bindung an Gab1 phosphoryliert werden kann. Die phosphorylierten Tyrosine 542 und 580 in SHP2 dienen jedoch als Bindestelle für den Grb2:SOS-Komplex (Abb. 10). Durch die Gab1-vermittelte Translokation des Grb2:SOS-Komplexes an die Membran kann SOS mit Ras interagieren und somit die MAPK-Kaskade Gab1-abhängig aktivieren [133]. Diese Gab1-vermittelte MAPK-Aktivierung könnte verstärkend auf die initial durch gp130 oder Epo-R vermittelte Aktivierung der MAPK-Kaskade wirken und könnte somit amplifizierend auf die Proliferation von Epo- bzw. IL-6-responsiven Zellen wirken [133, 134]. Die fehlende Expression von Gab1 in Gab1-defizienten Mäusen führt in der Tat zur Reduktion der Zytokin-induzierten Aktivierung der MAPK-Kaskade und weiterhin zu lethalen Entwicklungsstörungen in der Embryogenese Gab1-defizienter Mäuse [133]. Die Expression von Gab1 hat somit bereits in der Embryogenese eine entscheidende physiologische Bedeutung.

Die proliferative Wirkung der MAPK-Kaskade macht aber auch eine Regulation dieser Kaskade zur Vermeidung unkontrollierten Zellwachstums unabdingbar. Ein Negativregulator der MAPK-Kaskade ist RasGAP, das die MAPK-Kaskaden aktivierende Interaktion von Raf mit Ras inhibieren kann. Wird RasGAP an die Plasmamembran und somit in die Nähe von Ras rekrutiert, wird die intrinsische GTPase-Funktion von Ras aktiviert. Die GTPase katalysiert die Hydrolyse des in Ras gebundenen GTPs, wodurch es zur Inhibierung der Interaktion von Raf mit Ras kommt. Phosphoryliertes Tyrosin 317 in Gab1 dient als Bindestelle für RasGAP. Durch Interaktion von RasGAP mit Gab1 wird RasGAP an die Plasmamembran und somit in die Nähe von Ras rekrutiert (Abb. 10).

Die Gab1:RasGAP Interaktion wird durch die Phosphatase-Funktion von an Gab1 gebundenen SHP2 reguliert. In Analogie zur Bindung von SHP2 an den Epo-R oder gp130, bewirkt die Bindung der SHP2-SH2-Domänen an Gab1 die Aufhebung der inhibitorischen intramolekularen Interaktion der Phosphatase-Domäne mit den SH2-Domänen in SHP2. Die nach Bindung von SHP2 an Gab1 aktivierte Phosphatasedomäne dephosphoryliert u.a. das phosphorylierte Tyrosin 317 in Gab1. SHP2 verhindert so die Gab1:RasGAP Interaktion und somit die RasGAP-vermittelte Inhibition der MAPK-Kaskade [135, 136]. Somit könnte neben der Adapterfunktion von SHP2 durch die Rekrutierung des Grb2:SOS-Komplexes an phosphoryliertes SHP2 auch die Phosphatasefunktion von SHP2 amplifizierend auf die MAPK-Kaskade wirken. Diese Bedeutung der Gab1:SHP2 Interaktion für die Amplifikation der Aktivierung der MAPK-Kaskade wurde bereits in einigen Studien, u.a. auch für die IL-6-induzierte MAPK-Aktivierung, bestätigt [101, 137, 138, 139].

Neben der MAPK-Kaskade wird auch die Aktivierung der PI3K durch Gab1 beeinflusst. Durch die Phosphorylierung von Gab1 werden Bindestellen für die regulatorische Untereinheit p85 der PI3K an Gab1 bereitgestellt. Die durch Gab1-vermittelte Translokation von aktivierter PI3K könnte somit die vermehrte Synthese von PIP3 in der Plasmamembran bewirken, wodurch mehr potentielle Bindestellen für PH-Domänen-Proteine in der Plasmamembran generiert werden (Abb. 10). An PIP3 in der Plasmamembran binden auch die Proteine *phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK1) und Proteinkinase B (PKB/Akt). Nach Bindung der Serin/Threonin-Kinasen PDK1 und Akt an die Plasmamembran phosphoryliert PDK1 Akt, wodurch die PI3K-Kaskade induziert wird [140]. In der PI3K-Kaskade werden nachfolgend die für die Regulation der Translation bedeutenden mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-Komplexe aktiviert [141]. Die Gab1-vermittelte Aktivierung der PI3K könnte verstärkend auf die initiale durch den Epo-R oder die gp130-vermittelte Aktivierung der PI3K und somit auch amplifizierend auf die nachfolgende PI3K/Akt-Kaskade wirken [142].

Die Gab1-vermittelte Lokalisation der Gab1-Bindungspartner an die Plasmamembran ist essentiell für deren Funktion. Gab1 kann somit eine Verschaltung und Amplifikation von an der Plasmamembran regulierten Signalprozessen, wie der Aktivierung der PI3K- und MAPK-Kaskade, vermitteln.

In der durch die konstitutiv aktive Jak2-V617F induzierten Signaltransduktion werden die MAPK- und PI3K-Kaskade pathophysiologisch aktiviert [143]. Dadurch kommt es zur dysregulierten Proliferation Jak2-V617F-positiver hämatopoetischer Vorläuferzellen und zur Ausbildung der für MPN Patienten beschriebenen Symptome. Auch die Phosphorylierung des *multi-site docking* Proteins Gab1 konnte in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion identifiziert werden [103]. Ob es auch durch die Jak2-V617F-induzierte Phosphorylierung von Gab1 zur Bindung von Interaktionspartnern an Gab1 und zur damit verbundenen Amplifikation der MAPK- und PI3K-Kaskade kommt, ist bisher unbekannt. So könnte die pathophysiologische MAPK- und PI3K-Aktivierung in Jak2-V617F-positiven Zellen durch Gab1 verstärkt werden. Die pharmakologische Prävention der Gab1-vermittelten Signalverschaltung und -amplifikation könnten somit mögliche therapeutische Ansätze zur Behandlung von myeloproliferativen Neoplasien darstellen.

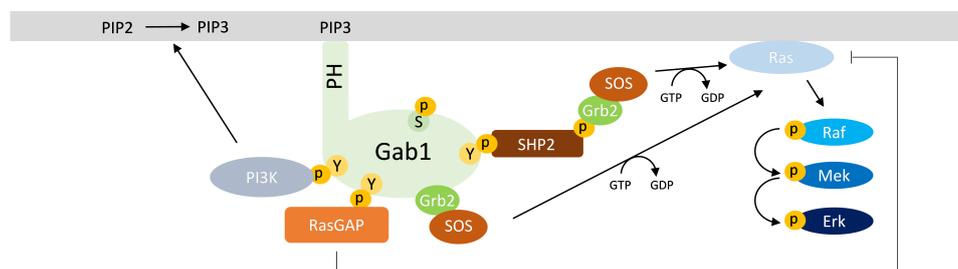


Abbildung 10: Gab1 als Interaktions-Plattform zur Verschaltung und Regulation der PI3K-Aktivität und der MAPK-Kaskade. Gab1 ist konstitutiv mit Grb2 assoziiert. Durch die Phosphorylierung von Gab1 können weitere Signalmoleküle, wie SHP2, PI3K oder RasGAP mit Gab1 interagieren. Durch die Gab1-vermittelte Rekrutierung dieser Signalmoleküle an die Plasmamembran sind diese in der Lage auf die MAPK- und PI3K-Kaskade positiven oder negativen Einfluss zu nehmen.

2 Ziele der Arbeit

Das *multi-site docking* Protein Gab1 stellt in vielen Signaltransduktionsnetzwerken eine Plattform zur Verschaltung von Signalwegen dar. Durch die Membrantranslokation und die Rekrutierung von Bindungspartnern, die u.a. die PI3K- und die MAPK-Kaskade aktivieren oder inhibieren können, nimmt Gab1 eine Schlüsselrolle in der Zytokin-induzierten Signaltransduktion ein. Die Regulation der Zytokin-induzierten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran ist noch nicht vollständig verstanden und wird daher in dieser Arbeit untersucht.

Es besteht die Hypothese, dass Gab1 in Abhängigkeit von der MAPK-abhängigen Phosphorylierung des Serins 552 an die Plasmamembran transloziert. Die mit der Phosphorylierung von Serin 552 einhergehende Translokation von Gab1 an die Plasmamembran ist notwendig für die Vermittlung der Tyrosinphosphorylierung von Gab1. Dieser hypothetische Verlauf der Regulation der Gab1 Phosphorylierung und Translokation an die Plasmamembran wird für die physiologische Epo- und IL-6-induzierte Signaltransduktion überprüft.

Gibt es dabei Rezeptor-abhängige Unterschiede in der Zytokin-induzierten Signaltransduktion bei der Regulation der Translokation und der Phosphorylierung von Gab1? Welche Kinasen phosphorylieren die Tyrosine und somit Bindestellen für Interaktionspartner im *multi-site docking* Protein Gab1 in Abhängigkeit von der Lokalisation von Gab1?

Da die Gab1-vermittelte Rekrutierung von Grb2, SHP2 oder RasGAP an die Plasmamembran Einfluss auf das Membran-assoziierte und MAPK-Kaskaden-induzierende G-Protein Ras hat, wird die Bedeutung der Phosphorylierung und Translokation von Gab1 und die Bindung von Interaktionspartnern an Gab1 für die MAPK-Kaskade analysiert.

Es ist bekannt, dass Gab1 auch in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion an die Plasmamembran rekrutiert und am Tyrosin 627 phosphoryliert wird [103]. Die Expression der konstitutiv aktiven Jak2-V617F-Mutante und deren Assoziation mit Oberflächenrezeptoren, wie dem Epo-R in erythroiden Vorläuferzellen, führt zur Entstehung von myeloproliferativen Neoplasien (MPN).

Bisher ist die Rolle von Gab1 in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion und bei der Entstehung von MPN in Jak2-V617F-positiven Patienten unbekannt. Eines der Ziele dieser Arbeit ist daher, die Rolle von Gab1 in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion zu entschlüsseln und zu verstehen.

Welche Bedeutung hat die Jak2-V617F-induzierte und konstitutive Translokation von Gab1 an die Plasmamembran und die Rekrutierung von Interaktionspartnern an Gab1? Führt die dysregulierte Translokation von Gab1 zur pathophysiologischen Verschaltung und Amplifikation der Gab1-abhängigen PI3K- und MAPK-Kaskade in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion? Gibt es Unterschiede bei der Gab1-abhängigen Signalweiterleitung zwischen der physiologischen Epo-induzierten und der pathophysiologischen Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion?

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zum Verständnis der Regulation der Gab1-vermittelten Verschaltung und Amplifikation der proliferativ und anti-apoptisch wirkenden MAPK- und PI3K-Signalwege in Signaltransduktionsnetzwerken dienen. Das Verständnis der Gab1-abhängigen Signaltransduktion kann die Identifikation potentieller Ziele in pathophysiologischen Signaltransduktionsnetzwerken, die durch therapeutische Ansätze behandelt und deren Pathogenität damit vermindert werden könnten, erleichtern.

3 Material und Methoden

Die hier beschriebenen Methoden sind nach Standardprotokollen des Lehrstuhls für Systembiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg verfasst und entsprechend individueller Änderungen modifiziert.

3.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der Qualität *pro analysi* eingesetzt und von den Firmen wie angegeben bezogen.

3.2 Zytokine

Zytokin	Beschreibung
IL-6	Rekombinantes IL-6 (Conaris, Deutschland)
Hyper-IL-6	Rekombinantes Fusionsprotein aus löslichem IL-6-Rezeptor und IL-6 (Conaris, Deutschland)
Epo	Rekombinantes humanes Erythropeotin (Janssen, Deutschland)
mLeptin	Rekombinantes murines Leptin (Peprotech, USA)

3.3 Antikörper

Bezeichnung	Beschreibung (Hersteller)
JAK2	monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen JAK2 (Cell Signaling, USA)
pJAK2	monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die phosphorylierten Tyrosine 1007 und 1008 von Jak2 (Cell Signaling, USA)
STAT3(C20)	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen STAT3 (Santa Cruz Technologies, USA)
pSTAT3	monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin 705 von STAT3 (Cell Signaling, USA)
SHP2(C-18)	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen SHP2 (Santa Cruz Technologies, USA)
pSHP2	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin 542 von SHP2 (Cell Signaling, USA)
Erk1/2	monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Erk1/2 (Cell Signalling Technologies, USA)
pErk1/2	monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen phosphoryliertes Erk1/2 (T202/Y204) (Cell Signalling Technologies, USA)
Gab1	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Gab1 (Merck Millipore, USA)
pY627-Gab1	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin 627 in Gab1
pS552-Gab1	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen phosphoryliertes Serin 552 in Gab1 (zur Verfügung gestellt von AG Prof. S. M. Feller)

Grb2	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Grb2 (Santa Cruz Technologies, USA)
PLC γ	monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen PLC γ (Cell Signalling Technologies, USA)
Akt	polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen Akt1/2 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
pAkt	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen phosphoryliertes Serin 473 in Akt (Cell Signalling Technologies, USA)
RasGAP	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen RasGAP (Merck Millipore, USA)
Epo-R	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen den Erythropoetin-Rezeptor (Santa Cruz Technologies, USA)
GFP	polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen GFP (Rockland, USA)
SOCS3	monoklonaler Ziegen-Antikörper gegen SOCS3 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
α -Tubulin	monoklonaler Maus-Antikörper gegen α -Tubulin (Sigma-Aldrich, USA)
Flag	monoklonaler Maus-Antikörper gegen Flag-Tag (Sigma-Aldrich, USA)
Gab1(H7)	monoklonaler Maus-Antikörper gegen murines Gab1 (Santa Cruz Technologies, USA)
mLR	polyklonaler Maus-Antikörper gegen murinen Leptin-Rezeptor (Sigma-Aldrich, USA)
Ziege-Anti-Maus-IgG	polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen konstante Anteile von Maus-Immunglobulin, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (Southern Biotech, USA)
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG	polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen konstante Anteile von Maus-Immunglobulin, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (Southern Biotech, USA)
Kaninchen-Anti-Ziege-IgG	polyklonaler Ratten-Antikörper gegen konstante Anteile von Ziegen-Immunglobulin, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (Southern Biotech, USA)
Ziege F(ab') ₂ anti-Maus IgG (H+L)-RPE	polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen konstante Anteile von Maus-Immunglobulin, konjugiert mit R-Phycoerythrin (RPE) (Jackson ImmunoResearch, USA)

3.4 Plasmide

Plasmidbezeichnung	Funktion	Resistenz zur Selektionierung
pd2eGFP-N1	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines Fusionsproteins aus Protein und eGFP	Kanamycin
pd2eGFP-N1 mGab1wt-d2eGFP	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines Fusionsproteins von murinem Gab1-WT und eGFP	Kanamycin
pd2eGFP-N1 mGab1-delPH-d2eGFP	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines Fusionsproteins von murinem Gab1- Δ PH und eGFP	Kanamycin
pd2eGFP-N1 mGab1-S552A-d2eGFP 6a	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines Fusionsproteins von murinem Gab1-S552A und eGFP	Kanamycin
pd2eGFP-N1 mGab1-S552E-d2EGFP	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines Fusionsproteins von murinem Gab1-S552E und eGFP	Kanamycin
pd2eGFP-N1 mGab1-R556AR560A-d2EGFP	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines Fusionsproteins von murinem Gab1-R556/R560A und eGFP	Kanamycin
pd2eGFP-N1 mGab1-delGrb2-d2eGFP	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines Fusionsproteins von murinem Gab1- Δ Grb2 und eGFP	Kanamycin
pd2eGFP-N1 mGab1-delShp2-d2eGFP	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines Fusionsproteins von murinem Gab1- Δ SHP2 und eGFP	Kanamycin
pCLG MAPPIT bait mLeptinR	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines chimären Rezeptors aus murinem Leptin-Rezeptor mit verkürztem intrazellulärem Anteil und einem variablen intrazellulären Anteil	Ampicillin
pMG1 MAPPIT bait receptor expression control (EFHA)	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines Fusionproteins, welches den im Vektor pCLG MAPPIT bait mLeptinR kodierten konstanten intrazellulären Anteil des Rezeptors bindet und den intrazellulären Anteil von gp130 trägt	Ampicillin

pXP2d2 MAPPIT rPAP1-luc	Reporterplasmid, welches den Promoterbereich -511 bis +929 des SOCS3 Gens, fusioniert mit der kodierenden Sequenz der Leuchtkäfer-Luziferase trägt	Ampicillin
pCLG MAPPIT bait mLeptinR + wtGab1-Ser-Motiv(AA541-570)	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines chimären Rezeptors aus murinem Leptin-Rezeptor mit verkürztem intrazellulärem Anteil und einer Aminosäuresequenz aus Gab1-WT(AA541-570)	Ampicillin
pCLG MAPPIT bait mLeptinR + Gab1-Ser-Motiv(AA541-570) S552A	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines chimären Rezeptors aus murinem Leptin-Rezeptor mit verkürztem intrazellulärem Anteil und einer Aminosäuresequenz aus Gab1-S552A (AA541-570)	Ampicillin
pCLG MAPPIT bait mLeptinR + Gab1-Ser-Motiv(AA541-570) S552E	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines chimären Rezeptors aus murinem Leptin-Rezeptor mit verkürztem intrazellulärem Anteil und einer Aminosäuresequenz aus Gab1-S552E (AA541-570)	Ampicillin
pCLG MAPPIT bait mLeptinR + Gab1-Ser-Motiv(AA541-570) R556/560A	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines chimären Rezeptors aus murinem Leptin-Rezeptor mit verkürztem intrazellulärem Anteil und einer Aminosäuresequenz aus Gab1-R556/R560A (AA541-570)	Ampicillin
pMG2 MAPPIT prey Gab1-PH (AA1-119)	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines Fusionsproteins bestehend aus der Gab1-PH-Domäne (AA1-119) und dem intrazellulären Anteil von gp130	Ampicillin
pCR3lacZ	Reporterplasmid, welches das Beta-Galactosidase Gen trägt	Ampicillin
pcDNA3.1	Eukaryontischer Expressionsvektor	Ampicillin
pcDNA3.1+ mGab1 wt full length	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von murinem Gab1-WT	Ampicillin
pcDNA3.1+ mGab1 Δ PH	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von murinem Gab1- Δ PH	Ampicillin

pcDNA3.1(+) FLAG muGab1 Δ Grb2	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von murinem Gab1- Δ Grb2	Ampicillin
pcDNA3.1(+) FLAG muGab1 $\Delta\Delta$ SHP2	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von murinem Gab1- Δ SHP2	Ampicillin
pcDNA5/FRT/TO mGab1-wt-6xHis	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von Gab1-WT mit His-Tag und FLP Rekombinations-Zielsequenz (FRT) für die Flp Rekombinase-vermittelte Integration des Vektors in Flp-In TM -Zelllinien	Ampicillin

3.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden über Eurofins MWG Operon (Deutschland) bezogen.

3.5.1 Primer

Bezeichnung	Primer	Beschreibung
p741_ser-bait_fw	5'-AAT AAA AGG ATC CTC AGA ATG GGA AG-3'	<i>Forward</i> Primer zur Klonierung des Abschnitts 1621-1710 des im Plasmid <i>pcDNA3.1+ mGab1 wt full length</i> (#741) kodierten murinen Gab1 wt mit <i>BamHI</i> Restriktionsschnittstelle
p741_ser_bait_bw	5'-AGA GCG CGG CCG CTT ATT ACC GAG GGG AC-3'	<i>Reverse</i> Primer des Abschnitts 1621-1710 des im Plasmid <i>pcDNA3.1+ mGab1 wt full length</i> (#741) kodierten murinen Gab1 wt mit Stoppcodon und NotI Restriktionsschnittstelle
p741_PH_preym_fw	5'-AAT TAA AGA ATT CAT GAG CGG TGG TG-3'	<i>Forward</i> Primer zur Klonierung des Abschnitts 1-357 des im Plasmid <i>pcDNA3.1+ mGab1 wt full length</i> (#741) kodierten murinen Gab1 wt mit <i>EcoRI</i> Restriktionsschnittstelle
p741_PH_preym_bw	5'-AGA GCC TCG AGT TAT TAG GGA TTG AAT CC-3'	<i>Reverse</i> Primer des Abschnitts 1-357 des im Plasmid <i>pcDNA3.1+ mGab1 wt full length</i> (#741) kodierten murinen Gab1 wt mit Stoppcodon und <i>XhoI</i> Restriktionsschnittstelle
pMG2_preym_462	5'-CTG CGA CTG ATG AAG GCA T-3'	Sequenzierungsprimer zur Sequenzierung von pMG2 ausgehend von Pos. 462
pCLG_bait_3660	5'-AGA AAT CAG TGT CGA TAC AGC TTG GA-3'	Sequenzierungsprimer zur Sequenzierung von pCLG ausgehend von Pos. 3660

3.6 Restriktionsenzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von NEB (USA) bezogen.

Enzym	Schnittstelle
BamHI	G/GATCC
DpnI	GA/TC
EcoRI	G/AATTC
NotI	CGCGGCC/GC
XhoI	CTCGA/G

3.7 Prokaryontische Zellen und deren Kultivierung

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurden *Escherichia coli DH10B* verwendet. Die Plasmide wurden durch Transformation (siehe 3.8.8) in die Bakterien eingeschleust. Die

Plasmide tragen einen Genabschnitt, der für die Resistenz gegen ein Antibiotikum kodiert. Zur Selektion der Transformanten wurde das entsprechende Selektionsantibiotikum in einer Konzentration von 100 µg/mL im Lysogeni-Broth-Medium (LB-Medium) eingesetzt. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte schüttelnd bei 37 °C in LB-Medium. Zur Aufbewahrung der erzeugten Transformanten wurden 700 µL des Transformanten-haltigen Mediums in 300 µL 85 %-igem Glycerol als Glycerolstock bei -80 °C gelagert.

LB-Flüssigmedium

- 25 g LB-Medium-Pulver (Roth, Deutschland)
- ad 1 L H₂O

3.7.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Aus einem Glycerolstock von *Escherichia coli DH10B* wurden 4 mL LB-Flüssigmedium als Vorkultur angeimpft, die bei 37 °C über Nacht schüttelnd inkubiert wurde. Aus dieser Vorkultur wurden 100 µL als Inokulum für die Hauptkultur in 250 mL LB-Flüssigmedium genutzt und bei 37 °C schüttelnd inkubiert bis eine Trübung (OD₆₀₀) von 0,3 erreicht war. Danach wurde das Kultivierungsgefäß zur Abkühlung sofort auf Eis gestellt und die Bakterien anschließend bei 4 °C und 6000 rpm für 15 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 125 mL einer 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation (4 °C, 6000 rpm, 15 Minuten) wurde das Pellet in 25 mL einer 50 mM CaCl₂-Lösung (10 % Glycerin enthaltend) aufgenommen, in Reagier-Gefäße aliquotiert und in einem Bad aus flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

3.7.2 Plasmid Minipräparation

In einem 4 mL LB-Flüssigmedium Minipräparationsansatz, welcher mit Selektionsantibiotikum versetzt war, erfolgte die Kultivierung der Plasmid-DNA tragenden Bakterien.

Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das ZippyTM Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research Corp., USA) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µL H₂O eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch am NanoPhotometer (Implen, Deutschland) über die OD₂₆₀ bestimmt. Um die Reinheit der aufgereinigten DNA zu gewährleisten muss das Extinktionsverhältnis E_{260 nm}/E_{280 nm} den Wert 1,8 überschreiten. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

3.7.3 Plasmid Maxipräparation

In einem 250 mL LB-Flüssigmedium Maxipräparationsansatz, welcher mit Selektionsantibiotikum versetzt war, erfolgte die Kultivierung der Plasmid-DNA tragenden Bakterien bei 37 °C.

Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das NucleoBond® Xtra Maxi Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in 400 µL TRIS oder H₂O eluiert.

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch am NanoPhotometer (Implen, Deutschland) über die OD₂₆₀ bestimmt. Um die Reinheit der aufgereinigten DNA zu gewährleisten muss das Extinktionsverhältnis E_{260 nm}/E_{280 nm} den Wert 1,8 überschreiten. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

3.8 Klonierung

3.8.1 Restriktionsverdau

Zum Schneiden von DNA-Plasmiden musste der Vektor zunächst in einem Restriktionsverdau mit Hilfe eines oder zweier Restriktionsenzyme geschnitten werden. Nach Definition der Enzymaktivität schneidet 1 U (*unit*) eines Restriktionsenzym 1 μg der Substrat-DNA in einem Reaktionsvolumen von 50 μL innerhalb von 60 Minuten. Dieses Verhältnis wurde bei folgendem Reaktionsansatz für die Restriktionsreaktion berücksichtigt.

Ansatz

- 1 μL Restriktionsenzym
- 1 μg DNA
- 5 μL 10x NEBuffer

ad 50 μL H_2O

Der Reaktionsansatz wurde nach den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen der Restriktionsenzyme inkubiert.

3.8.2 Aufreinigung der Restriktionsprodukte

Für die Aufreinigung der geschnittenen Plasmide wurden die Produkte aus der Restriktionsreaktion mit 4 μL 6x DNA-Ladepuffer (Fermentas, Deutschland) versetzt. Diese wurden auf ein 1 %-iges mit *Roti-Safe Gel Stain* (Carl Roth, Deutschland) versetztes Agarosegel aufgetragen und bei 110 V aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden durch UV-Strahlung sichtbar gemacht und die geschnittenen Vektoren oder DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert.

Agarosegel (1 %)

- 1 g Agarose

ad 100 ml TAE

TAE

- 40 mM Tris
- 20 mM Essigsäure
- 1 mM EDTA pH 8,0

3.8.3 Gelextraktion

Die im Agarosegel befindliche DNA wurde mit möglichst wenig überschüssiger Agarose in ein 1,5 mL Reagier-Gefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus der Agarose erfolgte mit dem *3 in 1 - Basic DNA Kit* (EURx, Polen) nach Anweisung des Herstellers. Die DNA wurde in 30 μL H_2O eluiert. Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten DNA erfolgte photometrisch über die OD_{260} am NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA). Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.8.4 Ligation

Nach erfolgtem Restriktionsverdau und Extraktion der geschnittenen DNA wurden die isolierten DNA-Fragmente miteinander ligiert. Die Ligation erfolgte mit *Instant Sticky-end Ligase Master Mix* (NEB, USA). Das Insert wurde im dreifachen molaren Überschuss zum geschnittenen Vektor eingesetzt. Der Ansatz wird für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Ligationsansatz

- 100 ng Plasmid
 - x ng Insertionsfragment
- ad 5 μ l H₂O
- 5 μ l *Instant Sticky-end Ligase Master Mix* (NEB, USA)

3.8.5 Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese an einem Plasmid wurde mittels PCR durchgeführt. Als Vorlage (*Template*) dienten 10 ng des Ausgangsplasmids. Die Startprimer für die in der PCR stattfindenden Replikation enthielten die gewünschte Mutation. Mit Hilfe dieser Mutagenese-Primer wurden die gewünschten Mutationen bei der Replikation gezielt in das Plasmid eingebaut. Im anschließenden Restriktionsverdau hat das Restriktionsenzym DpnI die methylierten und unmutierten Ausgangsplasmide verdaut. Die in der PCR entstandenen unmethylierten Plasmide blieben unverdaut und standen für weitere Klonierungsschritte zur Verfügung.

PCR-Ansatz

- 5 μ L 10x Pfu Puffer (EURx, Polen)
- x μ L 10 ng *Template* Plasmid-DNA
- 1,5 μ L *sense* Mutagenese Primer
- 1,5 μ L *antisense* Mutagenese Primer
- 1 μ L dNTP
- 0,5 μ L Pfu DNA-Polymerase (5 U/ μ L), (EURx, Polen)

ad 50 μ L H₂O

PCR-Programm

95 °C	1 Minute	18x
95 °C	50 Sekunden	
60 °C	50 Sekunden	
68 °C	1 Minute/kb Plasmid	
68 °C	7 Minuten	

3.8.6 Transformation

Die Transformation von kompetenten Bakterien des Stammes *Escherichia coli DH10B* erfolgte mittels Hitzeschock. Dazu wurden je Ansatz 10 μL Plasmid-DNA mit 250 μL kompetenten Bakterien gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden. Nach weiteren 2 Minuten auf Eis wurden die Ansätze mit jeweils 1 mL LB-Flüssigmedium aufgefüllt und für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei Raumtemperatur abzentrifugiert (1 min, 14.000 rpm, Tischzentrifuge) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 μL LB-Flüssigmedium resuspendiert und anschließend auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einige Kolonien der gewachsenen Bakterien wurden am Folgetag gepickt und als Inokulum für einen Plasmid Minipräparationsansatz (3.6.3) verwendet.

LB-Agar

- 250 mL 2 x LB-Flüssigmedium
- 250 mL 4 % Agarose
- Selektionsantibiotikum (Endkonzentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

3.9 Eukaryontische Zellen und deren Kultivierung

3.9.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturbedingungen
HEK293	Adhärent wachsende humane embryonale Nierenzelllinie	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin)
HEK293-T	Adhärent wachsende humane embryonale Nierenzelllinie, die das <i>SV40 large T-Antigen</i> exprimieren	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin)
HEK293-gp80	Adhärent wachsende humane embryonale Nierenzelllinie, die den IL-6R konstitutiv exprimieren	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin)
HEK293-Jak2-WT	Adhärent wachsende humane embryonale Nierenzelllinie, die den Jak2-WT Doxycyclin abhängig und den murinen Epo-R konstitutiv exprimieren	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hygromycin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blastidin)

HEK293-Jak2-V617F	Adhärenz wachsende humane embryonale Nierenzelllinie, die die Jak2-V617F Doxycyclin abhängig und den murinen Epo-R konstitutiv exprimieren	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 µg/mL Puromycin, 50 µg/mL Hygromycin, 10 µg/mL Blasticidin)
HEL	humane erythroleukämische Suspensionszelllinie	RPMI-1640 (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin)
HEL Gab1 ^{-/-}	humane erythroleukämische Suspensionszelllinie mit CRISPR/Cas9 (Gab1 CRISPR/Cas9 KO Plasmid, sc-401108, Santa Cruz, USA) generiertem Gen-Knock Out für Gab1	RPMI-1640 (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 µg/mL Puromycin)
MEF-WT	Adhärenz wachsende murine embryonale Fibroblastenzelllinie	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin)
MEF-Gab1 ^{-/-}	Adhärenz wachsende murine embryonale und Gab1 defiziente Fibroblastenzelllinie	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin)
Hek293-Trex FlpIn (ThermoFisher, USA)	Adhärenz wachsende humane embryonale Nierenzelllinie mit FLP Rekombinations-Zielsequenz (FRT) für die FLP Rekombinase-vermittelte Integration eines FRT-Vektors	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 100 µg/mL Zeocin, 10 µg/mL Blasticidin)
Hek293-Trex FlpIn-Gab1 KO	Adhärenz wachsende humane embryonale Nierenzelllinie mit CRISPR/Cas9 (Gab1 CRISPR/Cas9 KO Plasmid, sc-401108, Santa Cruz, USA) generiertem Gen-Knock Out für Gab1	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 100 µg/mL Zeocin, 10 µg/mL Blasticidin, 2 µg/mL Puromycin)

Hek293-Trex FlpIn-Gab1 KO + Gab1-WT	Adhärenz wachsende humane embryonale Nierenzelllinie mit CRISPR/Cas9 (Gab1 CRISPR/Cas9 KO Plasmid, sc-401108, Santa Cruz, USA) generiertem Gen-Knock Out für Gab1, die mit Gab1-WT über die Flp Rekombinase- vermittelte Integration rekonstituiert wurden und Gab1-WT Doxycyclin abhängig exprimieren	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 µg/mL Puromycin, 50 µg/mL Hygromycin, 10 µg/mL Blasticidin)
---	---	--

3.9.2 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

- DMEM Flüssigmedium mit 4,5 g Glucose (life technologies, USA)
- RPMI-1640 Flüssigmedium (life technologies, USA)
- FKS (PAA Laboratories, USA)
- Penicillin/Streptomycin (life technologies, USA)
- Puromycin (Roth, Deutschland)
- Hygromycin (Roth, Deutschland)
- Blastocidin (Roth, Deutschland)
- Zeocin (Invivogen, USA)
- Trypsin (0,05 %)/EDTA (0,02 %)-Lösung (life technologies, USA)
- Doxycylin (Sigma Aldrich, USA)

PBS

- 200 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 8 mM Na₂HPO₄
- 1,5 mM KH₂PO₄

pH 7,4

3.9.3 Kulturbedingungen für eukaryontische Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Zur Weiterkultivierung wurden die adhärent wachsenden Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA von der Petrischale abgelöst und in frischem Medium ausgesät. Für Experimente wurden Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, um gleiche Ausgangszellzahlen zu schaffen. Für die Langzeitaufbewahrung der Zellen wurden die von der Platte gelösten Zellen mit kaltem 10 % DMSO-haltigem fötalem Kälberserum versetzt, in Kryoröhrchen aliquotiert und zur langsamen Abkühlung in ein Isopropanolgefülltes Gefrier-Gefäß zunächst für 24 Stunden bei -80 °C gelagert, bevor sie zur dauerhaften Aufbewahrung bei einer Temperatur von -150 °C gelagert wurden. Zum Auftauen der Zellen wurde das DMSO-haltige Medium, in welchem die Zellen eingefroren sind, 1:10 mit Kulturmedium verdünnt und zentrifugiert (1000 rpm, 5 Minuten, 4 °C, Rotor: SX4750A). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 mL Kulturmedium resuspendiert und ausgesät.

3.10 Wachstumsassay

Für die Bestimmung des Zellwachstums von Zellen werden 5000 Zellen in 100 µL Kulturmedium pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät und für mindestens 24 h bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellsuspension wird mit 20 µL CellTiter-Blue Reagenz (Promega, USA) versetzt. Die Bestimmung des Zellwachstums erfolgt photometrisch mit dem infinite M200 PRO (TECAN, USA). Etwa 30 min

nach Zugabe der Reagenz wird die Absorption bei 570 nm und bei 600 nm gemessen. Nach weiteren 4 h Inkubation der Zellen bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ erfolgte eine weitere Messung der Absorption bei 570 nm und bei 600 nm. Die Differenz aus erstem und zweitem Messzeitpunkt wird auf das maximale Wachstum normiert.

3.11 Liposomale Transfektion

Die zu transfizierenden Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf Kulturschalen ausgesät. In einem Reagier-Gefäß wurden 100 µL Opti-MEM (life technologies, USA) pipettiert und die gewünschte Menge Plasmid-DNA hinzugegeben. In ein zweites Reagier-Gefäß wurden 100 µL Opti-MEM pipettiert und je µg DNA wurden 3 µL LipofectamineTM 2000 (life technologies, USA) hinzupipettiert (Verhältnis Lipide zu DNA 3:1 v/m). Diese Ansätze wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die beiden Ansätze gemischt und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Kulturmedium aus den Kulturschalen abgesaugt und durch Opti-MEM ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde dann in die vorbereiteten Kulturschalen pipettiert. Die Zellen wurden 5 h in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das Opti-MEM abgesaugt und durch Kulturmedium ersetzt. Die weitere Kultivierung der transfizierten Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.12 Elektroporation

Die zu transfizierenden Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 Minuten, 4 °C, Rotor: SX4750A) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 100 µL Nucleofector Kit V Lösung (Lonza, Schweiz) resuspendiert und die entsprechende Menge zu transfizierender Plasmid-DNA hinzugegeben. Die Zell-DNA-Mischung wurde in eine Küvette transferiert. Die Elektroporation der Zellen erfolgt mit dem Nucleofector 1 (Lonza, Schweiz). Nach der Elektroporation werden 500 µL Kulturmedium in die Küvette gegeben. Danach wird der gesamte Küvetten-Inhalt in eine Kulturschale mit ausreichend Kulturmedium überführt. Die weitere Kultivierung der transfizierten Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.13 Zelllysate

Für die Herstellung von Zelllysaten zur weiteren Proteindetektion wurden die Zellen auf Eis gestellt und das Kulturmedium abgesaugt. Nach Zugabe von kaltem Ripa-Lyse-Puffer wurden die Zellen mit einem Schaber vom Schalenboden gelöst und in Reagier-Gefäße überführt. Die Lyse erfolgte für 10 Minuten auf Eis mit mehrmaligem Mischen der Proben. Anschließend wurde die Zell-Debris bei 4 °C und 13000 rpm für 15 Minuten in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reagier-Gefäße überführt und zur späteren Analytik bei -20 °C eingefroren.

Ripa-Lyse-Puffer

- 50 mM Tris/HCl (pH 7,4)
- 100 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 0,5 % NP40 (Igepal)
- 15 % Glycerol

Zum Schutz vor Proteasen und Phosphatasen wurden kurz vor Gebrauch folgende Substanzen ergänzt.

Angaben pro 10 mL:

- 100 μ L Na-Vanadat (0,1 M)
- 20 μ L NaF (0,5 M)
- 80 μ L AEBSF (0,1 M) (Roth, Deutschland)
- 2 μ L Aprotinin (25 mg/mL in H₂O) (AppliChem, Deutschland)
- 10 μ L Leupeptin (5 mg/mL in H₂O) (AppliChem, Deutschland)
- 3,5 μ L Pepstatin (1,5 mg/mL in CH₃OH) (AppliChem, Deutschland)

3.14 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Quantifizierung der Protein-Konzentration in den Zelllysaten wurde nach der Methode von Bradford mittels *BIO-RAD Protein Assay* verfahren. Bei einer Wellenlänge von 595 nm wurde photometrisch zunächst eine Eichgerade mit einer Standardreihe aus Bovinem Serumalbumin (BSA) (SERVA Electrophoresis, Deutschland) erstellt. In einem Reagier-Gefäß wurden 1 mL einer 1:5 Verdünnung einer 5x Bradford-Reagenz (BIO-RAD, USA) vorgelegt und 3 μ L des Zelllysates zugegeben. Die Extinktion des Messansatzes wurde gegen reine 1x Bradford-Reagenz gemessen und die Proteinkonzentration über die Geradengleichung der vorher bestimmten Eichgerade bestimmt.

3.15 Immunpräzipitation von Proteinen aus dem Zelllysate

Zur Anreicherung von Proteinen aus einem Zelllysate wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die Zelllysate wurden mit 1 μ g des gegen das zu präzipidierende Protein gerichteten Erstantikörpers versetzt und über Nacht bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Isolation der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte mit Protein G-Dynabeads (life technologies, USA). Je Probe wurden zunächst 10 μ L der Beads mit 1 mL RIPA-Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die Beads je Probe in 10 μ L RIPA-Waschpuffer resuspendiert und zu dem Zelllysate hinzugegeben und bei 4 °C für 4 h in einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Aufreinigung der Protein-Antikörper-Bead-Komplexe erfolgte mit Hilfe eines Magnetständers (life technologies, USA). Die Komplexe wurden nachfolgend drei mal mit je 1 mL RIPA-Waschpuffer gewaschen. Die Proteine wurden anschließend in 2x Lämmli für 5 min bei 95 °C von den Beads gelöst. Die Proben wurden nachfolgend mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

RIPA Waschpuffer

- 50 mM Tris/HCl pH 7,4
- 100 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 0,1 % Igepal

3.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden in einer vertikalen Flachgelkammer mittels diskontinuierlicher Elektrophorese nach Lämmli aufgetrennt. Je nach gewünschtem Auftrennungsgrad und Größe der zu detektierenden Proteine wurden unterschiedlich prozentuale Trenngele (7 % -15 %) gegossen und in Verbindung mit 4 %-igen Sammelgelen benutzt. Bei Proteinen mit einer Größe von 30 bis 100 kDa eigneten sich für die Auftrennung 10 % Gele.

Die Proben wurden nach Zugabe von 4 μ L 4x Lämmli-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend auf das Gel geladen. Zur Größenbestimmung wurde zudem *Page Ruler Prestained Marker* (ThermoFisher Scientific, USA) aufgetragen. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 30 mA pro Gel bis zur gewünschten Auftrennung der Proteine.

4x Lämmli-Probenpuffer

- 40 % Glycerin
- 20 % β -Mercapthenol
- 8 % SDS
- 250 mM TRIS/HCl (pH 6,8)
- 0,02 % Bromphenolblau

Trenngel (10 %)

- 5,9 mL H₂O
- 4,8 mL 30 % Acrylamidlösung (29:1)
- 3,8 mL 1,5 M TRIS/HCl (pH 8,8)
- 75 μ L 20 % SDS
- 15 μ L TEMED
- 75 μ L 20 % APS

Sammelgel (4 %)

- 4 mL H₂O
- 635 μ L 30 % Acrylamidlösung (29:1)
- 313 μ L 2 M TRIS/HCl (pH 6,8)
- 25 μ L 20 % SDS
- 5 μ L TEMED
- 40 μ L 20 % APS

SDS-Laufpuffer

- 25 mM Tris-Base
 - 192 mM Glycin
 - 0,1 % SDS
- pH 8,3

3.17 Western-Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden zur späteren Detektion mittels Western-Blot-*semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran (BIO-RAD, USA) übertragen. Dazu wurden die PVDF-Membran und 1,5 mm dicke Filterpapiere (Roth, Deutschland) auf die Gelgröße zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung für 5 Sekunden in Methanol gelegt und danach für kurze Zeit in Anoden-Puffer II äquilibriert. Die Filterpapiere wurden in den nachfolgend angegebenen Puffern getränkt und der Aufbau des Blots erfolgte nach dem Schema:

1. Anode
2. 2 Filterpapiere getränkt in Anoden-Puffer I
3. 1 Filterpapier getränkt in Anoden-Puffer II
4. PVDF-Membran äquilibriert in Anoden-Puffer II
5. Polyacrylamidgel
6. 2 Filterpapiere getränkt in Kathoden-Puffer
7. Kathode

Diese Komponenten wurden luftblasenfrei in einem BIO-RAD TransBlot® SD System (BIO-RAD, USA) übereinandergelegt. Die Proteine wurden mit 1,5 mA/cm² Polyacrylamidgel für 45 Minuten auf die PVDF-Membran übertragen.

Anoden-Puffer I

- 0,3 M Tris-Base
 - 20 % Methanol
- pH 10,4

Anoden-Puffer II

- 25 mM Tris-Base
 - 20 % Methanol
- pH 10,4

Kathoden-Puffer

- 40 mM ϵ -Aminocapronsäure
 - 20 % Methanol
- pH 9,4

3.18 Immundetektion von Proteinen

Die Detektion der auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine erfolgte über eine Immundetektion. Nach dem Transfer wurde die Membran mit TBS-N gewaschen. Um die freien Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die PVDF-Membran für 20 Minuten mit einer 10 %-igen BSA-Lösung blockiert. Danach wurde die Membran erneut mit TBS-N gewaschen. Über Nacht wurde die Membran bei 4 °C in einer 1:1000 Verdünnung des entsprechenden primären Antikörpers in TBS-N auf einem Schüttler inkubiert. Nach weiteren Waschschritten in TBS-N erfolgte die Inkubation der Membran mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem sekundären Antikörper für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Der überschüssige sekundäre Antikörper wurde durch weitere Waschschriffe entfernt. Die Proteine, die den primären und sekundären Antikörper tragen, konnten durch die Reaktion der Peroxidase mit Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrat (Millipore Corporation, USA) in einem ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, Großbritannien) detektiert werden. Quantifizierungen wurden über die Auswertungssoftware ImageQuantTL durchgeführt. Für weitere Detektionen wurden die gebundenen Antikörper durch eine 30-minütige Inkubation der PVDF-Membran in Stripping-Puffer bei 80 °C abgelöst. Danach wurde die Membran erneut mit einer 10 %-igen BSA-Lösung blockiert.

TBS-N

- 20 mM Tris/HCl (pH 7,6)
- 140 mM NaCl
- 0,1 % Nonidet P-40

Stripping-Puffer

- 62,5 mM Tris/HCl (pH 7,6)
- 2 % SDS
- 100 mM β -Mercaptoethanol

3.19 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) und quantitative-Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Im Folgenden werden die Schritte zur Durchführung einer Reverse-Transkriptase-PCR und qRT-PCR beschrieben.

3.19.1 RNA Isolation aus eukaryontischen Zellen

Für die Gewinnung ausreichender RNA-Mengen erfolgte die Homogenisierung der Zellsate mit Hilfe von QIASHredder™ -Säulen. Die Isolation der RNA wird mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Die RNA-Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Eluierung der RNA aus den RNeasy® Säulen erfolgte mit 30 μ L RNase-freiem Wasser.

3.19.2 Quantitative Bestimmung der Nukleinsäuren

Die RNA-Konzentrationen in den Proben wurden mit dem NanoPhotometer (Implen, Deutschland) bestimmt. Der OD₂₆₀ gibt die RNA-Konzentration an. Die Reinheit der aufbereiteten RNA wurde mit dem OD₂₈₀-Wert ermittelt. Der Quotient E₂₆₀/E₂₈₀ sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.19.3 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wurde die RNA im ersten Reaktionsschritt in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben. Für die RT-PCR wurden für die spätere vergleichbare Auswertung von jeder Probe 500 ng RNA benötigt. Diese 500 ng werden aus den Proben entnommen und in PCR-Reagier-Gefäße pipettiert ad 10 μ L RNase-freien Wassers. Für die cDNA-Synthese wurden 10 μ L des folgende Reaktionsansatzes zu den Proben hinzu pipettiert.

Reaktionsansatz für eine Reaktion (für eine Probe)

- 2 μ L 10x RT-Puffer (Qiagen, Deutschland)
- 2 μ L dNTPs (Qiagen, Deutschland)
- 1 μ L Reverse Transkriptase (Qiagen, Deutschland)
- 4,5 μ L RNase-freies Wasser (Qiagen, Deutschland)
- 0,5 μ L Random Primer (Promega Corporation, USA)

Die cDNA-Synthese erfolgte in einem Thermocycler für 1 h bei 37 °C.

3.19.4 qRT-PCR

Die cDNA in einem Volumen von 20 μ L wurde mit 60 μ L Wasser 1:4 verdünnt. Zur Pipettierung der Reaktionsansätze für die qRT-PCR wurde der Pipettier-Roboter QIAgility (Qiagen, Deutschland) verwendet. Die Reaktionsansätze wurden in Duplikaten nach dem unten aufgeführten Schema angesetzt. Die cDNA wurde entweder mit *Taqman gene expression assays* (Applied Biosystems, USA) und dem *qPCR MasterMix Plus* (Eurogentec, Deutschland) oder mit dem *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix* (life technologies, USA) amplifiziert. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der Methode von Pfaffl [144].

Folgende *Taqman*-Sonden-Primer wurden verwendet:

humanes SOCS3 Hs02330328_s1
 humanes HPRT Hs99999909_m1

Folgende Primer wurden für die SYBR Green I qRT-PCR eingesetzt:

humanes Gab1 forward GCA GGG ATG TCG CCT TCA CG
 humanes Gab1 reverse CAC TTC CCA CTG TCA ACA C
 humanes SDHA forward TGG GAA CAA GAG GGC ATC TG
 humanes SDHA reverse CCA CCA CTG CAT CAA ATT CAT G

Reaktionsansatz für qRT-PCR

- 10 μ L Puffer qPCR™ MasterMix Plus (Eurogentec, Deutschland) oder 10 μ L Puffer Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (life technologies, USA)
- 1 μ L jeweiligen Primer
- 7 μ L H₂O

Je Reaktionsansatz wurden 2 μ L cDNA aus der jeweiligen Probe in den Reaktionsansatz pipettiert.

PCR-Programm

50 °C,	2 Minuten	40x
95 °C	10 Minuten	
95 °C	15 Sekunden	
60 °C	1 Minute	

3.20 Durchflusszytometrie

Die Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche wurde mittels extrazellulärer Durchflusszytometrie bestimmt. Hierzu wurden die Zellen von der Platte zu lösen, werden sie mit 1 mL FACS-Puffer/EDTA vom Schalenboden abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm (Rotor: SX4750A) und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 100 µL einer 1:100 Verdünnung des Primärantikörpers in FACS-Puffer gelöst und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift durch Zugabe von 4 mL FACS-Puffer und erneuter Pelletierung der Zellen für 5 min bei 1000 rpm (Rotor: SX4750A) und 4 °C erfolgte die Lösung des Zellpellets in 1 mL einer 1:100 Verdünnung des Phycoerythrin-konjugierten Zweitantikörpers. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis und in Dunkelheit inkubiert. Es folgte ein letzter Waschschrift. Für die Analyse der Zelloberflächenexpression mittels FACS wurde das Zellpellet in 500 µL FACS-Puffer aufgenommen und das Pellet darin gelöst. Die Analyse der oberflächenmarkierten Zellen erfolgte an einem BD FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, USA). Die Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgt über die Analysesoftware BD FACSDiva (Becton, Dickinson and Company, USA).

FACS-Puffer

- 1000 mL PBS
- 50 mL FKS

FACS-Puffer/EDTA

- FACS-Puffer
- 0,5 mM EDTA

3.21 Luziferase-Assay

Nach Stimulation der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 100 µL Extraktionspuffer. Nach Inkubation der Zellen für 10 Minuten auf Eis, wurde die Zelldebris abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 13000 rpm, Tischzentrifuge). Von dem Überstand wurden 20 µL in eine 96-Well Platte vorgelegt und 60 µL Luziferase-Assay-Reagenz (Promega, USA) zugegeben. Die Lumineszenz wurde im Mikroplattenlesegerät *Inifnte 200 PRO* (Tecan, Switzerland) bestimmt. Anschließend wurden 100 µL des Lysates in 1,5 mL-Reaktiongefäße vorgelegt und 500 µL β-Galactosidase-Puffer zugegeben. Danach wurden 100 µL des Substrates ONPG (1 mg/mL) (PanReac AppliChem, Deutschland) zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach dem eine sichtbare Gelbfärbung eingetreten ist, wurde die Reaktion mit 250 µL Na₂CO₃ gestoppt und die Absorption bei 420 nm im Mikroplattenlesegerät bestimmt. Die erhaltenen Werte der β-Galactosidase-Aktivität dienen zur Ermittlung der Transfektions- und Lyseeffizienz der Proben und wurden zur Normierung der Luziferase-Aktivität verwendet.

Extraktionspuffer

- 5 mM Tris/HCl, pH 7,8
- 0,4 mM EDTA
- 2 % Glycerin

- 0,2 % Triton X-100
- 0,2 % DTT

β-Galactosidase-Puffer

- 60 mM Na₂HPO₄
- 40 mM NaH₂PO₄
- 1 mM KCl
- 1 mM MgCl₂
- 368 mL β-Mercaptoethanol pro 100 mL Lösung

3.22 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Mikroskopie wurde eingesetzt, um die Translokation von Gab1 zu untersuchen. Zunächst wurden Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete 18 mm Deckgläschen ausgesät. Für die Detektion von Gab1 wurden die Zellen mit einem Expressionsvektor für Gab1-GFP transfiziert. Die Analyse erfolgte an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Zeiss LSM700 (Zeiss, Deutschland). Für die Bildaufnahmen wurde ein 63-fach vergrößerndes, wasserkorrigiertes Objektiv verwendet. Das Anregungslicht wurde über einen 488 nm Hauptfarbteiler in den Detektionsstrahlengang eingespeist und die Emission des GFP nach einem 505-530 nm Bandpassfilter registriert. Der Durchmesser der konfokalen Blende war bei allen Aufnahmen in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge auf eine Airy Unit (1 AU) eingestellt. Für die verwendeten Anregungswellenlängen ergibt diese Einstellung eine Ebenenschichtdicke der konfokalen Aufnahmen von ca. 1 µm.

4 Ergebnisse

Das *multi-site docking* Protein Gab1 wird Zytokin-induziert an die Plasmamembran rekrutiert [101]. Es besteht die Hypothese, dass der Translokation von Gab1 die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 vorausgeht. Die Phosphorylierung dieses Serins könnte eine Konformationsänderung in Gab1 bewirken. Erst diese Konformationsänderung bewirkt, dass die PH-Domäne von Gab1 mit PIP3 in der Plasmamembran interagieren kann. Noch ist unbekannt, wie die Zytokin-induzierte Translokation von Gab1 tatsächlich reguliert wird. Gibt es eine inhibitorische intramolekulare Interaktion der PH-Domäne, die die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran inhibiert?

4.1 Die Regulation der Gab1 Plasmamembran-Translokation

Der Mechanismus der PH-Domänen vermittelten Membrantranslokation von Gab1 könnte durch eine intramolekulare Wechselwirkung in Gab1 reguliert sein [101]. Es ist jedoch nicht bekannt, über welche Wechselwirkungen von Aminosäuren die intramolekulare Interaktion der PH-Domäne mit dem C-terminalen Abschnitt von Gab1 realisiert sein könnte. Für die Analyse der intramolekularen Wechselwirkung in Gab1 wird die Methode der *mammalian protein-protein interaction trap* (MAPPIT)-Interaktionsanalyse angewandt.

MAPPIT basiert auf der Rekonstitution eines trunkierten Zytokin-Rezeptors. Dazu werden trunkierte Zytokin-Rezeptor-Chimären, die defizient in der Signaltransduktion sind, mit interagierenden Proteinen oder Peptiden fusioniert. Die Interaktion dieser Proteine oder Peptide bewirkt die Interaktion der verkürzten Rezeptor-Chimären. Dadurch werden die in der Signaltransduktion defizienten Rezeptor-Chimären zu einem zur Signaltransduktion fähigen Zytokin-Rezeptor rekonstituiert. Die liganden-induzierte Stimulation der interagierenden Rezeptor-Chimären bewirkt die Induktion der STAT-Aktivität, die die Transkription eines STAT-responsiven Luziferase-Reporter-Gens induziert. Die induzierte Luziferase-Expression ermöglicht einen indirekten Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion [145] (Abb. 11).

Als Rezeptor-Chimären wurden der trunkierte murine Leptin-Rezeptor, der keine STAT3-Bindestellen aufweist und eine STAT3-Bindestellen enthaltende verkürzte zytoplasmatische und lösliche gp130-Chimäre verwendet. Diese wurden genutzt, um die interagierenden Aminosäuren, die die intramolekulare Interaktion der Gab1 PH-Domäne mit dem C-terminalen Abschnitt von Gab1 vermitteln, zu identifizieren.

Der trunkierte Leptin-Rezeptor wurde im zytoplasmatischen Abschnitt mit der Polypeptidkette aus dem C-terminalen Bereich von Gab1 fusioniert. Es wurden bereits die Aminosäuren (AS) Serin 552, Arginin 556 und Arginin 560 im C-terminalen Abschnitt von Gab1 identifiziert, die für die Regulation der PH-vermittelten Gab1 Membrantranslokation und somit für die intramolekulare Wechselwirkung in Gab1 eine Rolle zu spielen scheinen [101, 103, 146]. Daher wurde das Peptid aus Gab1 bestehend aus den Aminosäuren 541 bis 570 (SEWEELQAPVR-**S**(552)-PIT-**R**(556)-SFA-**R**(560)-DSSRFPMSPR) mit dem verkürzten Leptin-Rezeptor fusioniert. Um die Bedeutung dieser Aminosäuren für die intramolekulare Interaktion in Gab1 verstehen zu können, wurden in dem Gab1-(AS541-570)-Peptid, die Aminosäuren an den Positionen 552, 556 und 560 substituiert. Diese Substitutionen im Gab1-(AS541-570)-Peptid sind S552A, S552E oder R556/560A. Die Peptide mit diesen substituierten Aminosäuren wurden ebenfalls mit der Leptin-Rezeptor-Chimäre fusioniert.

Die hydrophile Hydroxylgruppe in der Serin-Seitenkette kann phosphoryliert werden. Alanin weist im Vergleich zu Serin eine ähnliche Struktur auf, besitzt jedoch keine Hydroxylgruppe und ist daher hydrophob. Die Substitution von Serin zu Alanin verändert somit nicht die Peptidstruktur, aber das Peptid kann an der substituierten Aminosäureposition nicht mehr phosphoryliert werden. Glutaminsäure liegt in wässriger Lösung und somit in der Zelle dissoziiert als Glutamat vor. Glutamat besitzt in der Seitenkette eine Carboxylgruppe, die eine negative Ladung trägt. Diese negative Ladung und die Ähnlichkeit zur Struktur von Serin ahmen eine Phosphorylierung der Hydroxylgruppe des Serins nach. Daher ist die Substitution des Serins durch Glutamat phospho-mimetisch. Arginin ist eine basische Aminosäure, die an der Seitenkette zwei Aminogruppen besitzt. Eine Aminogruppe ist protoniert und somit positiv geladen. Daher bilden Arginine in Peptiden zu sauren Aminosäuren Ionenbindungen aus. Zudem können Arginine gleichzeitig mit anderen Aminosäuren, die in der Seitenkette ebenfalls Aminogruppen aufweisen, Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. Arginine sind somit an der Ausbildung der Tertiärstruktur von Peptiden beteiligt. Die Substitution der Arginine 556 und 560 durch ungeladene Alanine führt daher zum Verlust der intramolekularen Wechselwirkungen

dieser Arginine mit sauren Aminosäuren in Gab1. Die durch diese Substitutionen veränderten Eigenschaften des Gab1-(AS541-570)-Peptids und deren Auswirkungen auf die intramolekulare Interaktion mit der N-terminalen PH-Domäne in Gab1 werden mit Hilfe der MAPPIT-Interaktionsanalyse untersucht.

Dazu wurde weiterhin die verkürzte zytoplasmatische und lösliche gp130-Chimäre mit der N-terminalen Gab1-PH-Domäne fusioniert (AS 1-119). Die gp130-Chimäre trägt zusätzlich ein Flag-Tag. Kommt es zu einer Interaktion des C-terminalen Gab1-(AS541-570)-Peptids mit der Gab1-PH-Domäne bindet die zytoplasmatische gp130-Chimäre an den verkürzten Leptin-Rezeptor. Der so rekonstituierte Leptin-Rezeptor wird nach Leptin-Bindung aktiviert, wodurch es zur Aktivierung der am Leptin-Rezeptor assoziierten Jaks kommt. Die aktivierten Jaks phosphorylieren die in der gp130-Chimäre befindlichen STAT3-Bindestellen. Die darauffolgende Rekrutierung und Aktivierung von STAT3 induziert nachfolgend die Expression einer Luziferase (Abb. 11). Bei fehlender Interaktion der gp130-Gab1-PH-Domänen- mit der Rezeptor-Gab1-(AS541-570)-Peptid-Chimäre kommt es nach Stimulation zu keiner Luziferase-Expression. Mittels Luziferase-Assay kann somit bestimmt werden, ob das C-terminale Gab1-(AS541-570)-Peptid mit der Gab1-PH-Domäne interagiert.

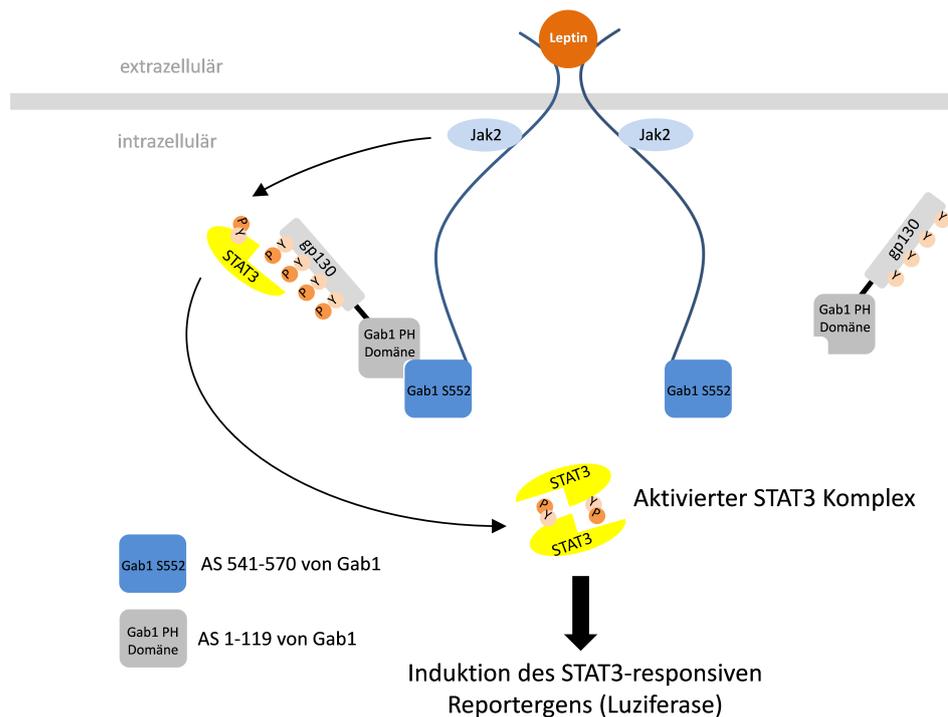


Abbildung 11: Schema des *mammalian protein-protein interaction trap* (MAPPIT)-Luziferase-Assays. MAPPIT basiert auf der Rekonstitution eines Zytokin-Rezeptors über eine Interaktion eines mutierten murinen Leptin-Rezeptors, der keine STAT3-Bindestellen aufweist, mit einer verkürzten zytoplasmatischen und löslichen gp130-Chimäre. Ein Peptid aus der Gab1-Polypeptidkette (Aminosäure-Positionen 541 bis 570) wurde C-terminal an den zytoplasmatischen Teil des trunkeierten Leptin-Rezeptors fusioniert. Das verkürzte zytoplasmatische und lösliche gp130, welches STAT3-Bindestellen enthält, wurde mit der Gab1-PH-Domäne fusioniert (AS 1-119). Im Fall einer Interaktion der Gab1-PH-Domäne mit dem Peptid der Aminosäuren 541 bis 570 in Gab1 kommt es zur Rekonstitution des Zytokin-Rezeptors, der durch Bindung von Leptin aktiviert werden kann. Infolge der Leptin-abhängigen Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Phosphorylierung der STAT3-Bindestellen in der gp130-Chimäre. Dies resultiert in der Rekrutierung, Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3 infolgedessen es zur Aktivierung des STAT3-responsiven Luziferase-Reporters kommt.

HEK293 Zellen wurden zunächst mit Expressionsvektoren, die für die mit den Gab1-(AS541-570)-Peptiden S552 (WT), S552A, S552E oder R556/560A fusionierten Leptin-Rezeptor-Chimären und die für die mit der Gab1-PH-Domäne fusionierten Flag-gp130-Chimäre kodieren, transfiziert. In Abbildung 12A ist zu sehen, dass die verschiedenen Fusionsproteine der Leptin-Rezeptor-Chimären und die lösliche Flag-gp130-Chimäre in den mit den Expressionsvektoren transfizierten Zellen auf vergleichbaren Niveaus exprimiert werden. Auch auf der Zelloberfläche der transfizierten Zellen werden die Leptin-Rezeptor-Chimären WT, S552A, S552E und R556/560A auf vergleichbaren Niveaus exprimiert (Abb. 12B). Effekte, die den Luziferase-Assay durch unterschiedlich stark exprimierte Rezeptor-Chimären beeinflussen, können somit ausgeschlossen werden.

Für den MAPPIT-Luziferase-Assay wurden HEK293 Zellen mit den Expressionsvektoren für die Rezeptor-Chimären, mit einem Vektor für einen STAT3-responsiven Luziferase-Reporter und mit einem Expressionsvektor für β -Galactosidase transfiziert und anschließend mit Leptin stimuliert. Die gemessene Luziferase-Aktivität wurde auf die gemessene β -Galactosidase-Aktivität normiert.

Die Leptin-Stimulation von Zellen, die die Leptin-Rezeptor-Chimäre mit dem WT-

Peptid bestehend aus den Aminosäuren 541 bis 570 von Gab1 exprimieren, induziert im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine starke Luziferase-Aktivität (Abb. 12C). Dieses Ergebnis lässt auf eine Interaktion des Gab1-(AS541-570)-WT-Peptids mit der Gab1-PH-Domäne schließen.

Bei Substitution von Serin 552 durch Glutamat (S552E) kommt es zu keiner liganden-abhängigen Induktion der Luziferase-Aktivität (Abb. 12C). Die negativ geladene Carboxylgruppe in der Seitenkette des Glutamats und dessen phospho-mimetische Wirkung, verhindern somit die intramolekulare Interaktion in Gab1.

Ist das Serin 552 durch Alanin substituiert kommt es zu einer liganden-abhängigen Induktion der Luziferase-Aktivität. Die Substitution des Serins 552 durch das ungeladene Alanin zeigt somit, dass die Gab1-PH-Domäne mit dem C-terminalen Peptid AS541-570 intramolekular interagieren kann, wenn das Serins 552 keine negative Ladung durch Phosphorylierung aufweist.

Die Substitution der positiv geladenen Arginine 556 und 560 in Gab1 durch ungeladenes Alanin führt dazu, dass es zu keiner liganden-abhängigen Induktion der Luziferase kommt (Abb. 12C). Daraus wird deutlich, dass die intramolekulare Interaktion der PH-Domäne mit dem C-terminalen Abschnitt von Gab1 durch die in diesem Abschnitt lokalisierten Arginine 556 und 560 vermittelt wird.

Die Ergebnisse aus der MAPPIT-Interaktionsanalyse stützen die Hypothese zum intramolekularen Klappmechanismus in Gab1. Die Phosphorylierung des Serins 552 bedingt die negative Ladung des Serins, die die intramolekulare Interaktion der PH-Domäne mit den Argininen 556 und 560 aufhebt. Somit wird durch Phosphorylierung des Serins 552 eine Konformationsänderung in Gab1 induziert in deren Folge es zum Aufklappen der PH-Domäne kommt.

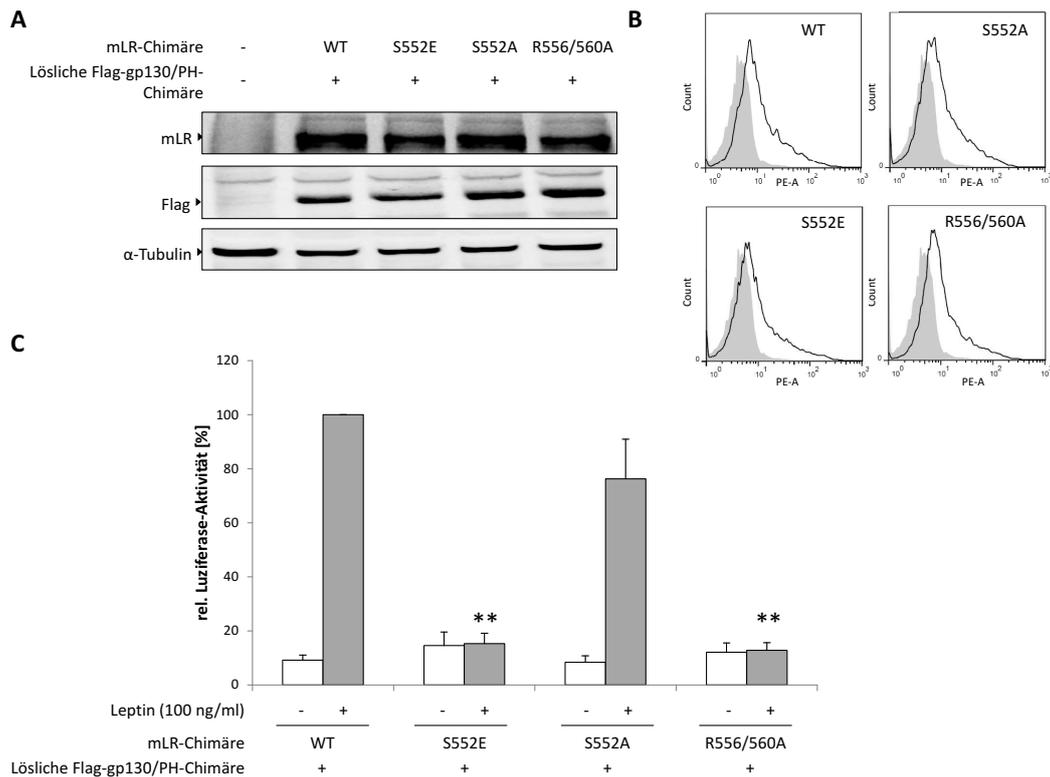


Abbildung 12: Die intramolekulare Interaktion der PH-Domäne mit der C-terminalen Polypeptidkette von Gab1 ist abhängig von den Argininen 556 und 560 und vom Phosphorylierungsstatus des S552 in Gab1. Je 350.000 HEK293 Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit den in der Abbildung spezifizierten Expressionsvektoren für die Leptin-Rezeptor-Chimären und der zytosmatischen und löslichen gp130-Chimäre transfiziert. Die gp130-Chimäre ist mit einem Flag-Tag fusioniert. A) 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Zellextrakte auf Expression der Rezeptor- und Flag-gp130-Chimären untersucht. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen murinen Leptin-Rezeptor (mLR), Flag und α -Tubulin. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$. B) 24 h nach Transfektion wurde die Zelloberflächenexpression der Leptin-Rezeptor-Chimären auf den Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. Dazu wurde ein Antikörper eingesetzt, der den extrazellulären Abschnitt des murinen Leptin-Rezeptors bindet. Die mit den Leptin-Rezeptor-Chimären transfizierten Zellen sind durch die schwarz umrandeten Histogramme und die untransfizierten Zellen durch die grau hinterlegten Histogramme repräsentiert. C) Neben der Transfektion der Leptin-Rezeptor-Chimären- und gp130-Chimäre-Expressionsvektoren erfolgte die Transfektion von Expressionsvektoren, die für einen STAT3-responsiven Luziferase-Reporter und für β -Galactosidase kodieren. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 100 ng/ml murinem Leptin für 24 h stimuliert (graue Balken) oder blieben unstimuliert (weiße Balken). Nach Lyse der Zellen wurde die Luziferase- und die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Die β -Galactosidase-Aktivität dient zur Bestimmung der Transfektionseffizienz. Die Luziferase-Aktivität wurde über die β -Galactosidase Aktivität normiert und die normierte Luziferaseaktivität der stimulierten Gab1-WT-Rezeptor-Chimäre wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. ** $p < 0.001$ (gepaarter zweiseitiger t-Test, Vergleich zur rel. Leptin-induzierten Luziferase-Aktivität von Gab1-WT-Rezeptor-Chimären exprimierenden Zellen)

Der durch die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 ausgelöste Klappmechanismus bedingt die Exponierung der PH-Domäne. In dieser Konformation kann die Gab1-PH-Domäne mit PIP3 in der Plasmamembran interagieren. In der pathophysiologischen Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion ist Gab1 konstitutiv und zytokin-unabhängig an der Plasmamembran rekrutiert. Die konstitutiv aktive Jak2-Mutante Jak2-V617F induziert zudem die konstitutive Phosphorylierung von Gab1 und die Aktivierung der MAPK- und PI3K-Kaskade in Jak2-V617F-positiven Zellen [103]. Bisher ist aber unbekannt, ob die konstitutive Translokation von Gab1 an die Plasmamembran und die Phosphorylierung von Gab1 mit der konstitutiven Aktivierung der MAPK- und der PI3K-Kaskade und mit der pathophysiologischen Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen in Jak2-V617F-positiven Patienten zusammenhängt. Daher ist unklar, welche Rolle Gab1 bei der Vermittlung der konstitutiv aktiven Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion einnimmt, welchen Einfluss die Jak2-V617F Mutante auf die Regulation der Gab1-abhängigen MAPK-Kaskade ausübt und ob Gab1 durch eine Jak2-V617F-induzierte Dysregulation somit an der Pathogenese der myeloproliferativen Neoplasien beteiligt ist.

4.2 Gab1 in der Jak2-V617F induzierten Signaltransduktion

HEL Zellen, die aus dem Knochenmark eines Jak2-V617F-positiven Patienten isoliert wurden, exprimieren die konstitutiv aktive Jak2-V617F-Mutante. In Jak2-V617F exprimierenden HEL Zellen ist daher eine konstitutive Phosphorylierung der Jak2-V617F-Mutante, STAT5, Akt, Erk und Gab1 zu beobachten (Abb. 13A). Daher eignet sich diese Zelllinie um die Bedeutung von Gab1 in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion zu analysieren.

Durch eine CRISPR/Cas9 vermittelte Genomeditierung konnte die Expression von Gab1 in HEL Zellen ausgeschaltet werden (HEL Gab1 KO). In Abbildung 13A ist die CRISPR/Cas9 vermittelte Ausschaltung der Gab1-Protein Expression gezeigt. Die Expression von Gab1-mRNA ist nach CRISPR/Cas9 vermittelter Genomeditierung in HEL Zellen stark reduziert und mittels qRT-PCR in HEL Gab1 KO Zellen nicht mehr nachweisbar (Abb. 13B). Das Ausschalten der Expression des Gab1-Proteins hat keinen Einfluss auf die Expression und die Phosphorylierung der Jak2-V617F-Mutante, von STAT5 und Akt. Jedoch ist die Phosphorylierung von Erk1/2 in HEL Gab1 KO Zellen im Vergleich zu HEL Zellen deutlich reduziert (Abb. 13A). Auch das Zellwachstum Gab1 defizienter HEL Zellen ist im Vergleich zu HEL Zellen verringert (Abb. 13C). Die nach 72 h erreichte Zellzahl Gab1 defizienter HEL Zellen ist im Vergleich zu HEL Zellen ca. 40% geringer.

Das Ausschalten der Gab1-Expression scheint somit sowohl Einfluss auf die Jak2-V617F-induzierte Aktivierung der MAPK-Kaskade als auch auf die Proliferation von Jak2-V617F-positiven Zellen zu haben. Es ist jedoch unbekannt, durch welchen Mechanismus Gab1 die Jak2-V617F-induzierte MAPK-Kaskade verstärken kann.

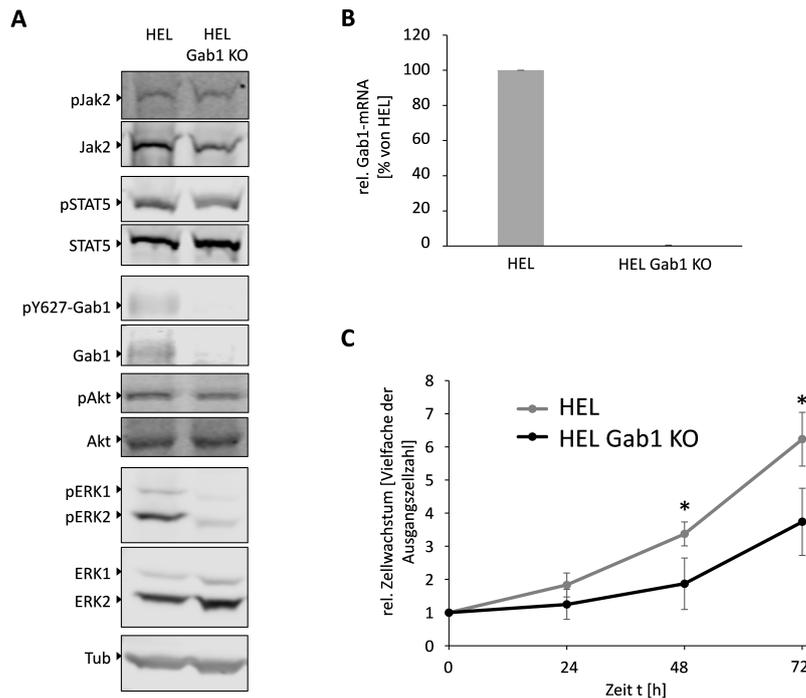


Abbildung 13: Die Bedeutung von Gab1 für die MAPK-Aktivierung und die Proliferation von Jak2-V617F-positiven HEL Zellen. Die Gab1 Expression wurde in HEL Zellen mittels CRISPR/Cas9 vermittelter Genomeditierung ausgeschaltet (HEL Gab1 KO). A) Je 2 Mio. HEL bzw. HEL Gab1 KO Zellen wurden lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen pJak2, pSTAT5, pY627-Gab1, pAkt, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, STAT5, Gab1 und Akt. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$. B) Nach Isolation der gesamten RNA wurde die Expression von humaner Gab1 mRNA mittels qRT-PCR analysiert. Als housekeeping Gen diente humane SDHA. Die mRNA Expression in HEL Zellen wurde auf 100% normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. C) Je 500.000 HEL bzw. HEL Gab1 KO wurden in 10 cm-Schalen für 72 h bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre kultiviert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten mit einer Neubauer-Zählkammer. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$ (gepaarter zweiseitiger t-Test, Vergleich rel. Zellwachstum HEL Gab1 KO zu HEL).

Für die Untersuchung der Bedeutung von Gab1 in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion werden nachfolgend zwei Zellsysteme eingesetzt. Zum einen HEK293-Jak2-WT und zum anderen HEK293-Jak2-V617F Zellen. Die Jak2-V617F-induzierte Signaltransduktion und die Epo-induzierte und Jak2-WT-vermittelte Signaltransduktion werden parallel untersucht. Die daraus erhaltenen Ergebnisse werden verglichen, um eine mögliche durch die Jak2-V617F-Mutante veränderte Regulation der Gab1-abhängigen Signaltransduktion identifizieren zu können. Die Expression von Jak2-WT in den HEK293-Jak2-WT Zellen und die Expression von Jak2-V617F in den HEK293-Jak2-V617F Zellen ist induzierbar. Die transkriptionelle Aktivierung der Jak2-Expression wird dabei durch ein Tetracyclin-kontrollierten Repressor reguliert. Die Behandlung der Zellen mit dem Tetracyclin-Derivat Doxycyclin führt zur Induktion der Expression von Jak2-WT bzw. der konstitutiv aktiven Jak2-V617F Mutante im entsprechendem Zellsystem. Die Untersuchung von konstitutiv aktiven Kinasen ist in induzierbaren Systemen von Vorteil, da so die Aktivierung der durch die konstitutiv aktiven Kinasen aktivierten Signalwege un-

ter Kontrolle der Kinase-Protein-Expression besser beobachtet werden kann. Gleichzeitig kann durch Titration der Doxycyclin-Konzentration das Expressionsniveau des Jak2-WT an das Expressionsniveau der Jak2-V617F Mutante angepasst werden. Somit können Effekte die abweichend zum Jak2-WT durch die Jak2-V617F Mutante hervorgerufen werden von Effekten, die durch die Überexpression von Jak2-WT bzw. Jak2-V617F entstehen, unterschieden werden. Die Ergebnisse, die aus beiden Zellsystemen generiert werden, sind so besser mit einander vergleichbar. Beide Zellsysteme exprimieren konstitutiv zudem den murinen Epo-R [147]. Welche Auswirkung die Induktion der Jak2-WT-Expression bzw. der Jak2-V617F-Expression und die Stimulation mit Erythropoetin auf die Aktivierung von Jak2-abhängigen Signalwegen, wie der Jak/STAT- und der MAPK-Kaskade haben, wurde nachfolgend untersucht.

HEK293-Jak2-WT bzw. -Jak2-V617F Zellen wurden entweder nicht oder für 24 h mit Doxycyclin (Dox) behandelt. In Abbildung 14 ist zu erkennen, dass beide Zellsysteme bereits ohne Doxycyclin-Behandlung Jak2 exprimieren, aber keine detektierbare basale Phosphorylierung von Jak2, STAT5, Erk1/2 oder Gab1 aufweisen (Spur 1, 2, 5 und 6). Erst durch Epo-Stimulation wird in diesen Zellen die Phosphorylierung von Jak2, STAT5, Erk1/2 und Gab1 induziert, die sich in beiden Zellsystemen auf vergleichbaren Niveaus befinden (Abb. 14, Vgl. Spur 2 und 6).

Die Behandlung der HEK293-Jak2-WT und -Jak2-V617F Zellen mit Doxycyclin induziert die Expression von Jak2 bzw. der Jak2-Mutante Jak2-V617F (Abb. 14, Vgl. Spur 1, 2 mit 3, 4 und 5, 6 mit 7, 8). Das nach 24 h erreichte Expressionsniveau von Jak2-WT ist vergleichbar mit dem Expressionsniveau der Jak2-V617F Mutante in Doxycyclin behandelten HEK293-Jak2-V617F Zellen (Abb. 14, Vgl. Spur 3, 4 mit 7, 8). Die Induktion der Jak-V617F-Expression führt zu einer zytokin-unabhängigen Phosphorylierung von Jak2, STAT5, Gab1 und Erk1/2 (Abb. 14, Vgl. Spur 5 und 7). Bei einem vergleichbaren Expressionsniveau des Jak2-WT kommt es dagegen nicht zur zytokin-unabhängigen Phosphorylierung von STAT5, Gab1 oder Erk1/2 (Abb. 14, Vgl. Spur 1, 3 und 6). Es kann daher angenommen werden, dass die konstitutive und zytokin-unabhängige Phosphorylierung von STAT5, Gab1 und Erk1/2 in Jak2-V617F exprimierenden HEK293-Jak2-V617F Zellen nur in Abhängigkeit der konstitutiv aktiven Kinase in Jak2-V617F induziert und nicht durch die Überexpression von Jak2 bzw. Jak2-V617F hervorgerufen wird.

Die Epo-induzierte Phosphorylierung von Jak2, STAT5, Erk1/2 und Gab1 ist in Doxycyclin behandelten und Jak2-WT exprimierenden Zellen im Vergleich zu unbehandelten HEK293-Jak2-WT Zellen verstärkt (Abb. 14, Vgl. Spur 2 und 4). Die Stimulation von Jak2-V617F exprimierenden HEK293-Jak2-V617F Zellen mit Epo führt im Vergleich zur basalen Phosphorylierung in unstimulierten Jak2-V617F-exprimierenden Zellen zu einer Verstärkung der Phosphorylierung von Jak2, STAT5, Erk1/2 und Gab1 (Abb. 14, Vgl. Spur 7 und 8). Die Epo-induzierte Phosphorylierung von STAT5, Gab1, Erk1/2 und Jak2 ist in Doxycyclin behandelten HEK293-Jak2-WT und -Jak2-V617F Zellen auf einem vergleichbaren Niveau (Abb. 14, Vgl. Spur 4 und 8).

Die Überexpression des Jak2-WT in HEK293-Jak2-WT Zellen induziert keine Phosphorylierung von STAT5, Gab1 oder Erk1/2. Dagegen führt die Expression von Jak2-V617F in HEK293-Jak2-V617F Zellen durch die konstitutive Kinaseaktivität der Jak2-V617F zur zytokin-unabhängigen Aktivierung der Jak/STAT-Kaskade und somit zur Phosphorylierung von STAT5. Auch die MAPK-Kaskade wird durch die Expression von Jak2-V617F zytokin-unabhängig aktiviert, wodurch eine Erk1/2-Phosphorylierung in den Zellen induziert wird. Weiterhin wird Gab1 am Tyrosin 627 Jak2-V617F-induziert phosphoryliert. Wie in den aus dem Knochenmark eines Jak2-V617F-positiven Patienten isolierten HEL Zellen werden in den HEK293-Jak2-V617F Zellen STAT5, Erk1/2 und Gab1 Jak2-V617F-induziert phosphoryliert. Die eingesetzten Zellsysteme können somit zur Untersuchung der krankheits-assoziierten Signaltransduktion und der Rolle von Gab1

in Jak2-V617F exprimierenden Zellen genutzt werden. Die Ergebnisse aus der Analyse der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion können weiterhin mit der physiologischen Epo-induzierten und Jak2-WT vermittelten Signaltransduktion verglichen werden, um eine etwaige Jak2-V617F spezifische Dysregulation der Signaltransduktion identifizieren zu können.

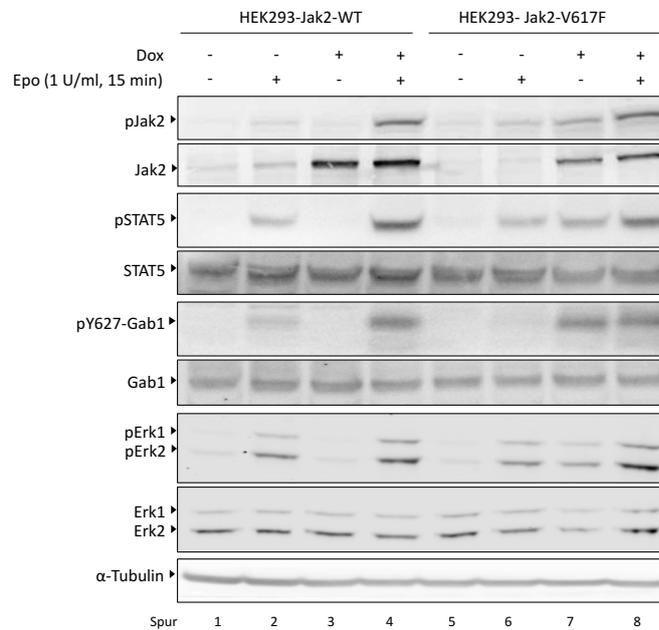


Abbildung 14: Die Jak2 Mutante Jak2-V617F induziert die zytokin-unabhängige und konstitutive Aktivierung der Jak/STAT- und MAPK-Kaskade sowie die Phosphorylierung von Gab1. Je 840.000 HEK293-Jak2-WT bzw. Jak2-V617F Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Zur Induktion der Expression des Jak2-WT- bzw. der -V617F wurden die Zellen für 24 h mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) behandelt und für 15 min mit 1 U/ml Erythropoetin (Epo) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen pJak2, pSTAT5, pY627-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, STAT5 und Gab1. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$.

Jak2-V617F- und Epo-abhängig wird Gab1 am Tyrosin 627 phosphoryliert. Es besteht die Hypothese, dass die Phosphorylierung von Gab1 an seinen Tyrosinen in der Zytokin-abhängigen Signaltransduktion erst vermittelt werden kann, wenn Gab1 an die Plasmamembran rekrutiert wurde. Die Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran ist aber nur möglich, wenn die intramolekulare Interaktion der N-terminalen PH-Domäne mit C-terminalen Argininen durch die Phosphorylierung des Serins 552 aufgehoben wird. Bisher ist unbekannt, ob die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 durch Jak2-V617F oder durch die Epo-abhängige Aktivierung des Jak2-WT induziert wird.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan M. Feller der Sektion für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Halle/Saale wurde ein Antikörper verifiziert, der das Epitop LQAPVR-[pS552]-PITRSF in Gab1 erkennt. Dieser Antikörper kann erstmals bei der Western Blot Analyse zum Nachweis der Phosphorylierung des Serins 552 in

Gab1 verwendet werden [148]. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass der Antikörper nur die Phosphorylierung des Serins 552 in exogenem Gab1 erkennen kann. Um die Phosphorylierung am Serin 552 in Gab1 untersuchen zu können, wurde daher Gab1-WT in HEK293-Jak2-WT und -Jak2-V617F Zellen überexprimiert.

Die Jak2-WT Expression wurde durch Zugabe von Doxycyclin induziert. Die Induktion der Expression des Jak2-WT induziert keine Phosphorylierung von Jak2, keine Aktivierung der MAPK-Kaskade und keine Phosphorylierung von Gab1 am Tyrosin 627 (Abb. 15A, Spur 2). Die Phosphorylierung von Gab1 am Serin 552 wird durch Induktion der Expression von Jak2-WT jedoch erhöht (Abb. 15A, Vgl. Spur 1 und 2). Nach Epo-Stimulation der Jak2-WT exprimierenden Zellen wird Jak2 phosphoryliert (Abb. 15A, Vgl. Spur 2 und 3). Die Erk1/2-Phosphorylierung und die Phosphorylierung von Gab1 am Tyrosin 627 werden Epo-abhängig induziert (Abb. 15A, Vgl. Spur 2 und 3). Die Phosphorylierung von Gab1 am Serin 552 wird Epo-abhängig verstärkt (Abb. 15A, Vgl. Spur 2 und 3).

Die Stimulation der Zellen mit Epo induziert die Phosphorylierung von Jak2 und die Aktivierung der MAPK-Kaskade. Epo-induziert und Jak2-WT vermittelt wird Gab1 am Serin 552 und am Tyrosin 627 phosphoryliert.

Die Induktion der Expression von Jak2-V617F erfolgte durch die Behandlung der Zellen mit Doxycyclin. Die Expression von Jak2-V617F induziert die Phosphorylierung von Erk1/2 und von Gab1 am Tyrosin 627 (Abb. 15B, Vgl. Spur 1 und 2). Abhängig von der Expression von Jak2-V617F wird Gab1 am Serin 552 phosphoryliert (Abb. 15B, Vgl. Spur 1 und 2). Jak2-V617F vermittelt zytokin-unabhängig neben der Phosphorylierung des Tyrosins 627 somit auch die Phosphorylierung von Gab1 am Serin 552.

Es wird deutlich, dass sowohl in der Epo-abhängigen und Jak2-WT vermittelten als auch in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion Gab1 am Serin 552 und am Tyrosin 627 phosphoryliert wird.

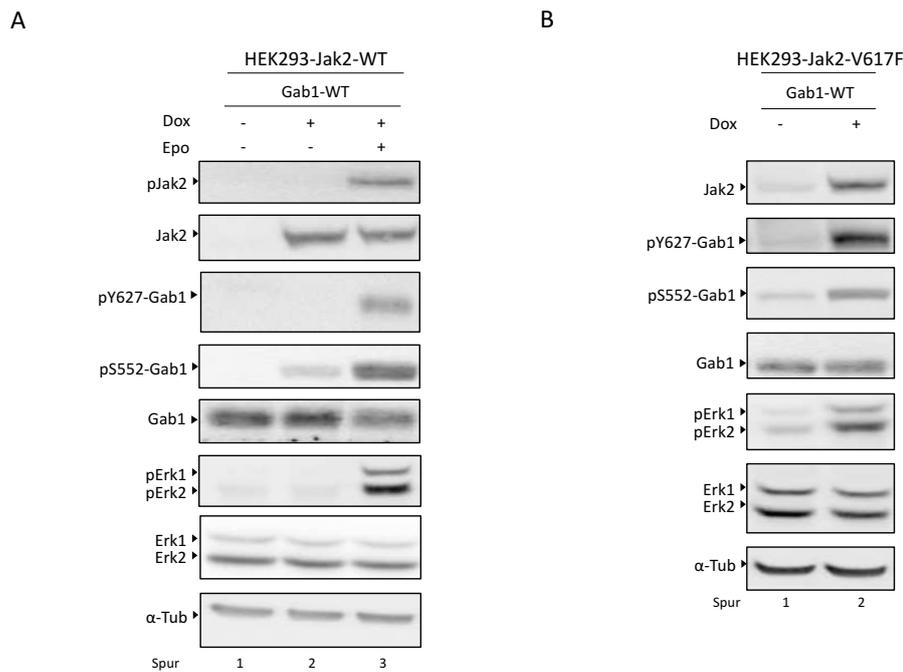


Abbildung 15: Die Epo- und Jak2-V617F- induzierte Phosphorylierung von Tyrosin 627 und Serin 552 in Gab1. Je 840.000 HEK293-Jak2-WT Zellen (A) bzw. HEK293-Jak2-V617F Zellen (B) wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit einem Expressionsvektor für Gab1-WT. Danach wurden die Zellen für 24 h mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) behandelt. HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden anschließend lysiert (B). HEK293-Jak2-WT Zellen wurden 15 min vor der Lyse zusätzlich mit 1 U/ml Epo stimuliert (A). Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen pJak2, pS552-Gab1, pY627-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2 und Gab1. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$.

4.3 Plasmamembran-Translokation und Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1

Die Expression der konstitutiv aktiven Jak2-V617F und die Epo-induzierte Aktivierung des Jak2-WT induzieren die Phosphorylierung von Gab1 am Serin 552. In der Hypothese zur Regulation der Plasmamembran-Translokation von Gab1 wird das S552 in Gab1 zunächst phosphoryliert. Die Phosphorylierung des Serins 552 führt zur Konformationsänderung in Gab1 und somit zur Exponierung der PH-Domäne. Die exponierte PH-Domäne kann mit PIP3 in der Plasmamembran interagieren. So kann Gab1 an die Plasmamembran rekrutiert werden und wird dort durch z.B. Jak2 an seinen Tyrosinen phosphoryliert. Gilt diese Hypothese zum chronologischen Ablauf der Vermittlung der Phosphorylierung des Serins 552 und der des Tyrosins 627 in Gab1 in der Jak2-V617F-induzierten und in der Epo-abhängigen und Jak2-WT vermittelten Signaltransduktion?

Zunächst wurde mit Hilfe konfokaler Mikroskopie die Lokalisation von Gab1-WT-GFP und Gab1-Mutanten in Jak2-V617F exprimierenden Zellen analysiert. Analog zur MAPPIT-Interaktionsanalyse (4.1) kamen dazu Gab1-Mutanten die am Serin 552 zu Alanin (Gab1-S552A-GFP) und Glutaminsäure (Gab1-S552E-GFP) oder an den Argininen R556 und R560 zu Alanin (Gab1-R556/560A-GFP) substituiert sind zum Einsatz. Zudem

wurde eine Gab1 Mutante, die eine Deletion der N-terminalen PH-Domäne (Gab1- Δ PH-GFP) aufweist, verwendet. HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Gab1-GFP bzw. deren Mutanten transfiziert und die Jak2-V617F Expression durch Doxycyclin Behandlung induziert. Die Gab1-Lokalisation wird mittels Lebend-Zell-Analyse durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie untersucht.

In HEK293-Jak2-V617F Zellen, die nicht mit Doxycyclin behandelt wurden, ist der Gab1-WT im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 16, Spur 1). Nach Induktion der Expression von Jak2-V617F ist Gab1-WT-GFP stark an der Plasmamembran lokalisiert.

Der Austausch des Serins 552 zu Glutaminsäure ahmt die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 nach. Unabhängig von der Jak2-V617F Expression ist Gab1-S552E-GFP in HEK293-Jak2-V617F an der Plasmamembran assoziiert (Abb. 16, Spur 3). In der MAPPIT-Interaktionsanalyse führt die Substitution des Serins 552 zu Glutaminsäure zur Störung der intramolekularen Interaktion in Gab1. Die exponierte PH-Domäne kann dadurch konstitutiv mit PIP3 in der Plasmamembran interagieren.

Auch die Substitution der Arginine 556 und 560 zu Alanin führte in der MAPPIT-Interaktionsanalyse zur Störung der intramolekularen Interaktion der PH-Domäne mit Gab1 (Abb. 12). Gab1-R556/560A-GFP ist daher analog zu Gab1-S552E-GFP, unabhängig von der Jak2-V617F Expression, konstitutiv mit der Plasmamembran assoziiert (Abb. 16, Spur 4).

Die Substitution des Serins 552 zu Alanin bewirkt, dass die Aminosäure an Position 552 in Gab1 nicht phosphoryliert werden kann. Nach Induktion der Jak2-V617F Expression ist diese Gab1-Mutante im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 16, Spur 2).

In HEK293-Jak2-V617F Zellen ist die Gab1- Δ PH-GFP Mutante unabhängig von der Jak2-V617F Expression im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 16, Spur 5).

So wird deutlich, dass die Expression der konstitutiv aktiven Jak2-V617F die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran induziert und die PH-Domäne die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran vermittelt. Analog zu den in der MAPPIT-Interaktionsanalyse erhaltenen Ergebnissen (Abschnitt 4.1) wird die inhibitorische intramolekulare Interaktion in Gab1 über die Interaktion der N-terminalen PH-Domäne mit den C-terminalen Argininen 556 und 560 in Gab1 vermittelt. Diese Interaktion wird durch die Phosphorylierung des Serins 552 aufgehoben. So ist die Jak2-V617F-induzierte Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 essentiell für die PH-vermittelte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran.

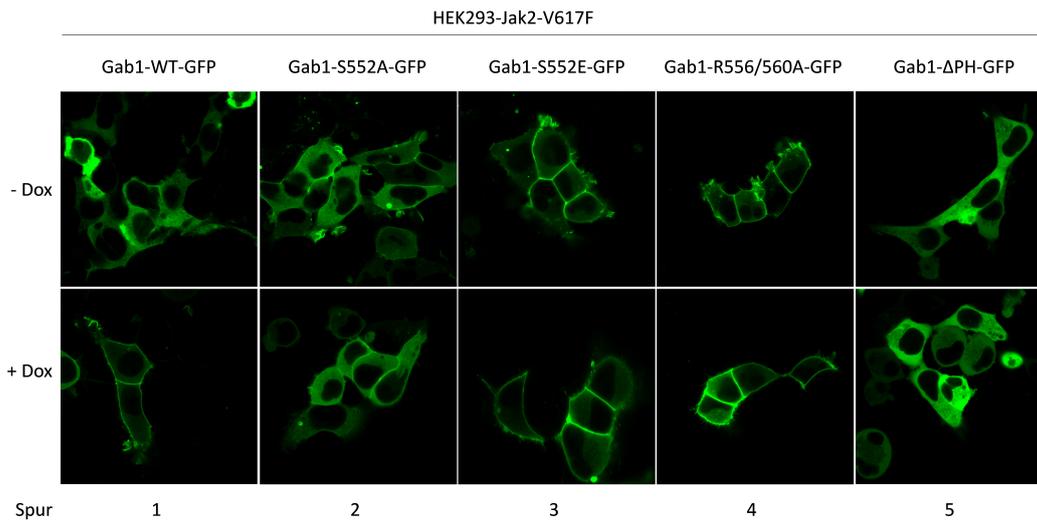


Abbildung 16: Die Jak2-V617F-induzierte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran ist abhängig von der Aufhebung der inhibitorischen intramolekularen Interaktion der PH-Domäne mit den Argininen 556 und 560. Je 350.000 HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden auf Poly-L-Lysin gecoateten Deckgläsern in 6 cm Schalen ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit Expressionsvektoren für Gab1-WT-GFP, Gab1-ΔPH-GFP, Gab1-S552A-GFP, Gab1-S552E-GFP oder Gab1-R556/560A-GFP. Danach wurden die Zellen für 24 h mit 2,5 ng/ml Doxycyclin behandelt. Die Lebend-Zell-Analyse wurde in einer Perfusionskammer mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (Zeiss LSM700) durchgeführt.

Doch welche Bedeutung hat die PH-vermittelte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran für die Phosphorylierung der Tyrosine in Gab1? Es ist nicht bekannt, ob Gab1 erst nach Rekrutierung an die Plasmamembran durch z.B. die rezeptor-assoziierte Jak2 bzw. Jak2-V617F phosphoryliert wird oder die Tyrosinphosphorylierung von Gab1 unabhängig von der Translokation an die Plasmamembran ist. Daher wurde die Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1-Mutanten, die nicht an die Plasmamembran rekrutiert werden können (Gab1-S552A, Gab1-ΔPH) oder konstitutiv an die Plasmamembran binden (Gab1-S552E, Gab1-R556/560A) wurde analysiert. Dafür wurden HEK293-Jak2-V617F Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren für Gab1-WT und Gab1-Mutanten oder mit einem nicht-kodierenden Expressionsvektor (mock) transfiziert. Es wurde hier GFP fusioniertes Gab1 eingesetzt, um die Ergebnisse besser mit den erhaltenen Mikroskop-Daten (Abb. 16) vergleichen zu können. Desweiteren erhöht der GFP-Tag die molekulare Masse des Gab1, so dass die Phosphorylierungen der exogenen Gab1-Konstrukte bei der Immundetektion unabhängig von endogenem Gab1 untersucht werden können. Nach der Transfektion wurde die Jak2-V617F Expression induziert. Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot und Immundetektion.

Die Expression von Gab1-WT-GFP und deren Mutanten erfolgte auf vergleichbaren Expressionsniveaus (Abb. 17). Unabhängig von der Überexpression von Gab1-WT und der Expression der Gab1-Mutanten induziert die Jak2-V617F Expression die Erk1/2-Phosphorylierung auf vergleichbaren Niveaus (Abb. 17, Vgl. Spur 2 und 4, 6, 8, 10, 12).

Die Induktion der Jak2-V617F Expression in den Gab1-WT-GFP exprimierenden Zellen hat die Phosphorylierung des Serins 552 und des Tyrosins 627 in Gab1-WT zur Folge (Abb. 17, Vgl. Spur 3 und 4).

Durch Substitution des Serins 552 zu Alanin in der Gab1-S552A Mutante kann keine Phosphorylierung an der Aminosäureposition 552 in dieser Mutante beobachtet werden (Abb. 17, Vgl. Spur 5 und 6). Die Gab1-S552A-Mutante wird durch Expression der Jak2-V617F am Tyrosin 627 phosphoryliert. Die Tyrosinphosphorylierung der Gab1-S552A Mutante hat im Vergleich zum Gab1-WT ein vergleichbares Niveau (Abb. 17, Vgl. Spur

4 und 6). Obwohl die Gab1-S552A-Mutante nicht an die Plasmamembran rekrutiert wird (Abb. 16), wird diese am Tyrosin 627 phosphoryliert.

Die Gab1 Mutanten Gab1-S552E und Gab1-R556/560A sind konstitutiv an der Membran assoziiert (Abb. 16). Erst nach Induktion der Jak2-V617F Expression werden diese Gab1-Mutanten am Tyrosin 627 phosphoryliert (Abb. 17, Vgl. Spur 7, 9 und 8, 10). Somit ist die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 abhängig von der Expression der konstitutiv aktiven Jak2-V617F. Die Jak2-V617F-induzierte Tyrosinphosphorylierung der Gab1-S552E und Gab1-R556/560A Mutanten erreicht das Phosphorylierungsniveau von Gab1-WT in Gab1-WT exprimierenden Zellen (Abb. 17, Vgl. Spur 4 und 8, 10). Durch Substitution des Serins 552 zu Glutaminsäure ist bei der Gab1-S552E Mutante keine S552-Phosphorylierung detektierbar (Abb. 17, Spur 8). Die konstitutiv an der Plasmamembran rekrutierte Gab1-R556/560A Mutante weist sowohl basal als auch Jak2-V617F-abhängig eine deutlich verstärkte Phosphorylierung des Serins 552 auf als es beim Gab1-WT beobachtet werden konnte (Abb. 17, Vgl. Spur 3,4 und 9, 10).

Die Gab1- Δ PH Mutante transloziert nach Induktion der Jak2-V617F-Expression nicht an die Plasmamembran (Abb. 16). In der Gab1- Δ PH Mutante ist das Niveau der Jak2-V617F-induzierten Serin 552 Phosphorylierung im Vergleich zum Gab1-WT deutlich erhöht (Abb. 17, Vgl. Spur 4 und 12). Gab1- Δ PH-GFP wird Jak2-V617F-induziert am Tyrosin 627 phosphoryliert (Abb. 17, Vgl. Spur 11 und 12). Jedoch ist diese Phosphorylierung im Vergleich zum Gab1-WT reduziert (Abb. 17, Vgl. Spur 4 und 12). Diese Beobachtung könnte auf eine verstärkende Wirkung der PH-vermittelten Translokation von Gab1 auf die Phosphorylierung des Tyrosins 627 deuten.

Die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 ist abhängig von der Expression der Jak2-V617F. Jedoch sind in Jak2-V617F exprimierenden Zellen die Phosphorylierung des Serins 552 und die PH-Domänen vermittelte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran nicht essentiell für die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1.

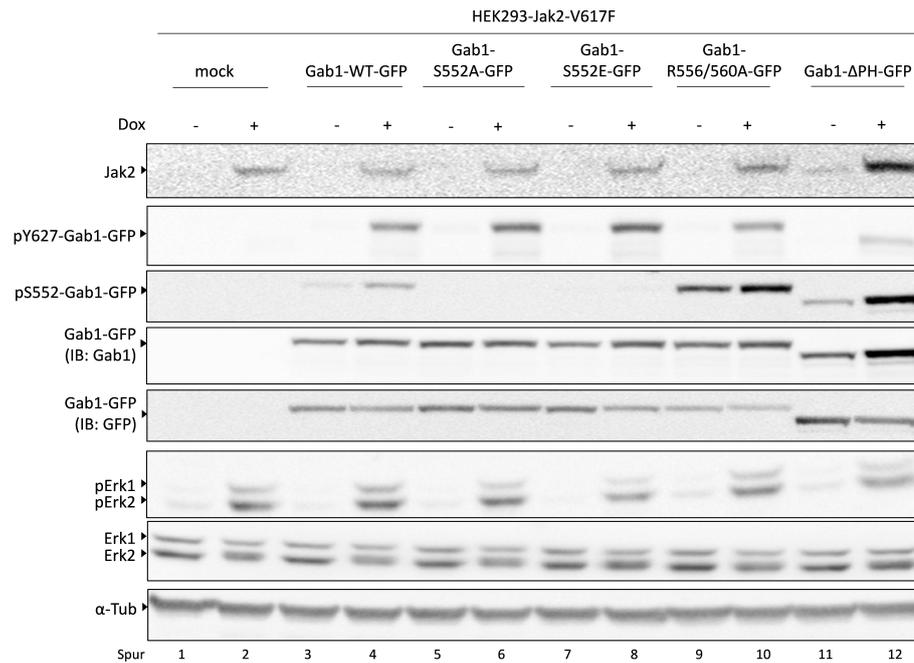


Abbildung 17: Die Bedeutung der Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 und der PH-Domänen vermittelten Plasmamembran-Translokation von Gab1 für die Tyrosinphosphorylierung von Gab1 in Jak2-V617F exprimierenden Zellen. Je 840.000 HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden wie angegeben mit einem nicht-kodierenden Expressionsvektor (mock) oder für Gab1-WT-GFP, Gab1-S552A-GFP, Gab1-S552E-GFP, Gab1-R556/560A-GFP, Gab1-ΔPH-GFP kodierende Expressionsvektoren transfiziert. Anschließend erfolgte die Induktion der Jak2-V617F Expression mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) für 24 h. Anschliessend erfolgte die Lyse der Zellen. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, pY627-Gab1, pS552-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Gab1 und GFP. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$.

Die Jak2-V617F-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1-Mutanten, die nicht an die Plasmamembran rekrutiert werden (Abb. 17), steht im Widerspruch zur Hypothese der Vermittlung der Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1 an der Plasmamembran. Diese Hypothese wurde durch Beobachtungen in der IL-6-induzierten Signaltransduktion entwickelt [101]. Handelt es sich bei der von der Lokalisation unabhängigen Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1 in Jak2-V617F exprimierenden Zellen um eine pathophysiologische Fehlregulation? Um eine mögliche Jak2-V617F induzierte Fehlregulation der Gab1 Tyrosin-Phosphorylierung erkennen zu können, wurde nachfolgend die Lokalisation und Phosphorylierung von Gab1 und Gab1-Mutanten in der Epo-abhängigen Signaltransduktion in Jak2-WT exprimierenden Zellen analysiert. Dazu wurden HEK293-Jak2-WT Zellen mit Expressionsvektoren für Gab1-GFP und Gab1-Mutanten transfiziert. Die Jak2-WT Expression wurde durch Behandlung mit Doxycyclin induziert und die Zellen nachfolgend mit Epo stimuliert. Die Lokalisation von Gab1 wird mittels Lebend-Zell-Analyse durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie untersucht.

Die Überexpression des Jak2-WT in Gab1-WT-GFP exprimierenden Zellen bewirkt im Gegensatz zur Expression der Jak2-V617F keine Translokation von Gab1 an die Plasmamembran (Abb. 18, Spur 1). Die Überexpression des Jak2-WT induziert somit keine Translokation von Gab1. Erst die Stimulation der Jak2-WT exprimierenden Zellen mit Epo induziert die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran. Erst nach der

liganden-abhängiger Aktivierung des Jak2-WT wird die Translokation von Gab1 induziert.

Analog zu den Beobachtungen in Jak2-V617F exprimierenden Zellen (Abb. 16) werden die Gab1-S552A und die Gab1- Δ PH Mutante auch nach Epo-Stimulation nicht an die Plasmamembran rekrutiert (Abb. 18, Spur 2 und 5). Die liganden-induzierte Aktivierung des Jak2-WT hat somit keinen Einfluss auf die Translokation dieser Gab1 Mutanten.

Unabhängig von der Jak2-WT Expression und einer Epo-Stimulation sind die Gab1-S552E und die Gab1-R556/560A Mutante konstitutiv an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 18, Spur 3 und 4).

Der Gab1-WT transloziert nach Epo-abhängiger Aktivierung der Tyrosin-Kinase Jak2 an die Plasmamembran. Die Epo-induzierte Translokation ist dabei abhängig von der PH-Domäne in Gab1 und vom Serin 552 in Gab1. Die Substitution des Serins 552 durch Glutamat wirkt phospho-mimetisch und ahmt somit die Phosphorylierung des Serins 552 nach und hebt die inhibitorische intramolekulare Interaktion in Gab1 auf. Die Phosphorylierung von Serin 552 führt somit zur Exponierung der Gab1-PH-Domäne und ermöglicht dadurch die PH-abhängige Interaktion von Gab1 mit PIP3 in der Plasmamembran. Die Phosphorylierung des Serins 552 ist daher essentiell für die Epo-induzierte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran.

Die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran ist demnach in der Epo-induzierten und in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion abhängig von der PH-Domäne in Gab1 und vom Phosphorylierungsstatus des Serins 552. Jedoch induziert die konstitutive Aktivität der Jak2-V617F bereits zytokin-unabhängig eine konstitutive Translokation von Gab1 an die Plasmamembran, die die Pathogenität der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion bewirken könnte.

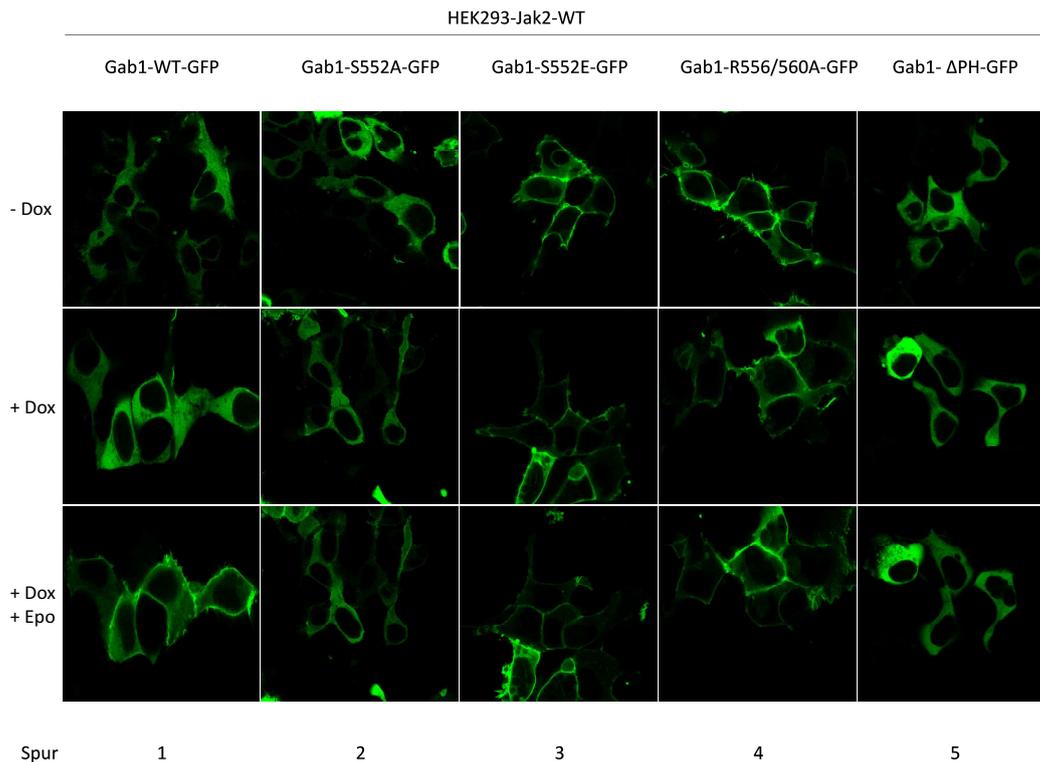


Abbildung 18: Die Epo- induzierte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran ist abhängig von der Aufhebung der inhibitorischen intramolekularen Interaktion der PH-Domäne mit den Argininen 556 und 560. Je 350.000 HEK293-Jak2-WT Zellen wurden auf Poly-L-Lysin gecoateten Deckgläsern in 6 cm Schalen ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit Expressionsvektoren für Gab1-WT-GFP, Gab1- Δ PH-GFP, Gab1-S552A-GFP, Gab1-S552E-GFP oder Gab1-R556/560A-GFP. Danach wurden die Zellen für 24 h mit 2,5 ng/ml Doxycyclin behandelt. Die Lebend-Zell Analyse wurde in einer Perfusionskammer mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (Zeiss LSM700) durchgeführt. Die Stimulation der Zellen erfolgte 15 min mit 1 U/ml Epo.

Die in Jak2-V617F exprimierenden Zellen beobachtete Unabhängigkeit der Tyrosin-Phosphorylierung von der Translokation von Gab1 an die Plasmamembran (Abb. 17) könnte durch die Expression der konstitutiv aktiven Jak2-V617F Mutante verursacht werden. Daher wurde die Phosphorylierung von Gab1-WT und dessen Mutanten auch in Jak2-WT exprimierenden Zellen nach Epo-Stimulation untersucht. HEK293-Jak2-WT Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Gab1-WT-GFP und dessen Mutanten oder mit einem nicht-kodierenden Expressionsvektor (mock) transfiziert. Die Induktion der Jak2-WT Expression erfolgte durch Doxycyclin-Behandlung der Zellen. 15 min vor Lyse der Zellen, wurden die Zellen mit 1 U/ml Epo stimuliert. Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot und Immundetektion.

Die Expression von Gab1-WT und dessen Mutanten erfolgte auf vergleichbaren Niveaus (Abb. 19). Die Induktion der Expression von Jak2-WT induzierte keine Phosphorylierung von Jak2, Gab1 und Erk1/2 (Abb. 19, Vgl. Spur 1 und 2, 4, 6, 8, 9, 10, 12). Durch die Stimulation mit Epo wurde die Phosphorylierung von Jak2 und die Phosphorylierung von Erk1/2 induziert. Die Expression von Gab1-WT-GFP oder dessen Mutanten hatte keinen Einfluss auf die Erk1/2-Phosphorylierung (Abb. 19, Vgl. Spur 3 und 5, 7, 9, 11, 13).

Die Stimulation der Zellen mit Epo induziert die S552- und die Y627-Phosphorylierung im Gab1-WT (Abb. 19, Vgl. Spur 4 und 5). Die konstitutiv an der Membran rekrutierten

Gab1 Mutanten Gab1-S552E und Gab1-R556/560A werden erst nach Epo-Stimulation am Tyrosin 627 phosphoryliert.

Die Gab1-S552A- und die Gab1- Δ PH-Mutante, die nicht Epo-induziert an die Plasmamembran translozieren (Abb. 18), werden Epo-abhängig am Tyrosin 627 phosphoryliert (Abb. 19, Spur 7 und 13). Die Epo-induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 627 der Gab1- Δ PH Mutante ist jedoch geringer als im Gab1-WT (Abb. 19, Vgl Spur 5 und 13).

Sowohl in der Epo-abhängigen als auch in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion werden die Gab1-R556/560A und die Gab1- Δ PH Mutante stärker als Gab1-WT am Serin 552 phosphoryliert (Abb. 19, Vgl. Spur 4, 5 und 10, 11 bzw. 12, 13).

Die Epo-abhängige Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 ist, wie in Jak2-V617F-exprimierenden Zellen, unabhängig von der Phosphorylierung des Serins 552 und der Plasmamembran-Translokation von Gab1. Die Entkopplung der Gab1-Tyrosinphosphorylierung von der PH-Domänen-vermittelten Translokation an die Plasmamembran ist somit kein Effekt, der spezifisch durch die Jak2-Mutante, Jak2-V617F, hervorgerufen wird. Die Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran ist in der Epo-R-vermittelten Signaltransduktion nicht essentiell für die Vermittlung der Tyrosin 627 Phosphorylierung von Gab1.

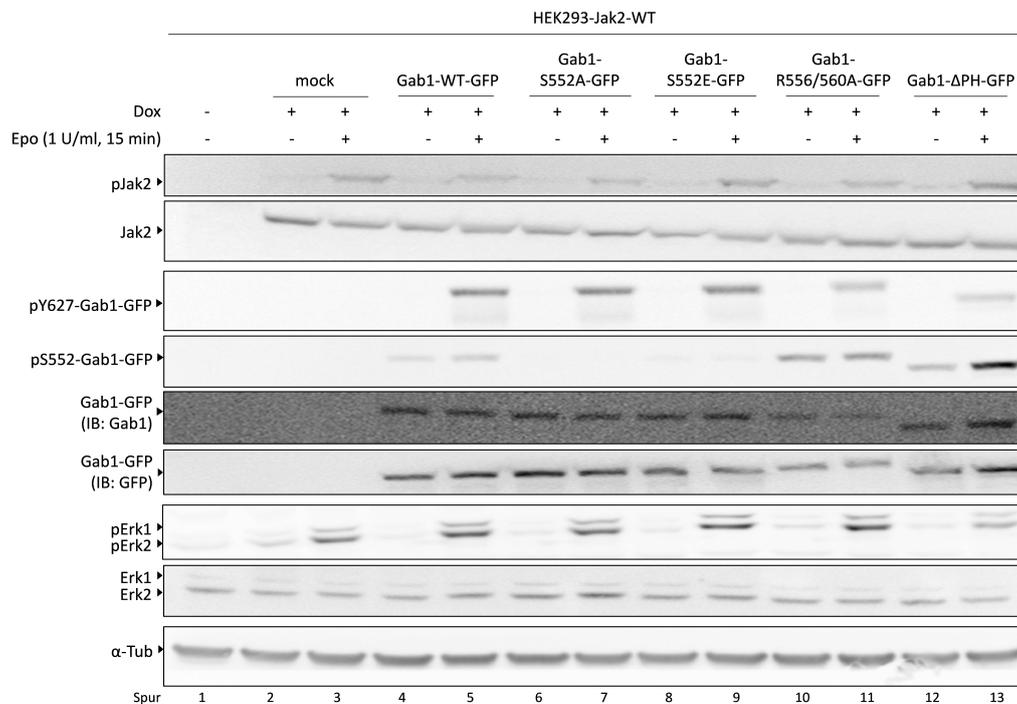


Abbildung 19: Die Bedeutung der Plasmamembran-Translokation von Gab1 für die Phosphorylierung von Gab1 in der Epo-induzierten Signaltransduktion. Je 700.000 HEK293-Jak2-WT Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden wie angegeben mit einem nicht-kodierenden Expressionsvektor (mock) oder für Gab1-WT-GFP, Gab1-S552A-GFP, Gab1-S552E-GFP, Gab1-R556/560A-GFP, Gab1- Δ PH-GFP kodierende Expressionsvektoren transfiziert. Anschließend erfolgte die Induktion der Jak2-WT Expression mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) für 24 h. Nach Stimulation der Zellen für 15 min mit 1 U/ml Epo wurden die Zellen lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen pJak2, Jak2, pY627-Gab1, pS552-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Gab1 und GFP. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n = 3.

In der Epo- und in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion ist die Phospho-

rylierung des Tyrosins 627 in Gab1 unabhängig von der Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran. Jedoch ist die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1- Δ PH, die nicht an die Plasmamembran translozieren kann (Abb. 16 und 18), im Vergleich zum Gab1-WT reduziert (Abb. 17 und 19). Wirkt sich die fehlende Plasmamembranrekrutierung auf die Phosphorylierungskinetik des Tyrosins 627 in Gab1 aus? In der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion wird Gab1 konstitutiv an die Plasmamembran rekrutiert und phosphoryliert. So geht die Information über die initiale Kinetik der Epo-R-vermittelten Gab1-Phosphorylierung in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion verloren. Um den Ablauf der initialen Phosphorylierungen von Gab1 in Abhängigkeit seiner Translokation an die Plasmamembran genauer zu untersuchen, wurde in Jak2-WT exprimierenden Zellen die Epo-induzierte Phosphorylierungskinetik der Gab1-S552A und der Gab1- Δ PH Mutante im Vergleich zum Gab1-WT untersucht.

HEK293-Jak2-WT Zellen wurden mit einem nicht-kodierenden (mock) Expressionsvektor oder mit Expressionsvektoren für Gab1-WT-GFP, Gab1- Δ PH-GFP oder Gab1-S552A-GFP transfiziert. Die Induktion der Jak2-WT Expression erfolgte mit Doxycyclin. Die Stimulation der Zellen wurde mit Epo (1 U/ml) für die in Abbildung 20 angegebenen Zeiträume vorgenommen.

Die Expression von Gab1-WT und deren Mutanten war gleichmäßig (Abb. 20). Der zeitliche Verlauf und das Niveau der Epo-induzierten Jak2- und Erk1/2-Phosphorylierung ist auf einem vergleichbaren Niveau und unabhängig von der Expression von Gab1 oder deren Mutanten (Abb. 20).

Nach Epo-Stimulation wird Gab1-WT-GFP am S552 phosphoryliert (Abb. 20, Spur 6-10). Diese Phosphorylierung nimmt bis 15 min Stimulation kontinuierlich zu (Abb. 20, Spur 6-10). Dagegen erfolgt die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1-WT-GFP transienter und erreicht bereits nach 2 bis 5 min Epo-Stimulation ein Maximum (Abb. 20, Spur 7, 8).

Die Gab1- Δ PH Mutante ist bereits basal und während der gesamten Dauer der Epo-Stimulation stärker als der Gab1-WT am Serin 552 phosphoryliert (Abb. 20, Vgl. Spuren 6-10 mit 11-15). Sowohl in der Gab1-R556/560A Mutante (Abb. 19) als auch in der Gab1- Δ PH Mutante ist das Phosphorylierungsniveau des Serins 552 im Vergleich zum Gab1-WT erhöht. Die intramolekulare Interaktion der PH-Domäne mit den Argininen 556 und 560 scheint die Effizienz der Phosphorylierung des Serins 552 zu verringern. Die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1- Δ PH nimmt über die Zeit kontinuierlich zu (Abb. 20, Spur 11-15). Im Vergleich zum Gab1-WT ist das Tyrosin 627 in Gab1- Δ PH zu allen beobachteten Zeitpunkten schwächer phosphoryliert (Abb. 20, Vgl. Spuren 6-10 mit 11-15).

In Folge der Substitution des Serins 552 zu Alanin ist keine Phosphorylierung der Aminosäureposition 552 in Gab1-S552A detektierbar (Abb. 20, Spur 16-20). Die Phosphorylierung von Tyrosin 627 in Gab1-S552A ist im Vergleich zum Gab1-WT nach 2 und 5 min Stimulation geringer (Abb. 20, Vgl. Spur 7, 17 und 8, 18). Im Vergleich zum Gab1-WT ist das Phosphorylierungsniveau des Tyrosins 627 in der Gab1-S552A Mutante 10 und 15 min nach Epo-Stimulation erhöht (Abb. 20, Vgl. Spur 9, 10 und 19, 20).

Die PH-Domänen-vermittelte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran ist in der frühen Epo-R-vermittelten Signaltransduktion nicht essentiell für die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1. Die zeitliche Auflösung der Phosphorylierungskinetik von Gab1 deutet allerdings darauf hin, dass die PH-vermittelte Translokation von Gab1 zur Plasmamembran die Geschwindigkeit der Vermittlung der Phosphorylierung von Gab1 am Tyrosin 627 erhöht.

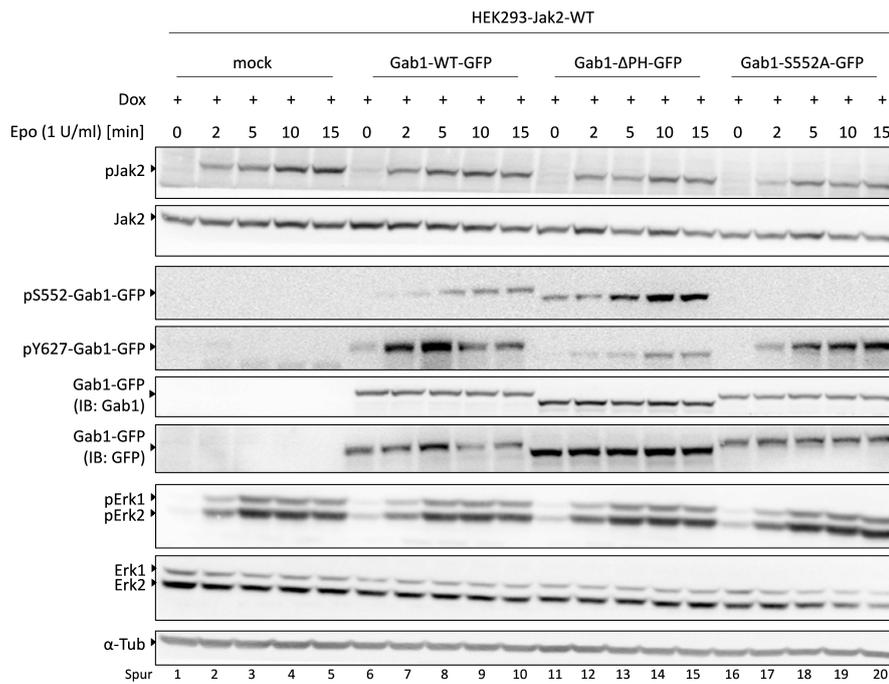


Abbildung 20: Die Epo-induzierte Phosphorylierungskinetik des Tyrosins 627 in Gab1 in Abhängigkeit der PH-Domänen-vermittelten Plasmamembrantranslokation und der Phosphorylierung des Serin 552 in Gab1. Je 700.000 HEK293-Jak2-WT Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden wie angegeben mit einem nicht-kodierenden Expressionsvektor (mock) oder für Gab1-WT-GFP, Gab1-S552A-GFP, Gab1-ΔPH-GFP kodierende Expressionsvektoren transfiziert. Anschließend erfolgte die Induktion der Jak2-WT Expression mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) für 24 h. Nach Stimulation der Zellen für die angegebenen Zeiträume mit 1 U/ml Epo wurden die Zellen lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen pJak2, pY627-Gab1, pS552-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α-Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, Gab1 und GFP. Die Färbung von α-Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n = 3.

4.4 Bedeutung der PI3K- und MAPK-Aktivität für die Jak2-V617F- und Epo-induzierte Plasmamembran-Translokation und Phosphorylierung von Gab1

Die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran ist sowohl in Jak2-WT- als auch in Jak2-V617F exprimierenden Zellen abhängig von der Phosphorylierung des Serins 552. Der hypothetische Mechanismus zur MAPK-abhängigen Translokation von Gab1 ist dabei durch die Erk-abhängige Phosphorylierung des Serins 552 beschrieben [101, 103]. Die Zugabe des Mek-Inhibitors U0126 bewirkt in Jak2-V617F- und Gab1-WT-GFP exprimierenden Zellen die Translokation von Gab1 von der Membran in das Zytoplasma (Abb. 21A). Die Behandlung der Jak2-V617F exprimierenden Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO hat dagegen keinen Einfluss auf die Jak2-V617F-induzierte Lokalisation von Gab1-WT-GFP an der Plasmamembran. Die Jak2-V617F-induzierte konstitutive Lokalisation von Gab1 an der Plasmamembran ist somit abhängig von der MAPK-Aktivität.

Ist die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 abhängig von der Jak2-V617F-induzierten MAPK-Aktivität?

Mit Hilfe des von der AG Feller bereitgestellten Antikörpers, der das Epitop LQAPVR-[pS552]-PITRSF in Gab1 bindet, war es erstmals möglich diese Hypothese zur MAPK-abhängigen Phosphorylierung des Serins 552 zu untersuchen.

Die Expression von Jak2-V617F induziert die Phosphorylierung von Gab1-WT-GFP am Serin 552 und am Tyrosin 627 (Abb. 21B, Vgl. Spur 1 und 2). Die Behandlung der Jak2-V617F exprimierenden Zellen mit dem Mek-Inhibitor U0126 reduziert die Erk-Phosphorylierung (Abb. 21B, Vgl. Spur 2 und 3). Desweiteren nimmt die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 durch die Inhibition von Mek ab (Abb. 21B, Vgl. Spur 2 und 3). Die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 und die Rekrutierung an die Plasmamembran sind somit von der Jak2-V617F-induzierten MAPK-Aktivität abhängig.

Die Phosphorylierung von Gab1 am Tyrosin 627 ist durch Mek-Inhibition jedoch nicht verändert (Abb. 21B, Vgl. Spur 2 und 3). Die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 ist daher unabhängig von der MAPK-abhängigen Phosphorylierung des Serins 552 und der Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran.

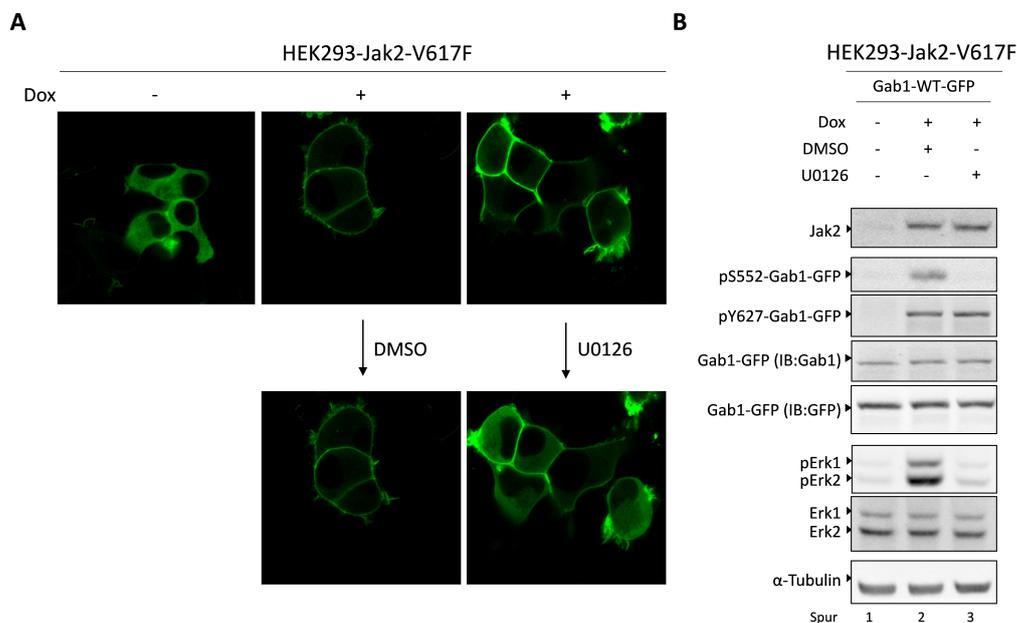


Abbildung 21: Der Einfluss der MAPK-Kaskade auf die Gab1 Lokalisation und Phosphorylierung von Serin 552 und Tyrosin 627 in Gab1 in Jak2-V617F exprimierenden Zellen. A) Je 350.000 HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden auf Poly-L-Lysin gecoateten Deckgläsern in 6 cm Schalen ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit einem Expressionsvektor für Gab1-WT-GFP. Danach wurden die Zellen für 24 h mit 2,5 ng/ml Doxycyclin behandelt. Die Lebend-Zell Analyse wurde in einer Perfusionskammer mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (Zeiss LSM700) durchgeführt. Die Zellen wurden 30 min mit 10 μ M U0126 oder DMSO behandelt. B) Je 840.000 HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden weiterhin mit einem Expressionsvektor für den Gab1-WT-GFP transfiziert. Zur Induktion der Expression des Jak2 wurden die HEK293-Jak2-V617F Zellen wie angegeben mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) über 24 h behandelt. 30 min vor der Lyse der Zellen wurden die Zellen mit DMSO oder mit 20 μ M U0126 behandelt und anschließend lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, pS552-Gab1, pY627-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Gab1 und GFP. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$.

Ist in der Epo-induzierten und Jak2-WT vermittelten Signaltransduktion die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 ebenfalls unabhängig von der MAPK-induzierten Rekrutierung an die Plasmamembran?

Jak2-WT exprimierende HEK293 Zellen wurden vor Epo-Stimulation mit steigenden Konzentrationen des Mek-Inhibitors U0126 behandelt (Abb. 22). Anschließend wurden

die Zellen für 15 min mit 1 U/ml Epo stimuliert. Die Stimulation der Zellen mit Epo induziert die Phosphorylierung von Jak2, Gab1 und Erk1/2 (Abb. 22, Vgl. Spur 2 und 3). Die Jak2-Phosphorylierung ist unabhängig von der Mek-Aktivität (Abb. 22, Vgl. Spur 3 mit 4-8). Bereits in einer Konzentration von 5 μ M reduziert U0126 die Erk1/2-Phosphorylierung auf ein basales Niveau (Abb. 22, Vgl. Spur 2 und 5). Mit zunehmender U0126-Konzentration nimmt das Phosphorylierungsniveau des Serins 552 in Gab1 nach Epo-Stimulation ab (Abb. 22). Mit verringerter Erk1/2-Phosphorylierung bzw. MAPK-Aktivität nimmt daher auch die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 ab. Eine Inhibition der MAPK-Aktivität resultiert jedoch nicht in einer Reduktion der Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 (Abb. 22). Auch ohne MAPK-abhängige Phosphorylierung von Serin 552 wird Gab1 am Tyrosin 627 nach Epo-Stimulation in Jak2-WT exprimierenden Zellen phosphoryliert.

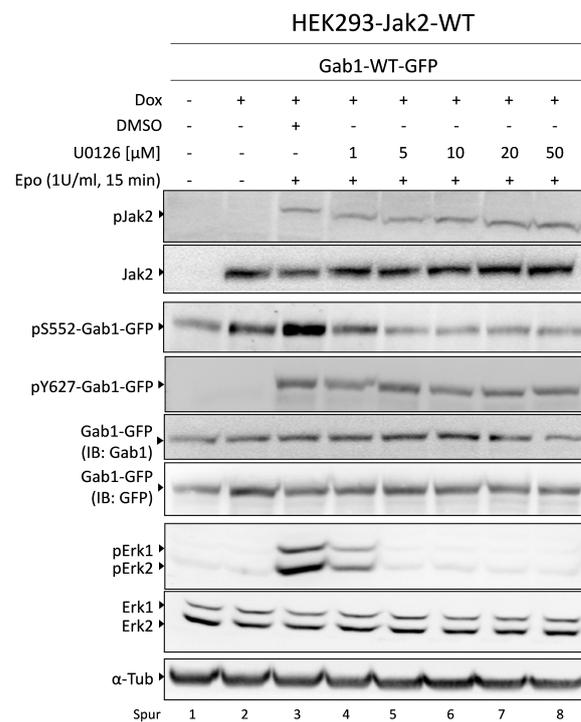


Abbildung 22: Die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 ist unabhängig von der Epo-induzierten MAPK-Aktivierung und der MAPK-abhängigen Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1. Je 700.000 HEK293-Jak2-WT Zellen wurden auf 6-well-Platten ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit einem Expressionsvektor für Gab1-WT-GFP. Danach wurden die Zellen für 24 h mit 2,5 ng/ml Doxycylin (Dox) inkubiert. 30 min vor Epo-Stimulation erfolgte die Behandlung der Zellen mit DMSO oder U0126. Nach Stimulation mit 1 U/ml Epo wurden die Zellen lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen pJak2, pY627-Gab1, pS552-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, Gab1 und GFP. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$.

Neben der MAPK-Aktivität ist auch das Vorhandensein von PIP3 in der Plasmamembran essentiell für die Interaktion der Gab1-PH-Domäne mit der Plasmamembran [110, 111, 101]. Die Katalyse von PIP2 zu PIP3 wird durch die PI3-Kinase vermittelt. Somit ist die PI3K-Aktivität bedeutend für die Jak2-V617F-induzierte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran [103]. Doch welche Auswirkung hat die Gab1-PH-Domänen Interaktion mit PIP3 auf die Phosphorylierung von Gab1 am Tyrosin 627? Um die Be-

deutung der PI3K-induzierten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran für die Phosphorylierung der Gab1-Tyrosine genauer zu untersuchen, wurde die PI3K-Kaskade mit einem PI3K-Inhibitor gehemmt.

Die Inhibition der PI3K-Aktivität mit dem Inhibitor LY294002 führt zur Translokation von Gab1 von der Plasmamembran in das Zytoplasma (Abb. 23A). Die Behandlung der Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 hat zur Folge, dass die PI3K-abhängige Phosphorylierung von Akt am Serin 473 inhibiert wird und somit nicht mehr detektiert werden kann (Abb. 23B, Spur 4). Durch die Inhibition der PI3K-Aktivität ist neben der Verringerung der Akt-Phosphorylierung auch eine reduzierte Phosphorylierung von Erk1/2 in Jak2-V617F exprimierenden Zellen zu beobachten (Abb. 23B, Vgl. Spur 3 und 4). Die Inhibition der PI3K-Aktivität und somit die Störung der Translokation von Gab1 an die Plasmamembran (Abb. 23A) hat jedoch keine Auswirkung auf die Jak2-V617F vermittelte Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 (Abb. 23B, Vgl. Spur 3 und 4).

Daher ist die PH-Domänen vermittelte Translokation von Gab1 an PIP3 in der Plasmamembran nicht essentiell für die Jak2-V617F-induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1.

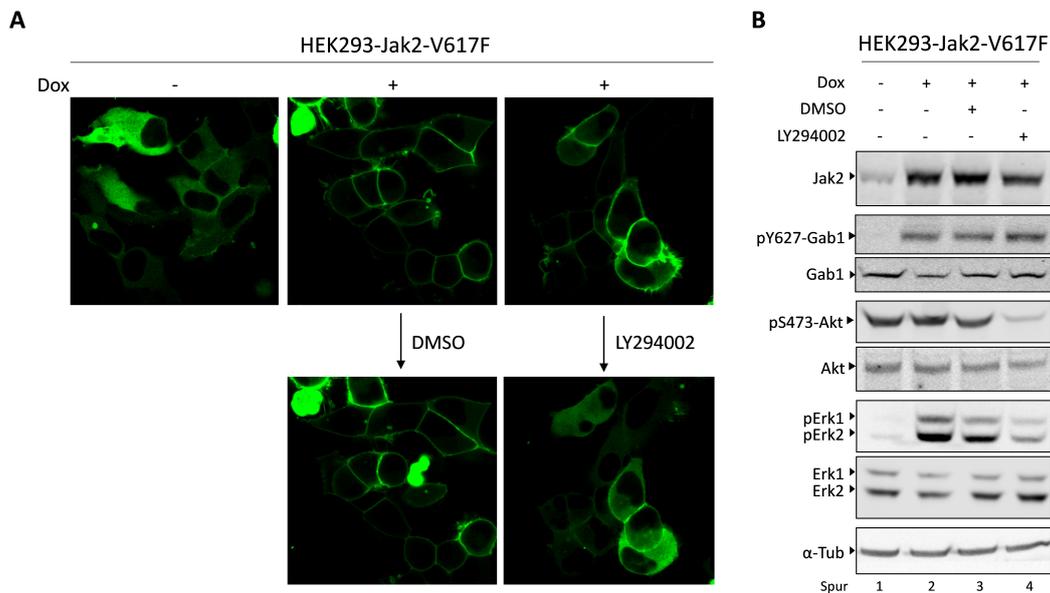


Abbildung 23: Die PI3K-abhängige Translokation von Gab1 an die Plasmamembran und deren Bedeutung für die Phosphorylierung des Tyrosins 627 von Gab1 in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion. A) Je 350.000 HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden auf Poly-L-Lysin gecoateten Deckgläsern in 6 cm Schalen ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit einem Expressionsvektor für Gab1-WT-GFP. Danach wurden die Zellen für 24 h mit 2,5 ng/ml Doxycyclin behandelt. Die Lebend-Zell Analyse wurde in einer Perforationskammer mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (Zeiss LSM700) durchgeführt. Die Zellen wurden 30 min mit 40 μ M LY294002 oder DMSO behandelt. B) Je 840.000 HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Anschließend erfolgte die Induktion der Jak2-V617F Expression mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) für 24 h. 30 min vor der Lyse wurden die Zellen mit DMSO oder 40 μ M LY294002 behandelt. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, pY627-Gab1, pS473-Akt, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Gab1, Akt und GFP. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$.

Jak2-V617F induziert die konstitutive Translokation an die Plasmamembran und die konstitutive Phosphorylierung von Gab1. Die initiale Phosphorylierungskinetik der Epo-R-vermittelten Gab1-Phosphorylierung kann daher in Jak2-V617F-exprimierenden Zellen nicht beobachtet werden. Um die initiale Phosphorylierungskinetik von Gab1 in Abhängigkeit der PI3K-abhängigen Translokation an die Plasmamembran zu untersuchen, wurde in Jak2-WT exprimierenden Zellen die Epo-induzierte Phosphorylierungskinetik von Gab1 nach PI3K-Inhibition untersucht. Zunächst wurden die Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO oder dem PI3K-Inhibitor behandelt. Die Zellen wurden für 30 min mit Epo stimuliert.

Die Induktion der Jak2-WT-Expression induziert keine Phosphorylierung von Jak2, Gab1 oder Erk1/2 (Abb. 24, Spur 2 und 8). Akt ist konstitutiv am Serin 473 phosphoryliert. Die Inhibition der PI3K durch LY294002 inhibiert die Phosphorylierung von Akt am Serin 473 (Abb. 24, Vgl. Spur 1-7 und 8-13).

Nach Epo-Stimulation wird Jak2-WT sowohl nach DMSO- als auch nach LY294002-Behandlung auf ein vergleichbares Niveau phosphoryliert (Abb. 24).

In PI3K-Inhibitor behandelten Zellen wird die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 induziert und ist im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen leicht reduziert (Abb. 24, Vgl. Spuren 2-7 mit 9-13).

Die Erk1/2-Phosphorylierung nimmt nach Epo-Stimulation kontinuierlich zu und erreicht 15 min nach Stimulation ein Maximum (Abb. 24, Spur 2-7). Die Behandlung der Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 bewirkt, dass die Erk1/2-Phosphorylierung 2 bis 15 min nach Stimulation deutlich geringer ist als in den mit DMSO behandelten Zellen (Abb. 24, Vgl. Spuren 3-6 mit 10-12).

Die Hemmung der PI3K-Aktivität inhibiert die PIP3-Synthese in der Plasmamembran. Bei Inhibition der PI3-Kinaseaktivität wird Gab1-WT-GFP somit nicht mehr an die Plasmamembran rekrutiert. Trotz der PI3K-Inhibition wird Gab1-WT-GFP aber Epo-induziert am Tyrosin 627 phosphoryliert. Die initiale Phosphorylierungskinetik dieses Tyrosins zeigt aber, dass die Phosphorylierung langsamer vermittelt wird, wenn Gab1 nicht an die Plasmamembran rekrutiert werden kann. Dies konnte auch bei der Epo- und der Jak2-V617F-induzierten Phosphorylierung des Tyrosin 627 der Gab1- Δ PH Mutante, deren PH-Domäne deletiert ist, beobachtet werden (Abb.20). Zusammen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 in der Epo-R-vermittelten Signaltransduktion unabhängig von der Translokation von Gab1 an die Plasmamembran ist. Jedoch trägt die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran zur Erhöhung der Effizienz der Phosphorylierung des Tyrosins 627 bei.

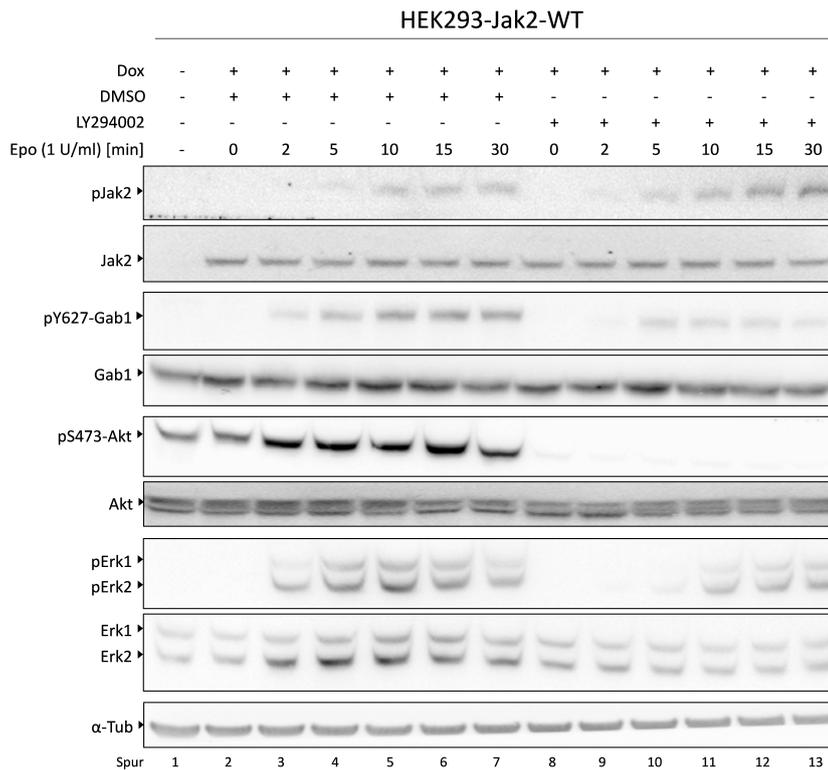


Abbildung 24: Die Bedeutung der PI3K-Aktivität für die Kinetik der Phosphorylierung von Gab1 in der Epo-induzierten Signaltransduktion. Je 840.000 HEK293-Jak2-WT Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Anschließend erfolgte die Induktion der Jak2-WT Expression mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) für 24 h. 30 min vor Epo-Stimulation wurden die Zellen mit DMSO oder 40 μ M LY294002 behandelt. Nach Stimulation der Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten mit 1 U/ml Epo wurden die Zellen lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen pJak2, pY627-Gab1, pS473-Akt, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, Gab1, Akt und GFP. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$.

4.5 Jak2-V617F induziert die Rekrutierung von Interaktionspartnern an Gab1

Die PH-Domänen-vermittelte Plasmamembranrekrutierung von Gab1 ist für die Phosphorylierung der Tyrosine von Gab1 in Jak2-V617F- und Jak2-WT exprimierenden Zellen nicht essentiell (siehe Abb. 23 und 24). Gibt es einen zur PH-Domänen-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran alternativen Rekrutierungsmechanismus von Gab1 in die Nähe von Tyrosin-Kinasen, die an der Plasmamembran lokalisiert sind? Kann Gab1 z.B. so wie mit c-Met [120, 119] und dem EGF-R [122] auch mit dem Epo-R interagieren?

HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden mit Expressionvektoren für Gab1-WT-GFP transfiziert. Die Jak2-V617F Expression wurde mit Doxycyclin induziert. Nach Lyse der Zellen, wurde Gab1-GFP präzipitiert. Daraufhin erfolgte sowohl die Analyse des Totallysats als auch der Präzipitate und derer Co-Präzipitate.

Die Expression von Jak2-V617F induziert die Phosphorylierung von Erk1/2 und von Gab1-WT-GFP am Tyrosin 627 (Abb. 25A).

Die Präzipitation von Gab1-WT-GFP aus Lysaten von Jak2-V617F und Gab1-WT-GFP exprimierenden Zellen mit Hilfe eines GFP-Antikörpers zeigt, dass Grb2 unabhängig

von einer Jak2-V617F-Expression an Gab1 bindet (Abb. 25B). Durch Jak2-V617F Expression wird die Bindung von SHP2 an Gab1 induziert. An Gab1 gebundenes SHP2 ist zudem am Tyrosin 542 phosphoryliert (Abb. 25B).

Jak2-V617F-induziert kommt es auch zur Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R (Abb. 25B, Spur 2). Aufgrund dieser Beobachtung wurde der Epo-R mit Hilfe eines Epo-R-Antikörpers aus dem Totallysat präzipitiert. Die Analyse des daraus erhaltenen Co-Präzipitats zeigt, dass durch die Expression von Jak2-V617F die Interaktion vom Epo-R und Gab1-WT-GFP verstärkt wird (Abb. 25B, Vgl. Spur 1 und 2).

So wird neben der Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 auch die Gab1:SHP2-Interaktion durch die Expression der Jak2-V617F induziert und konstitutiv vermittelt. Jak2-V617F induziert kommt es zudem zur Interaktion von Gab1-WT-GFP mit dem Epo-R.

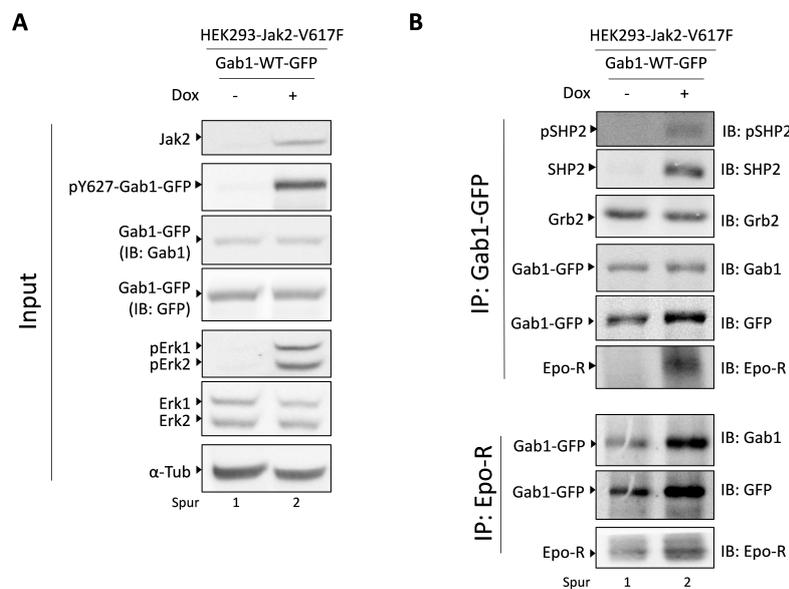


Abbildung 25: Jak2-V617F induziert die Rekrutierung von SHP2 an Gab1 und die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R. 840.000 HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für Gab1-WT-GFP transfiziert. Anschließend erfolgte die Induktion der Jak2-V617F Expression mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) für 24 h. A) Die Analyse des Totallysats erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, pY627-Gab1, pS552-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Gab1 und GFP. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. B) Gab1-WT-GFP bzw. Epo-Rezeptor wurden zunächst mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Die Analyse der Präzipitate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen pSHP2, Grb2 und Gab1. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Epo-R, SHP2 und GFP. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ Experimenten.

4.6 Die Bedeutung der PH-Domänen-vermittelten Translokation für die Rekrutierung von Gab1-Interaktionspartnern

Die Phosphorylierung des Serins 552 induziert die Aufhebung der intramolekularen Interaktion der PH-Domäne mit dem C-terminalen Bereich von Gab1 und induziert eine Konformationsänderung in Gab1, die die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran ermöglicht. Bewirkt die intramolekulare Interaktion in Gab1 die sterische Blockade der Interaktionen von Gab1 mit seinen Bindungspartnern? Haben die Phosphorylierung des

Serins 552, die Lokalisation von Gab1 bzw. die Membranrekrutierung von Gab1 einen Einfluss auf die Rekrutierung von Bindungspartnern wie SHP2? Ist die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R abhängig von der MAPK-Aktivität, dem Serin 552 oder der PH-Domäne in Gab1?

Die Behandlung Jak2-V617F exprimierender HEK293-Jak2-V617F Zellen mit dem Mek-Inhibitor U0126 reduziert die Jak2-V617F-induzierte Erk1/2-Phosphorylierung und die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 (Abb. 26 A, Vgl. Spur 2 und 3). Die Inhibition von Mek verhindert zudem die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran (Abb. 21A). Die fehlende Phosphorylierung des Serins 552 in der Gab1-S552A Mutante und die Deletion der N-terminalen PH-Domäne in Gab1 verhindern ebenfalls die Jak2-V617F-induzierte Translokation dieser Gab1-Mutanten an die Plasmamembran (Abb. 16). Die Interaktion von Grb2 mit Gab1 ist von der MAPK-Aktivität, der Phosphorylierung des Serins 552 und der PH-Domäne in Gab1 unabhängig (Abb. 26 B, D, F). Trotz Inhibition der Jak2-V617F-induzierten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran durch Mek-Inhibition, Substitution des Serins 552 durch Alanin oder Deletion der PH-Domäne werden der Gab1-WT-GFP, die Gab1-S552A- und die Gab1- Δ PH-Mutante an deren Tyrosin 627 phosphoryliert (Abb. 26 A, C, E). Die Expression von Jak2-V617F induziert die Rekrutierung von SHP2 an Gab1-S552A und Gab1- Δ PH (Abb. 26 D, F). Die Interaktion von SHP2 mit Gab1-WT-GFP ist unabhängig von der MAPK-Aktivität (Abb. 26 B). Unabhängig von der PH-Domäne oder der Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 interagiert Gab1 mit dem Epo-R in Jak2-V617F exprimierenden Zellen (Abb. 26 B, D, F). Die Gab1:Epo-R Interaktion wird unabhängig von der MAPK-Kaskade vermittelt (Abb. 26 B). Somit wird deutlich, dass weder die Phosphorylierung des Serins 552 noch die Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran einen Einfluss auf die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 und auf die Interaktion von Gab1 mit SHP2 und dem Epo-R haben. Könnte die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R also ein alternativer Mechanismus sein, um Gab1 unabhängig von der Plasmamembranrekrutierung in die Nähe der am Rezeptor-assoziierten Jak2-V617F zu rekrutieren? Wie wird die Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R durch Jak2-V617F vermittelt?

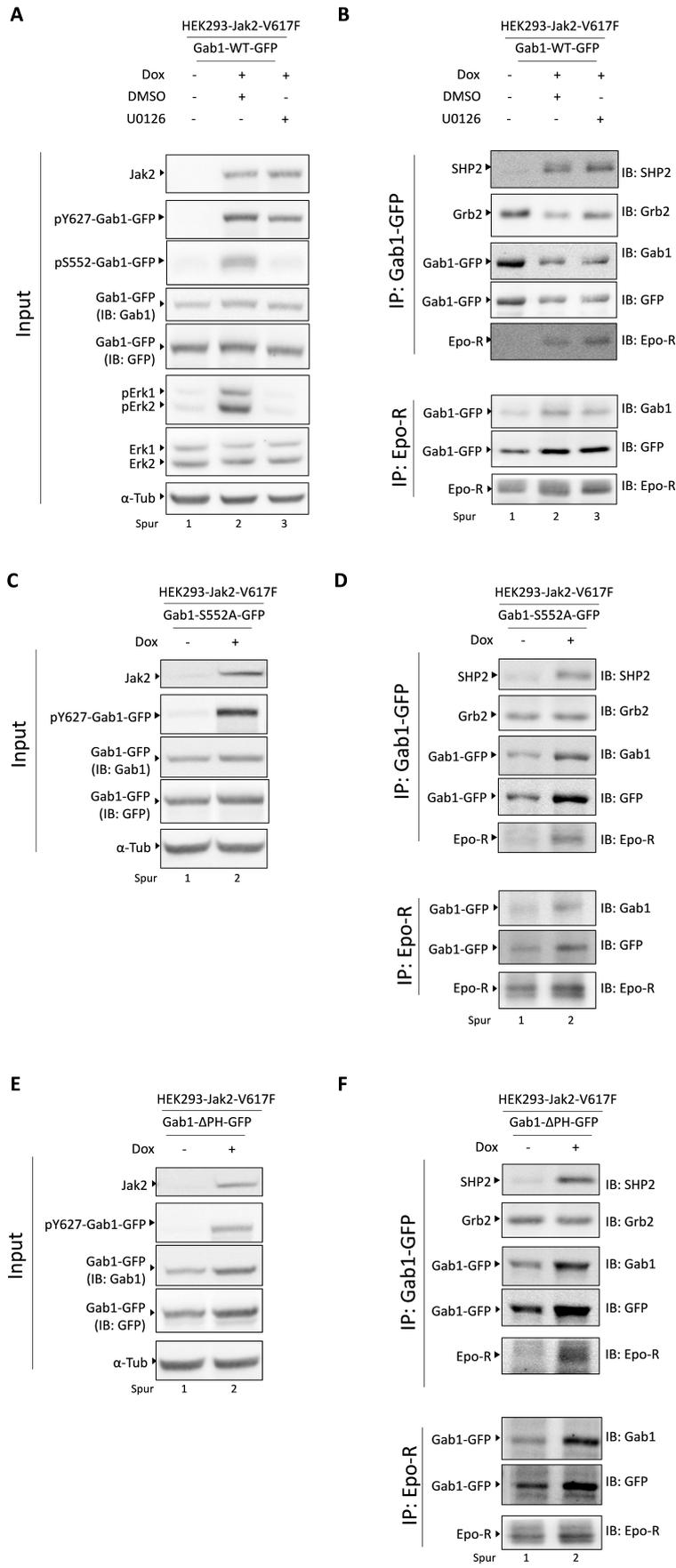


Abbildung 26: Die Jak2-V617F-induzierte Bindung von SHP2 an Gab1 und Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R sind unabhängig von der MAPK-Aktivität, der Phosphorylierung des Serins 552 und der PH-Domäne in Gab1. 840.000 HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für Gab1-WT-GFP (A, B), Gab1-S552A-GFP (C, D) oder mit Δ PH-GFP (E, F) transfiziert. Anschließend erfolgte die Induktion der Jak2-V617F Expression mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) für 24 h. 30 min vor der Zellyse wurden die Zellen mit DMSO oder 10 μ M U0126 behandelt (A, B). A, C, E) Die Analyse des Totallysats erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. A) Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, pY627-Gab1, pS552-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Gab1 und GFP. C, E) Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, pY627-Gab1 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Gab1 und GFP. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. B, D, F) Gab1-WT-GFP bzw. Epo-Rezeptor wurden zunächst mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Die Analyse der Präzipitate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Epo-R, Grb2 und Gab1. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen SHP2 und GFP. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ Experimenten.

4.7 Die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R

Die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R wird durch Expression von Jak2-V617F induziert (Abb. 25). Die Gab1:Epo-R Interaktion ist unabhängig von der PH-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran (Abb. 26) und von der MAPK-Aktivität (Abb. 25C,D). Doch wie die Interaktion von Gab1 und dem Epo-R vermittelt wird, ist nicht klar. Wird Gab1 durch Expression der Jak2-V617F an den Epo-R rekrutiert oder ist die Gab1:Epo-R-Interaktion abhängig von der konstitutiven Kinaseaktivität der Jak2-V617F? Um dies zu untersuchen, wurden Gab1-WT-GFP und Jak2-V617F exprimierende Zellen mit DMSO bzw. dem Jak-Inhibitor 1 behandelt. Sowohl in Jak2-V617F-positiven HEK293-Jak2-V617F- als auch in HEL Zellen inhibiert der Jak Inhibitor 1 die Kinaseaktivität der Jaks und somit die Phosphorylierung von Substraten der Jak2-V617F. Wie von Andraos et al. beschrieben, bewirkt der Jak-Inhibitor 1 keine Reduktion der Autophosphorylierung der Tyrosine 1007/8 in Jak2-V617F (Abb. 27A, Vgl. Spur 2 und 3 und Abb. 27C, Vgl. Spur 1 und 2) [149]. Die Behandlung Jak2-V617F exprimierender Zellen mit Jak Inhibitor 1 führt zur Reduktion der Jak2-V617F induzierten Phosphorylierung von Gab1 und Erk1/2 (Abb. 27A, Vgl. Spur 2 und 3 und Abb. 27C, Vgl. Spur 1 und 2). Die Interaktion von Gab1 und Grb2 ist unabhängig von der Kinaseaktivität von Jak2-V617F (Abb. 27B, D). Die Präzipitation von Gab1-WT-GFP aus dem Totallysat hat die Co-Präzipitation von SHP2 in Jak2-V617F exprimierenden Zellen zur Folge (Abb. 27B, Spur 2 und Abb. 27D, Spur 1). Nach Behandlung der Jak2-V617F exprimierenden Zellen mit dem Jak-Inhibitor 1 interagieren SHP2 und der Epo-R nicht mit Gab1 (Abb. 27B, Vgl. Spur 2 und 3 und Abb. 27D, Vgl. Spur 1 und 2).

Somit sind die Interaktionen von SHP2 und dem Epo-R mit Gab1 abhängig von der Kinaseaktivität der Jak2-V617F-Mutante.

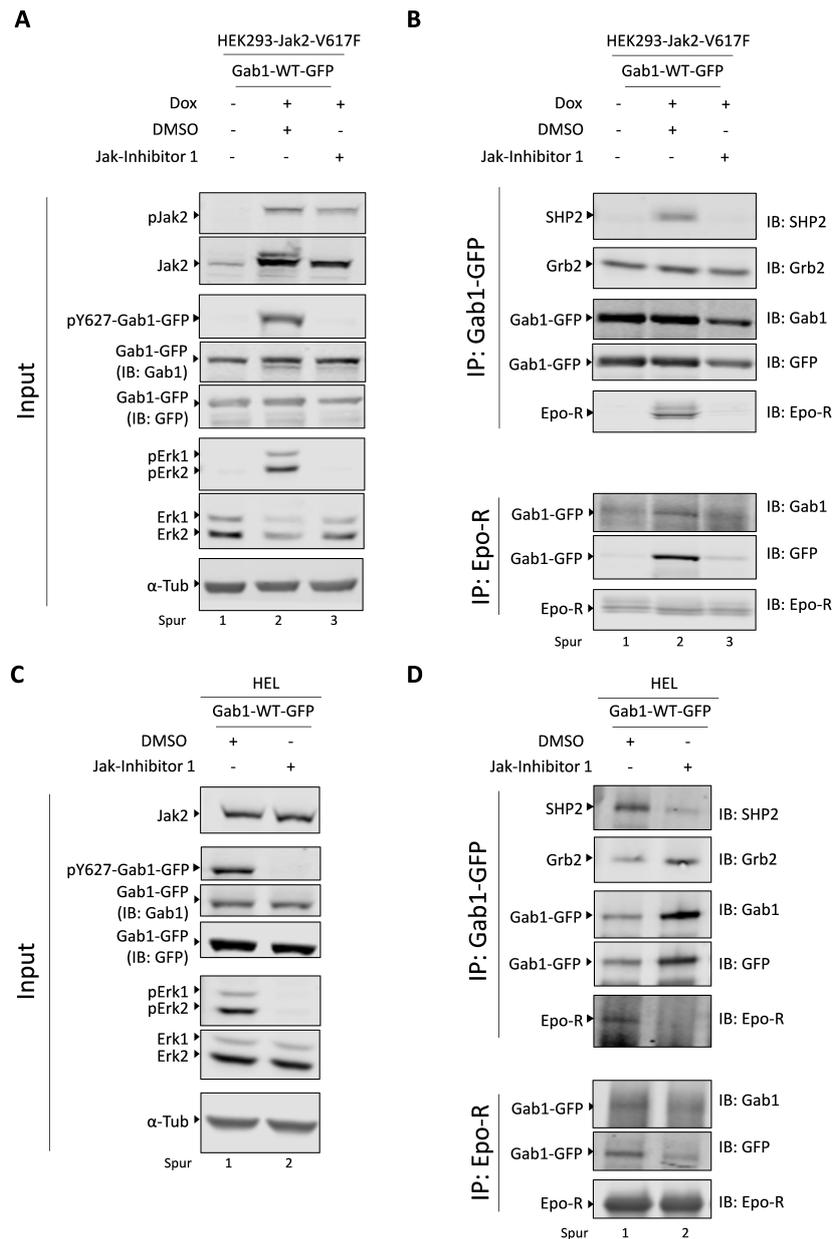


Abbildung 27: Die Interaktionen von Gab1 mit SHP2 und dem Epo-R sind abhängig von der Kinaseaktivität der konstitutiv aktiven Jak2-V617F. A, B) 840.000 HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für Gab1-WT-GFP transfiziert. Anschließend erfolgte die Induktion der Jak2-V617F Expression mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) für 24 h. 30 min vor der Zelllyse wurden die Zellen mit DMSO oder 1 μ M Jak-Inhibitor 1 behandelt. C, D) Mittels Elektroporation wurde in 1 Mio. HEL Zellen der Expressionsvektor für Gab1-WT-GFP transfiziert. 24 h nach der Elektroporation wurden die Zellen für 30 min mit DMSO oder 1 μ M Jak-Inhibitor 1 behandelt. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen. A, C) Die Analyse des Totallysats erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, pY627-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Gab1 und GFP. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. B, D) Gab1-WT-GFP bzw. Epo-Rezeptor wurden zunächst mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Die Analyse der Präzipitate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Epo-R, Grb2 und Gab1. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen SHP2 und GFP. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ Experimenten.

Die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R ist abhängig von der Jak2-V617F Tyrosinkinaseaktivität (Abb. 27). Der Epo-R wird durch Jak2-V617F an zytoplasmatischen Tyrosinen phosphoryliert [46, 58]. Gab1 besitzt keine SH2-Domänen, die diese phosphorylierten Tyrosine binden können. Es ist jedoch beschrieben, dass Grb2 als Adaptermolekül die Interaktion von Gab1 mit Zytokinrezeptoren, wie c-Met und dem EGF-R vermitteln kann [120, 122]. Grb2 besitzt sowohl SH2 als auch SH3 Domänen. Die Grb2 SH3 Domänen interagieren konstitutiv mit einer Prolin-reichen Region in Gab1 (Abb. 25-27) [104, 115]. Die SH2-Domäne in Grb2 bindet das phosphorylierte Tyrosin 464 im Epo-R [97]. Daher wäre eine Grb2 vermittelte Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R möglich. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde nachfolgend eine Gab1-Mutante, die nicht in der Lage ist mit Grb2 zu interagieren, in HEK293-Jak2-V617F Zellen exprimiert. Dazu ist in der Gab1- Δ Grb2-GFP Mutante die Prolin-reiche Region an den Aminosäurepositionen 341 bis 348 deletiert und das Leucin an Aminosäureposition 524 durch Prolin substituiert. Es gibt daher keine Interaktion der Gab1- Δ Grb2-GFP Mutante mit Grb2 (Abb. 28B).

Die Induktion der Jak2-V617F Expression resultiert in einer Phosphorylierung von Gab1- Δ Grb2-GFP am Tyrosin 627 (Abb. 28A, Vgl. Spur 1 und 2). Die Expression von Jak2-V617F induziert die Bindung von SHP2 an die Gab1- Δ Grb2-GFP-Mutante (Abb. 28B, Vgl. Spur 1 und 2). Die Präzipitation von Gab1- Δ Grb2-GFP führt zur Co-Präzipitation von Epo-R und die Präzipitation des Epo-R hat die Co-Präzipitation der Gab1- Δ Grb2-GFP-Mutante aus dem Lysat Jak2-V617F exprimierender Zellen zur Folge (Abb. 28B). Somit ist sowohl die Interaktion von Gab1 mit SHP2 als auch die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R unabhängig von einer Interaktion von Gab1 mit Grb2.

Ein weiterer möglicher Rekrutierungsmechanismus von Gab1 an den Epo-R könnte durch SHP2 vermittelt sein. SHP2 bindet mit Hilfe der SH2-Domänen sowohl an den Epo-R [86] als auch an Gab1 [132]. Barua et al. beschreiben, dass SHP2 mit seinen beiden SH2-Domänen zur selben Zeit an 2 Phospho-Tyrosylreste binden kann [150]. So könnte SHP2 gleichzeitig an phosphoryliertes Gab1 und an den phosphorylierten Epo-R binden und Gab1 somit an den Epo-R rekrutieren. Mit Hilfe einer Gab1- Δ SHP2-GFP Mutante, deren Tyrosine an den Aminosäurepositionen 627 und 659 durch Phenylalanine substituiert sind, wurde untersucht, ob Gab1 ohne die Bindung von SHP2 mit dem Epo-R interagieren kann. Nach Induktion der Jak2-V617F Expression in HEK293-Jak2-V617F Zellen ist keine Phosphorylierung des Tyrosins 627 in der Gab1- Δ SHP2-GFP Mutante detektierbar (Abb. 28C). So ist SHP2 bei der Präzipitation der Gab1- Δ SHP2-GFP Mutante nicht im Co-Präzipitat nachweisbar (Abb. 28D). Unabhängig von der Jak2-V617F Expression und der Rekrutierung von SHP2 an Gab1 interagiert Grb2 mit der Gab1- Δ SHP2-GFP Mutante (Abb. 28D). Dagegen kann bei der Präzipitation der Gab1- Δ SHP2-GFP Mutante eine Co-Präzipitation des Epo-R und bei der Epo-R-Präzipitation eine Co-Präzipitation der Gab1- Δ SHP2-GFP Mutante nachgewiesen werden (Abb. 28D). Die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R ist somit unabhängig von der Rekrutierung von SHP2 an Gab1.

Die Unabhängigkeit der Tyrosinphosphorylierung von der MAPK-induzierten Phosphorylierung des Serins 552 (Abb. 21 und 25) und von der PH-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran (Abb. 17) könnte durch eine Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R erklärt werden. Die Gab1:Epo-R-Interaktion ist weder von der Phosphorylierung des Serins 552, von der PH-Domäne in Gab1 noch von den Interaktion von Gab1 mit SHP2 und Grb2 abhängig. Durch die Bindung von Gab1 an den Epo-R wird Gab1 unabhängig von der PH-vermittelten Translokation an die Plasmamembran in die Nähe von aktiven Jak2-Tyrosinkinasen rekrutiert. Diese Kinasen wären dann in der Lage Gab1 unabhängig von der Translokation von Gab1 und der Interaktion von Gab1 mit PIP3 in der Plasmamembran zu phosphorylieren. Die am Epo-R stattfindende Ty-

rosinphosphorylierung von Gab1 würde dann die Bindung von SH2-Domänen Proteinen ermöglichen.

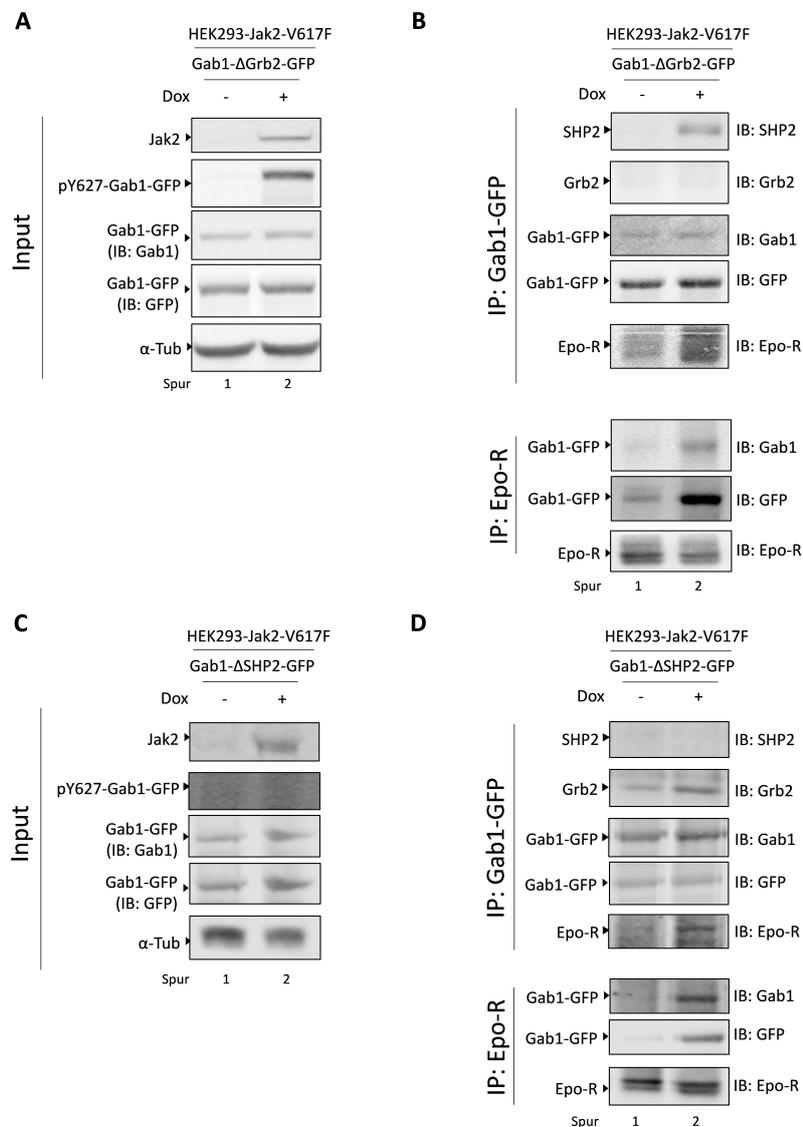


Abbildung 28: Die Jak2-V617F induzierte Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R ist unabhängig von der Bindung von Grb2 und SHP2 an Gab1. 840.000 HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für Gab1-ΔGrb2-GFP (A, B) oder für Gab1-ΔSHP2-GFP (C, D) transfiziert. Anschließend erfolgte die Induktion der Jak2-V617F Expression mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) für 24 h und die Lyse der Zellen. A, C) Die Analyse des Totallysats erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, pY627-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Gab1 und GFP. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. B, D) Gab1-ΔGrb2-GFP bzw. Epo-Rezeptor wurden zunächst mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Die Analyse der Präzipitate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Epo-R, Grb2 und Gab1. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen SHP2 und GFP. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ Experimenten.

4.8 Die Bedeutung der Interaktion von Gab1 mit SHP2 und Grb2 für die Epo-R vermittelte Signaltransduktion

In der Jak2-V617F induzierten Signaltransduktion ist die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 und somit die Bildung des Gab1:SHP2-Komplexes unabhängig von der Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran (Abb. 26). Weiterhin interagiert Grb2 konstitutiv mit Gab1 (Abb. 25). Sowohl SHP2 als auch Grb2 haben positiven Einfluss auf die Aktivierung der MAPK-Kaskade [123]. Bisher ist jedoch unbekannt welche Bedeutung die Bindung von SHP2 und Grb2 an Gab1 für die Jak2-V617F induzierte Aktivierung der MAPK-Kaskade hat. HEK293-Jak2-V617F wurden mit einem nicht-kodierenden Expressionsvektor (mock) oder mit Expressionsvektoren, die für Gab1-WT, Gab1- Δ Grb2 und Gab1- Δ SHP2 kodieren, transfiziert. In Abhängigkeit von der Expression von Gab1-WT und deren Mutanten wurde die Jak2-V617F-induzierte MAPK-Aktivierung mittels Western Blot Analyse untersucht. Das Expressionsniveau des Gab1-WT und deren Mutanten war in den transfizierten Zellen vergleichbar (Abb. 29). Die Überexpression des exogenen Gab1-WT bzw. deren Mutanten verhindert die gleichzeitige Detektion des endogenen Gab1 aus Lysaten der mit nicht-kodierendem Vektor (mock) transfizierten Zellen (Abb. 29 Vgl. Spur 1, 2 und 3-8).

Die Expression von Jak2-V617F induziert in Gab1-WT exprimierenden Zellen die Phosphorylierung von Erk1/2 und die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 (Abb. 29, Vgl. Spur 3 und 4). Die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1-WT ist bereits ohne Induktion der Jak2-V617F Expression detektierbar (Abb. 29, Spur 3). Die Induktion der Jak2-V617F Expression führt zu einer Verstärkung der Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1-WT (Abb. 29, Vgl. Spur 3 und 4).

Die Gab1- Δ Grb2 Mutante wird durch Expression von Jak2-V617F am Tyrosin 627 phosphoryliert und die Phosphorylierung des Serins 552 verstärkt (Abb. 29, Vgl. Spur 4 und 6). Dabei entspricht das Phosphorylierungsniveau der Gab1- Δ Grb2 Mutante dem des exogenen Gab1-WT (Abb. 29, Vgl. Spur 4 und 6). Durch Expression der Gab1- Δ Grb2 Mutante wird die Jak2-V617F induzierte Erk1/2-Phosphorylierung nicht beeinflusst (Abb. 29, Vgl. Spur 2, 4 und 6). Die Bindung von Grb2 an die prolin-reiche Region von Gab1 scheint weder Einfluss auf die Jak2-V617F-induzierte Aktivierung der MAPK-Kaskade noch auf die Phosphorylierung von Gab1 zu haben.

Durch die Substitution der Tyrosine 627 und 659 in der Gab1- Δ SHP2 Mutante durch Phenylalanin ist bei dieser Mutante keine Jak2-V617F-induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 627 detektierbar (Abb. 29, Vgl. Spur 4 und 8). Im Vergleich zum Gab1-WT- und zur Gab1- Δ Grb2-exprimierenden Zellen ist die Jak2-V617F-induzierte Erk1/2-Phosphorylierung in Gab1- Δ SHP2-exprimierenden Zellen reduziert (Abb. 29, Vgl. Spur 4, 6 und 8). Die Phosphorylierung der Gab1- Δ SHP2 Mutante am Serin 552 im Vergleich zum Gab1-WT ist sowohl basal als auch Jak2-V617F-induziert deutlich reduziert (Abb. 29, Vgl. Spur 3, 4 und 7, 8).

In Jak2-V617F exprimierenden Zellen ist die SH3-Domänen vermittelte Komplexbildung von Gab1 und Grb2 nicht relevant für die Vermittlung der Jak2-V617F-induzierten und pathologischen Aktivierung der MAPK-Kaskade. Durch fehlende Rekrutierung von SHP2 an Gab1 wird die Jak2-V617F induzierte Erk1/2-Phosphorylierung dagegen deutlich verringert. Somit ist die Interaktion von SHP2 mit Gab1 essentiell für die pathophysiologische Amplifikation der Jak2-V617F-induzierten MAPK-Aktivierung.

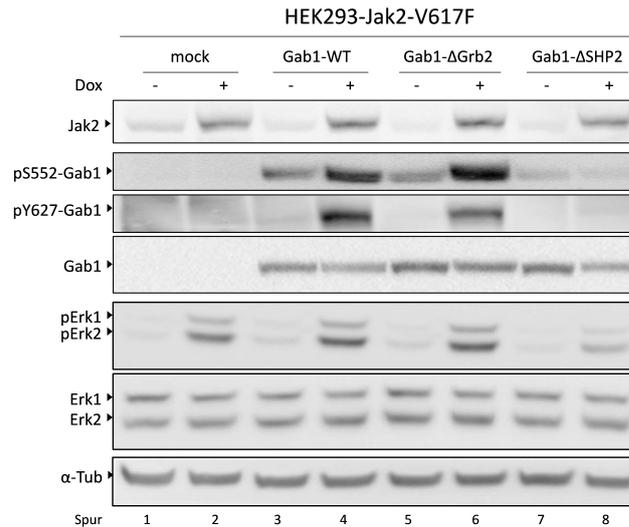


Abbildung 29: Die Bindung von SHP2 an Gab1 verstärkt die Jak2-V617F induzierte MAPK-Aktivierung. 840.000 HEK293-Jak2-V617F Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden mit einem nicht-kodierenden Expressionsvektor (mock) oder mit Expressionsvektoren, die für Gab1-WT, Gab1- Δ Grb2 und Gab1- Δ SHP2 kodieren, transfiziert. Anschließend erfolgte die Induktion der Jak2-V617F Expression mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) für 24 h und die Lyse der Zellen. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2, pY627-Gab1, pS552-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen Gab1. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$.

In Jak2-V617F exprimierenden Zellen verstärkt die Bindung von SHP2 an Gab1 die Aktivierung der MAPK-Kaskade. Hat die Interaktion von Gab1 und SHP2 nur in der pathophysiologischen Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion eine verstärkende Wirkung auf die MAPK-Aktivierung? Welchen Einfluss haben die Interaktionen von Grb2 und SHP2 mit Gab1 auf die Epo-induzierte Aktivierung der MAPK-Kaskade in Jak2-WT exprimierenden Zellen?

HEK293-Jak2-WT Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Gab1-WT und deren Mutanten transfiziert. Jak2-WT exprimierende Zellen wurden 15 min vor der Lyse mit Epo (1 U/ml) stimuliert.

Epo-induziert werden der Gab1-WT am Serin 552 und am Tyrosin 627 sowie Erk1/2 phosphoryliert (Abb. 30, Vgl. Spur 3 und 4).

Die Deletion der Grb2-Bindestelle in der Gab1- Δ Grb2 Mutante hat im Vergleich zu Gab1-WT exprimierenden Zellen weder Einfluss auf die Epo-induzierte Erk1/2-Phosphorylierung noch auf die Phosphorylierung von Gab1 am Serin 552 und am Tyrosin 627 (Abb. 30, Vgl. Spur 5 und 7).

In Gab1- Δ SHP2 exprimierenden Zellen ist die Epo-induzierte Erk1/2- und Gab1-S552-Phosphorylierung im Vergleich zu Gab1-WT exprimierenden Zellen reduziert (Abb. 30, Vgl. Spur 5 und 9).

Somit wirkt in der Epo-induzierten Signaltransduktion die Bindung von SHP2 an Gab1 verstärkend auf die Aktivierung der MAPK-Kaskade (Abb. 30).

Gab1 amplifiziert sowohl in der pathophysiologischen Jak2-V617F-induzierten als auch in der physiologischen Epo-abhängigen Signaltransduktion durch Rekrutierung von SHP2 die Aktivierung der MAPK-Kaskade.

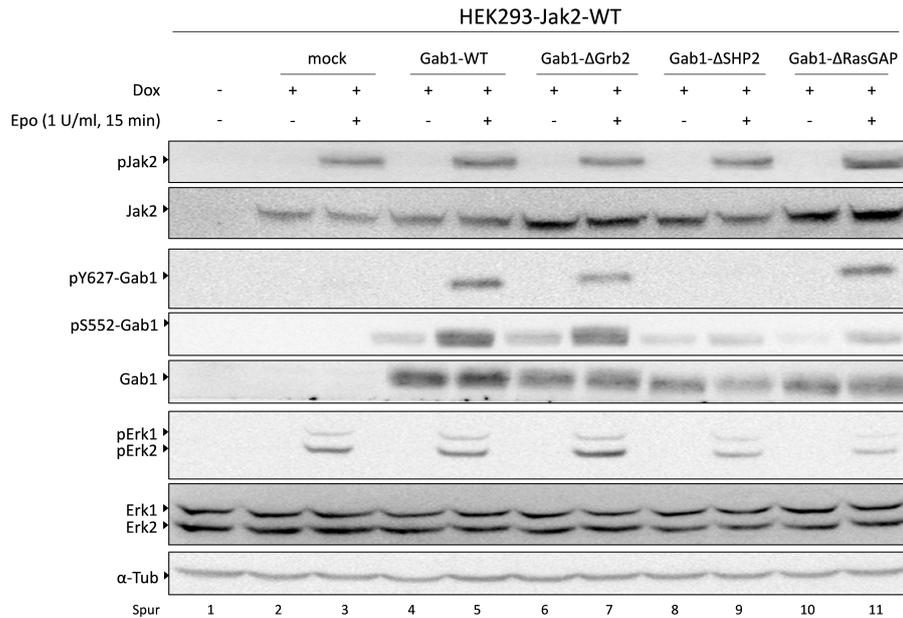


Abbildung 30: Die Bindung von SHP2 an Gab1 verstärkt die Aktivierung der MAPK-Kaskade in der Jak2-WT-vermittelten und Epo-induzierten Signaltransduktion. 700.000 HEK293-Jak2-WT Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden mit einem nicht-kodierenden Expressionsvektor (mock) oder mit Expressionsvektoren, die für Gab1-WT, Gab1-ΔGrb2 und Gab1-ΔSHP2 kodieren, transfiziert. Anschließend erfolgte die Induktion der Jak2-WT Expression mit 2,5 ng/ml Doxycyclin (Dox) für 24 h. Nach Stimulation der Zellen für 15 min mit 1 U/ml Epo wurden die Zellen lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen pJak2, pY627-Gab1, pS552-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α-Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Jak2 und Gab1. Die Färbung von α-Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n = 3.

In der Jak2-V617F- und Epo-induzierten Signaltransduktion ist die Phosphorylierung des Tyrosins 627 von Gab1 unabhängig von der MAPK-induzierten Phosphorylierung des Serins 552 und der darauffolgenden PH-Domänen-vermittelten Translokation an die Plasmamembran. Diese Unabhängigkeit könnte durch eine direkte Gab1:Epo-R-Interaktion ermöglicht werden. Die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R bedingt die Rekrutierung von Gab1 in die Nähe von aktiven Jak2. Dies würde die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 durch Jak2 ermöglichen. Die Tyrosinphosphorylierung von Gab1 könnte somit unabhängig von der MAPK-induzierten PH-Domänen-vermittelten Translokation an die Plasmamembran vermittelt werden. Doch wie ist die Tyrosinphosphorylierung des *multi-site docking* Proteins Gab1 in anderen Signaltransduktionsnetzwerken reguliert? Die Regulation der Translokation von Gab1 ist für die IL-6-induzierte Signaltransduktion bereits sehr gut beschrieben [101, 146]. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran in der IL-6-induzierten Signaltransduktion notwendig für die Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1 ist. Daher wurde untersucht, wie die Phosphorylierungen von Gab1 in der Interleukin-6-induzierten Signaltransduktion reguliert sind.

4.9 Die Regulation der Gab1-Phosphorylierung in der gp130-vermittelten Signaltransduktion

Wie die Phosphorylierung von Gab1 in der IL-6-induzierten Signaltransduktion reguliert ist, wurde unter der Betreuung von Johannes Fritsch untersucht [148]. Dabei verfolgte Johannes Fritsch die Fragestellung, ob die Phosphorylierung des Tyrosins 627 von der Phosphorylierung des Serins 552 und der dadurch induzierten PH-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran abhängig ist.

HEK293-gp80 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Gab1-WT-GFP und dem chimären Rezeptor Epo-R/gp130 transfiziert. Da HEK293-gp80 Zellen keinen Epo-R exprimieren, ermöglicht die Expression des Fusionsproteins aus dem extrazellulären Abschnitt des Epo-R und dem zytoplasmatischen Abschnitt des gp130 die selektive Stimulation transfizierter und somit Gab1-WT-GFP exprimierender Zellen mit Epo. Jedoch induziert die Bindung des Liganden Epo an den chimären Epo-R/gp130 Rezeptor die gp130-vermittelte Signaltransduktion. Die durch Epo-Bindung an den chimären Epo-R/gp130 Rezeptor induzierte gp130-vermittelte Signaltransduktion ahmt somit die IL-6-induzierte Signaltransduktion nach.

Um die Bedeutung der MAPK-Aktivität für die Phosphorylierung des Serins 552 und Tyrosins 627 in Gab1 zu zeigen, wurden die transfizierten Zellen 30 min vor Stimulation mit dem Mek-Inhibitor U0126 behandelt. Danach erfolgte die Stimulation der transfizierten Zellen mit Epo (7 U/ml, 10 min).

Die Stimulation der Zellen hat die Induktion der Erk1/2-Phosphorylierung zur Folge (Vgl. Abb. 31A, Spur 1 und 2). Die Erk2-Phosphorylierung ist nach Einsatz von 0,5 μ M unter einem im Western-Blot detektierbaren Niveau (Abb. 31A, Spur 3). Dagegen ist die Phosphorylierung von STAT3 unabhängig von der U0126-Konzentration (Abb. 31A, Spur 2-8) und weist die vergleichbare Stimulation der Zellen nach. Die Epo-induzierte Aktivierung der gp130-vermittelten Signaltransduktion hat zur Folge, dass Gab1 am S552 und am Tyrosin 627 phosphoryliert wird (Abb. 31A, Vgl. Spur 1 und 2). Die Phosphorylierung des Serins 552 und des Tyrosins 627 in Gab1 nimmt mit steigender U0126-Konzentration ab (Abb. 31A).

In einem weiteren Ansatz wurde der chimäre Epo-R/gp130 Rezeptor, der im zytoplasmatischen Abschnitt des gp130 eine Substitution an der Aminosäureposition 759 von Tyrosin zu Phenylalanin (Epo-R/gp130-Y759F) aufweist, verwendet [72]. Es wurde gezeigt, dass die Bindung von SHP2 an das phosphorylierte Tyrosin 759 in gp130 wichtig ist für die Vermittlung der IL-6-induzierten MAPK-Aktivierung [151]. Durch den Aus-

tausch des Tyrosins 759 zu Phenylalanin wird die liganden-induzierte Rekrutierung von SHP2 an gp130 verhindert und die MAPK-Kaskade nicht aktiviert [118].

Die Zellen wurden mit der entsprechenden Rezeptor-Chimäre und Gab1-WT-GFP transfiziert. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit Epo. Die Lysate der Zellen wurden mittels Western-Blot analysiert.

Sowohl in Epo-R/gp130-WT als auch in Epo-R/gp130-Y759F exprimierenden Zellen wird STAT3 liganden-induziert phosphoryliert (Abb. 31B). Die Expression des chimären Epo-R/gp130-Y759F Rezeptors verhindert die liganden-induzierte Phosphorylierung von SHP2 und Erk1/2 (Abb. 31B, Vgl. Spur 2 und 4). Wie auch in U0126-behandelten Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 31A), wirkt sich die fehlende Aktivierung der MAPK-Kaskade negativ auf die Phosphorylierung des Serins 552 und des Tyrosins 627 in Gab1 aus (Abb. 31B, Vgl. Spur 2 und 4).

Die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 ist in der gp130-vermittelten Signaltransduktion somit abhängig von der MAPK-Aktivität. Die IL-6-induzierte Aktivierung von Erk2 führt zur Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1. Die MAPK-abhängige Phosphorylierung des Serins 552 hebt die inhibitorische intramolekulare Interaktion der PH-Domäne mit den C-terminalen Argininen 556 und 560 auf. Es kommt zur Exponierung der PH-Domäne (Abb. 12). Die PH-Domäne von Gab1 kann in dieser Konformation mit PIP3 in der Plasmamembran interagieren und es kommt zur liganden-induzierte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran [101]. Im Gegensatz zur Epo-R vermittelten Signaltransduktion sind in der gp130-vermittelten Signaltransduktion die Phosphorylierung des Serins 552 und die damit induzierte Translokation an die Plasmamembran essentiell für die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1.

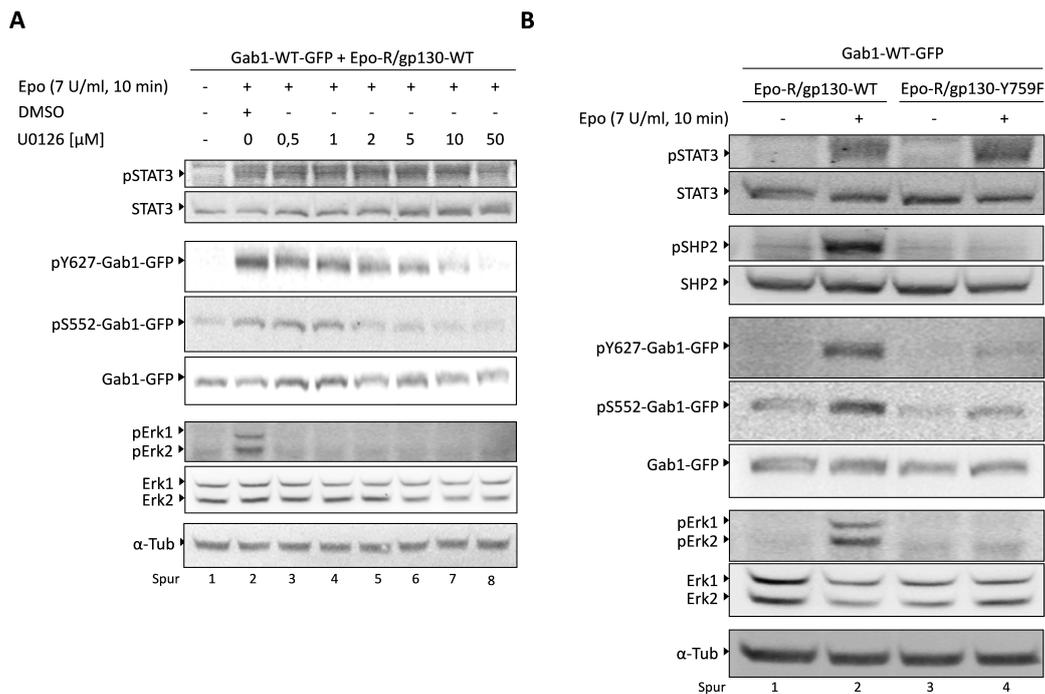


Abbildung 31: In der gp130-vermittelten Signaltransduktion ist die MAPK-Aktivität notwendig für die Phosphorylierung von Gab1 am Serin 552 und am Tyrosin 627. A, B) 1 Million HEK293-gp80 Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. A) Die Zellen wurden mit Expressionsvektoren für den chimären Epo-R/gp130-Rezeptor und Gab1-WT-GFP transfiziert. Nach serumfreier Inkubation für 3,5 h wurden die Zellen entweder mit DMSO oder mit U0126 für 30 min inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 7 U/ml Epo für 10 min stimuliert und anschließend lysiert. B) Die Zellen wurden mit Expressionsvektoren die für den chimären Epo-R/gp130-Rezeptor (Epo-R/gp130-WT) oder den chimären Epo-R/gp130-Y759F-Rezeptor (Epo-R/gp130-Y759F) und Gab1-WT-GFP transfiziert. Nach serumfreier Inkubation für 4 h wurden die Zellen mit 7 U/ml Epo für 10 min stimuliert und anschließend lysiert. A, B) Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen pSTAT3, pSHP2, pY627-Gab1, pS552-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α -Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3, SHP2 und Gab1. Die Färbung von α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus $n = 3$. Aus [148].

4.10 Die Bedeutung von Gab1 in der gp130-vermittelten Signaltransduktion

Die Phosphorylierung von Gab1 am Serin 552 und die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran sind MAPK-abhängig (Abb. 21 und 31) [101]. Johannes Fritsch konnte zeigen, dass die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 von der Phosphorylierung des Serins 552 abhängt [148]. Dies stützt die Hypothese, dass die IL-6-induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 627 und somit auch die Bindung von SHP2 an Gab1 in der gp130-vermittelten Signaltransduktion abhängig sind von der PH-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran. Es ist bekannt, dass die zytokin-induzierte Interaktion von Gab1 mit SHP2 einen verstärkenden Effekt auf die MAPK-Aktivierung hat [133, 135]. Die initiale IL-6-induzierte MAPK-Aktivierung wird durch die Rekrutierung von SHP2 an das phosphorylierte Tyrosin 759 in gp130 induziert [118]. Es ist jedoch schwierig die initiale MAPK-Aktivierung von der Gab1-abhängigen Amplifikation der MAPK-Kaskade zu unterscheiden.

Mit Hilfe des Vergleichs der gp130-vermittelten Signaltransduktion von Gab1 exprimierenden mit Gab1-defizienten Zellen kann der Einfluss von Gab1 auf die IL-6-induzierte

MAPK-Aktivierung untersucht werden. Dazu wurden nachfolgend MEF-WT Zellen und Gab1-defiziente MEF Zellen (MEF-Gab1^{-/-}) verwendet. Diese Zellen exprimieren gp130, jedoch kein gp80. Die Induktion der gp130-vermittelten IL-6-Signaltransduktion in diesen Zellen ist jedoch durch Stimulation mit dem Fusionsprotein Hyper-IL-6 möglich. Hyper-IL-6 ist ein Fusionsprotein aus löslichem gp80 und IL-6, welches an gp130 bindet und somit die IL-6-Signaltransduktion aktiviert [152].

Die MEF Zellen wurden mit Hyper-IL-6 (100 ng/ml) über die in Abb. 32A angegebenen Zeiträume stimuliert. In Abb. 32A ist die Expression von Gab1 in MEF-WT Zellen (Abb. 32A, Spur 1-6) und die Defizienz der Expression von Gab1 in MEF-Gab1^{-/-} Zellen (Abb. 32A, Spur 7-12) gezeigt.

Die Hyper-IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung hat über den beobachteten Zeitraum in MEF-WT und MEF-Gab1^{-/-} Zellen einen ähnlichen Verlauf mit vergleichbaren Phosphorylierungsniveaus von STAT3 (Abb. 32A,B).

In MEF-WT Zellen wird das Maximum der Hyper-IL-6-induzierten Erk1/2-Phosphorylierung nach 15 min erreicht (Abb. 32A). In MEF-Gab1^{-/-}-Zellen ist das Maximum der Erk1/2-Phosphorylierung deutlich niedriger als in MEF-WT Zellen und steigt nach 10 min Stimulation nicht weiter an (Abb. 32A). Nach Erreichen der jeweiligen maximalen Erk2-Phosphorylierung nimmt in MEF-WT und MEF-Gab1^{-/-}-Zellen die Erk2-Phosphorylierung kontinuierlich ab und erreicht nach 60 min annähernd basales Niveau. Eine zeitlich genauere Analyse der Gab1-abhängigen Phosphorylierung von Erk1/2 in Abb. 32B zeigt, dass im Vergleich zu MEF-WT Zellen die Erk1/2-Phosphorylierung in Gab1-defizienten MEF Zellen zwischen 10 und 30 min nach Stimulation deutlich reduziert ist (Abb. 32B). Bis zu 10 min nach Stimulation zeigt die Erk1/2-Phosphorylierung in beiden Zelltypen ein vergleichbaren Verlauf mit ähnlichem Phosphorylierungsniveau (Abb. 32A,B). Somit wird deutlich, dass die durch gp130 vermittelte initiale Aktivierung der MAPK-Kaskade ca. 10 min andauert. In diesem murinen Zellsystem wirkt Gab1 vor allem 10 bis 30 Minuten nach initialer Aktivierung von gp130 amplifizierend auf die MAPK-Kaskade.

Mittels Crispr/Cas vermittelter Genomeditoring wurde die Expression von Gab1 in dem humanen Flp-InTM T-RexTM 293 Zellsystem (Thermo Fisher Scientific, USA) ausgeschaltet (Hek293-TREx FlpIn-Gab1 KO) (Abb. 32 C, Vgl. Spuren 1-4 mit 5-8). Diese Hek293-TREx FlpIn-Gab1 KO Zellen wurden über die Flp Rekombinase Zielsequenz (*FRT site*) mit Gab1-WT, welches einen N-terminalen Flag-Tag besitzt, rekonstituiert (Hek293-TREx FlpIn-Gab1 KO + Gab1-WT). Die gerichtete Integration von Gab1-WT in die stabil integrierte *FRT site* in den Hek293-TREx FlpIn-Gab1 KO Zellen ermöglicht die tetracyclin-induzierte Expression von Gab1 aus einem einzelnen und definierten genomischen Locus. Die Behandlung der Hek293-TREx FlpIn-Gab1 KO + Gab1-WT Zellen mit dem tetracyclin-Derivat Doxycyclin induziert die Expression von Gab1 (Abb. 32 C, Vgl. Spur 9, 10 mit 11 und 12). Die Stimulation von Hek293-TREx FlpIn, Hek293-TREx FlpIn-Gab1 KO und Hek293-TREx FlpIn-Gab1 KO + Gab1-WT Zellen mit 100 ng/ml Hyper-IL-6 induziert in allen Zelltypen eine vergleichbare Phosphorylierung von STAT3 (Abb. 32 C). Gab1 wird Hyper-IL-6-induziert am Tyrosin 627 phosphoryliert (Abb. 32 C, Spur 2, 4 und 12). Die Hyper-IL-6-induzierte Erk1/2 Phosphorylierung ist nach 15 min Stimulation in Gab1 KO Zellen im Vergleich zu Gab1 exprimierenden Zellen deutlich reduziert (Abb. 32 C, Vgl. Spur 2, 4, 12 mit 6, 8 und 10). Die Doxycyclin-induzierte Überexpression von Gab1 in Hek293-TREx FlpIn-Gab1 KO + Gab1-WT Zellen führt zu einer erhöhten Hyper-IL-6-induzierten Phosphorylierung von Erk1/2 (Abb. 32 C, Vgl. Spur 4 und 12). Somit ist Gab1 sowohl in murinen MEF Zellen als auch in humanen Hek293 Zellen wichtig für die Amplifikation der Hyper-IL-6-induzierten Aktivierung der MAPK-Kaskade.

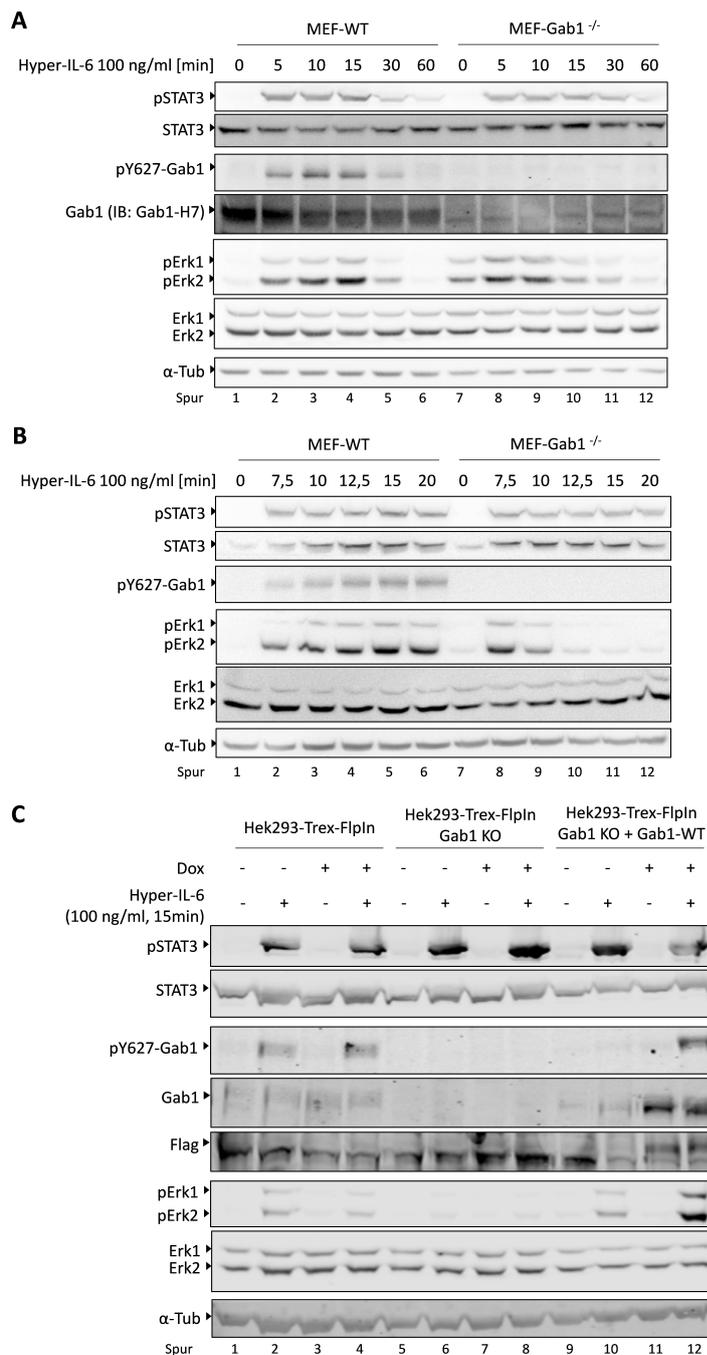


Abbildung 32: In Gab1-defizienten Zellen ist die Hyper-IL-6-induzierte MAPK-Aktivierung reduziert. A, B) 1 Million MEF-WT und MEF-Gab1^{-/-} Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Nach serumfreier Inkubation für 2 h wurden die Zellen mit 100 ng/ml Hyper-IL-6 zu den angegebenen Zeiten stimuliert und anschließend lysiert. C) Je 840.000 Hek293-Trex FlpIn, Hek293-Trex FlpIn-Gab1 KO und Hek293-Trex FlpIn-Gab1 KO + Gab1-WT Zellen wurden auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden wie angegeben für 24 h mit Doxycyclin behandelt. Nach serumfreier Inkubation für 4 h wurden die Zellen mit 100 ng/ml Hyper-IL-6 für 15 min stimuliert und anschließend lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen pSTAT3, pY627-Gab1, pErk1/2, Erk1/2 und α-Tubulin. Nach dem Strippen erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3, Gab1 und Flag-Tag. Die Färbung von α-Tubulin dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment aus n = 3.

4.11 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Jak2-WT exprimierenden Zellen werden die Jak/STAT- und die MAPK-Kaskade nur Epo-induziert aktiviert (Abb. 15). Die konstitutiv aktive Jak2-V617F Mutante aktiviert die Jak/STAT- und die MAPK-Kaskade dagegen zytokin-unabhängig (Abb. 13 und 14). Das *multi-site docking* Protein Gab1 ist bedeutend für die pathophysiologische Aktivierung der MAPK-Kaskade und die Proliferation Jak2-V617F-positiver Zellen (Abb. 13).

In Folge der Epo- und der Jak2-V617F-induzierten MAPK-Aktivierung wird Gab1 am Serin 552 phosphoryliert (Abb. 21 und 22). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 die intramolekulare Interaktion der PH-Domäne mit dem C-terminalen Argininen 556 und 560 in Gab1 inhibiert (Abb. 12). So ist die Epo- und Jak2-V617F-induzierte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran abhängig von den C-terminal lokalisierten Argininen 556 und 560 und vom Phosphorylierungsstatus des Serins 552 in Gab1 (Abb. 16-19). Die Phosphorylierung von Gab1 am Tyrosin 627 wird ebenfalls durch Jak2-V617F-Expression und Epo induziert (Abb. 15).

Entgegen der Hypothese, dass die Phosphorylierung des Serins 552 neben der Translokation auch für die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 notwendig ist, wird sowohl in der Jak2-V617F- als auch in der Epo-induzierten Signaltransduktion Gab1 unabhängig von der Phosphorylierung des Serins 552 und der PH-Domänen-vermittelten Translokation an die Plasmamembran am Tyrosin 627 phosphoryliert (Abb. 17 und 19). Auch die Bindung von SHP2 an das phosphorylierte Tyrosin 627 in Gab1 ist unabhängig von der Interaktion von Gab1 mit PIP3 in der Plasmamembran.

Eine Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R könnte ein alternativer Mechanismus für die Rekrutierung von Gab1 in die Nähe rezeptor-assoziiierter Tyrosinkinase und somit für die Phosphorylierung der Gab1-Tyrosine sein (Abb. 25). Abhängig von der Kinaseaktivität der Jak2-V617F-Mutante interagiert Gab1 mit dem Epo-R (Abb. 27). Die Gab1:Epo-R Interaktion ist unabhängig von der Phosphorylierung des Serins 552 und der PH-Domäne von Gab1 (Abb. 26) und wird nicht durch Grb2 oder SHP2 vermittelt (Abb. 28).

Die konstitutive Phosphorylierung des Tyrosins 627 von Gab1 in Jak2-V617F-exprimierenden Zellen führt zur konstitutiven Interaktion von Gab1 mit SHP2 (Abb. 25). Wie die Phosphorylierung des Tyrosins 627, ist auch die Bildung des Gab1:SHP2-Komplexes in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion unabhängig von der PH-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran (Abb. 25 und 26). Die Interaktion von Gab1 mit SHP2 ist für die Amplifikation der Epo- und Jak2-V617F-induzierten MAPK-Kaskade essentiell (Abb. 29 und Abb. 30).

Die Gab1-abhängige Amplifikation der MAPK-Kaskade konnte auch für die IL-6-induzierte Signaltransduktion gezeigt werden. So ist in humanen und murinen Gab1-defizienten Zellen die IL-6-abhängige Aktivierung der MAPK-Kaskade deutlich geringer als in Gab1 exprimierenden Zellen (Abb. 32).

Im Gegensatz zur Jak2-V617F- und Epo-induzierten Signaltransduktion ist in der IL-6-induzierten Signaltransduktion die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 abhängig von der MAPK-induzierten Phosphorylierung des Serins 552 (Abb. 31). Somit ist die durch die Phosphorylierung des Serins 552 induzierte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran in der IL-6-induzierten Signaltransduktion für die Vermittlung der Tyrosinphosphorylierung von Gab1 essentiell zu sein.

Die Regulation der PH-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran über den durch Phosphorylierung von Serin 552 induzierten Klappmechanismus ist sowohl in der pathophysiologischen Jak2-V617F-induzierten als auch in der physiologischen Epo- und IL-6-induzierten Signaltransduktion konserviert. Jedoch hat die PH-Domänen-vermittelte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran in diesen Signaltransduktionsnetzwerken unterschiedliche Bedeutung für die Regulation der Phosphorylierung der Tyrosine in Gab1. Die Phosphorylierung dieser Tyrosine im *multi-site docking* Prote-

in Gab1 ist entscheidend für die Interaktion von Gab1 mit SH2-Domänen-Proteinen, wie SHP2. Die Gab1:SHP2 Interaktion wirkt amplifizierend auf die proliferativ wirkende MAPK-Kaskade und kann bei Dysregulation eine pathophysiologische Signaltransduktion bewirken. Daher ist das Verständnis der Regulation der Tyrosinphosphorylierung und der Bindung von Interaktionspartnern an Gab1 in der physiologischen und pathophysiologischen Signaltransduktion hilfreich, um potentielle therapeutische Ziele, u.a. zur Behandlung von myeloproliferativen Neoplasien, identifizieren zu können.

5 Diskussion

Das *multi-site docking* Protein Gab1 interagiert mit Proteinen und Proteinkomplexen, wie SHP2, dem Grb2:SOS-Komplex und der PI3K [100]. Der Grb2:SOS-Komplex und die PI3-Kinase wirken auf Proteine, wie Ras, oder Moleküle, wie PIP2, die an oder in der Plasmamembran lokalisiert sind. Die liganden-induzierte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran und die damit verbundene Rekrutierung von SOS und PI3K an die Plasmamembran sind daher für die MAPK- und PI3K-Kaskade von entscheidender Bedeutung [104, 114]. Eine dysregulierte Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran kann deshalb dysregulierend auf die Gab1-abhängigen Signalwege wirken. So wird in Zellen, die die konstitutiv aktive Jak2-Mutante Jak2-V617F exprimieren, eine zytokin-unabhängige konstitutive Gab1-Phosphorylierung und Translokation von Gab1 an die Plasmamembran und eine konstitutive Aktivierung der MAPK- und PI3K-Kaskade beobachtet [103]. Ob die konstitutive Translokation von Gab1 an die Plasmamembran mit der konstitutiven Aktivierung der MAPK- und der PI3K-Kaskade und mit der pathophysiologischen Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen in Jak2-V617F-positiven Patienten zusammenhängt, ist bisher unbekannt. Das Verständnis der Regulation der Translokation von Gab1 an die Plasmamembran könnte daher potentielle therapeutische Ansätze für Jak2-V617F-assoziierte myeloproliferative Neoplasien liefern.

5.1 Jak2-V617F induziert die konstitutive Aktivierung der Jak/STAT- und MAPK-Kaskade und die konstitutive Phosphorylierung von Gab1

Die Januskinase 2 und deren konstitutiv aktive und MPN-assoziierte Mutante Jak2-V617F interagieren über deren FERM-Domäne u.a. mit den intrazellulären Box-Motiven im Epo-R [49]. Nach Epo-abhängiger Aktivierung des Epo-R kommt es zur Aktivierung von Jak2 und somit zur Phosphorylierung des Epo-R [16, 34]. Dagegen führt die Expression von Jak2-V617F bereits zytokin-unabhängig zur konstitutiven Phosphorylierung des Epo-R [153]. Die phosphorylierten Tyrosine 343 und 401 im zytoplasmatischen Teil des Epo-R dienen als Bindestellen für STAT5 (Abb. 5). Die Jak2-V617F-induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 343 des Epo-R ist essentiell für die maligne Proliferation Jak2-V617F-positiver Zellen [154]. Die konstitutive Aktivierung und Phosphorylierung des Epo-R in Jak2-V617F exprimierenden Zellen hat die Rekrutierung von STAT5 an den Epo-R [155] und somit die konstitutive Phosphorylierung von STAT5 zur Folge (Abb. 13 und 14). Dies führt weiterhin zur konstitutiven Expression von CIS [79]. Die Jak2-V617F-induzierte Expression von CIS reduziert die Hyperphosphorylierung von STAT5 und Erk in Jak2-V617F exprimierenden Zellen durch die Bindung von CIS an das phosphorylierte Tyrosin 401 im Epo-R. Das phosphorylierte Tyrosin 401 im Epo-R dient sowohl für STAT5 als auch für SHP2 als Bindestelle (Abb. 1). Durch Bindung von CIS an das Phospho-Tyrosin 401 können weder STAT5 noch SHP2 an den Epo-R rekrutiert werden, wodurch die STAT5- und SHP2-Phosphorylierung durch die am Epo-R assoziierte Jak2-V617F-Mutante verhindert wird. CIS wirkt somit als Suppressor der Jak2-V617F-induzierten malignen Zellproliferation [79]. Jedoch ist der genaue molekulare Mechanismus zur Ausbildung Jak2-V617F-induzierter myeloproliferativer Neoplasien durch die konstitutive STAT5 Aktivierung in Jak2-V617F-positiven Zellen bisher nur wenig verstanden. Es ist bekannt, dass die Deletion von STAT5 in einem Jak2-V617F-positiven Mausmodell die Jak2-V617F-induzierte Entwicklung von Polycythemia vera verhindert [156, 157]. So kommt es in diesem Modellsystem durch STAT5-Deletion zur Normalisierung der Erythrozytenzahl im Blut und zur Verkleinerung der Milz [157]. Die konstitutive Aktivierung von STAT5 in Jak2-V617F-positiven Zellen führt zu einer erhöhten Erythrozytenzahl oder einer Splenomegalie in Jak2-V617F-positiven Patienten und trägt somit maßgeblich zur Entstehung myeloproliferativer Neoplasien bei.

Neben der konstitutiven Aktivierung der Jak/STAT-Kaskade wird auch die Aktivierung der MAPK-Kaskade und die daraus resultierende Phosphorylierung von Erk1/2 durch Jak2-V617F induziert (Abb. 13, 14 und 15). Die SH2-Domänen Proteine SHP2 und Grb2 können an phosphorylierte Tyrosine im Epo-R binden [3]. Die SHP2-vermittelte und die direkte Rekrutierung des Grb2:SOS-Komplexes an den Epo-R bewirkt die Rekrutierung von SOS an die Plasmamembran in die Nähe von Ras. Der GEF SOS bewirkt den Austausch von GDP zu GTP in Ras. Die GTP-gebundene Form von Ras kann dann die Aktivierung der MAPK-Kaskade induzieren (siehe 1.6). Die Aktivierung von Erk1/2 hat die Phosphorylierung von Erk-abhängigen Transkriptionsfaktoren zur Folge. Die Expression von Jak2-V617F induziert MAPK-abhängige Zielgene, wie *MMP-10* und *Serpin B2* [103]. Die pathophysiologische Expression dieser Zielgene wirkt pro-proliferativ und kann die Progression myeloproliferative Neoplasien und solider Tumore fördern [158, 159, 102]. Jak2-V617F-positive HEL Zellen, die kein Gab1 exprimieren, zeigen eine deutlich reduzierte Jak2-V617F-induzierte Aktivierung der MAPK-Kaskade (Abb. 13). Desweiteren führt die Defizienz der Gab1-Expression in HEL Zellen im Vergleich zu Gab1 exprimierenden HEL Zellen zu einer reduzierten Proliferation (Abb. 13C). Somit wird deutlich, dass die MAPK-abhängige und pathophysiologische Proliferation Jak2-V617F-positiver hämatopoetischer Zellen durch Gab1 amplifiziert wird [133].

Das *multi-site docking* Protein Gab1 wird Jak2-V617F-abhängig am Tyrosin 627 phosphoryliert (Abb. 14) [103]. Neben der Phosphorylierung von Gab1 in der pathophysiologischen Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion wird Gab1 auch in der Epo-induzierten und Jak2-WT vermittelten Signaltransduktion am Tyrosin 627 phosphoryliert (Abb. 14). In hämatopoetischen HDC57, F-36P und UT-7 Zellen wird Gab1 Epo-induziert ebenfalls am Tyrosin 627 phosphoryliert [117, 134, 160].

Mit Hilfe eines Antikörpers, der das Epitop LQAPVR-[pS552]-PITRSF in Gab1 bindet, war es nun erstmals möglich neben der Jak2-V617F- und Epo-induzierten Phosphorylierung des Tyrosins 627 auch die Jak2-V617F- und Epo-induzierte Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 nachzuweisen (Abb. 15). Nach Mek1/2-abhängiger Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Erk2 wird Gab1 an mehreren Serin- und Threoninseitenketten durch Erk2 phosphoryliert [124, 125]. Da die Inhibition von Mek1/2 eine Reduktion der Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 bewirkt (Abb. 21 und 22), könnte das Serin 552 in Gab1 ein Substrat von aktivierter Erk2 sein.

Welche Rolle spielt die Jak2-V617F- und Epo-induzierte Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1?

5.2 Epo- und Jak2-V617F-induzierte Membrantranslokation von Gab1

Die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran ist von der Interaktion der Gab1-PH-Domäne mit PIP3 in der Plasmamembran abhängig [101]. Die Deletion der N-terminalen PH-Domäne von Gab1 hat zur Folge, dass Gab1 weder Jak2-V617F- noch Epo-induziert an die Plasmamembran rekrutiert wird (Abb. 16 und 18) [103]. In den verwendeten HEK293-Jak2-WT und -Jak2-V617F Zellen ist die PI3K konstitutiv aktiv [103]. Daher ist eine hohe PIP3-Konzentration in der Plasmamembran in diesen Zellen zu erwarten. Jedoch ist der Gab1-WT nur Jak2-V617F- bzw. Epo-induziert an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 16 und 18). Wie wird die Membrantranslokation von Gab1 reguliert?

Bisher besteht die Hypothese, dass eine inhibitorische Interaktion der PH-Domäne mit dem C-terminalen Abschnitt von Gab1 die Translokation an die Plasmamembran verhindert. Erst die MAPK-abhängige Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 hebt die inhibitorische intramolekulare Interaktion der geordneten N-terminalen PH-Domäne mit Aminosäuren im ungeordneten C-terminalen Abschnitt von Gab1 auf [101]. Diese Konformationsänderung von Gab1 würde es der PH-Domäne ermöglichen mit PIP3 zu interagieren [101] (Abb. 33).

Mit Hilfe eines in-vitro Peptid-Arrays wurden Peptidbereiche im C-terminalen Abschnitt von Gab1 identifiziert, die in der Lage sind mit der geordneten PH-Domäne intramolekular zu interagieren. Die Interaktion des C-terminalen Abschnittes mit der PH-Domäne von Gab1 ist maßgeblich vom Vorhandensein der Arginine 556 und 560 im C-terminalen Abschnitt von Gab1 abhängig [146].

Die Abhängigkeit der intramolekularen Interaktion der PH-Domäne vom Vorhandensein der Arginine 556 und 560 in Gab1 konnte nun in-vivo mit Hilfe der MAPPIT-Interaktionsanalyse nachgewiesen und bestätigt werden (Abb. 12). Die Substitution der Arginine 556 und 560 durch Alanine verhindert die intramolekulare Interaktion der PH-Domäne mit dem C-terminalen Abschnitt in Gab1, wodurch die PH-Domäne exponiert ist (Abb. 33). Die Membrantranslokation der Gab1-R556/560A Mutante an die Plasmamembran ist völlig unabhängig von der Jak2-V617F Expression oder einer Stimulation mit Epo. Die konstitutive PI3K-Aktivität und die daraus resultierende PIP3-Synthese ermöglichen die konstitutive Lokalisation der Gab1-R556/560A Mutante an der Plasmamembran.

Die Substitution des hydrophilen Serins 552 durch ungeladenes und hydrophobes Alanin hat keinen Einfluss auf die Interaktion der PH-Domäne mit den Argininen 556 und 560 (Abb. 12 und 33). Die Gab1-S552A Mutante kann nicht an Aminosäureposition 552 phosphoryliert werden. Weder durch Jak2-V617F-Expression noch nach Epo-Stimulation zeigt diese Gab1-Mutante eine Translokation an die Plasmamembran (Abb. 16 und 18).

Die Substitution von Serin 552 durch Glutamat verhindert durch die negativ geladene Glutaminsäure die intramolekulare Interaktion (Abb. 12 und 33) und bewirkt die konstitutive Exponierung der PH-Domäne. Dies ermöglicht die konstitutive Membrantranslokation der Gab1-S552E Mutante, die sowohl Jak2-V617F- als auch Epo-unabhängig ist (Abb. 16 und 18).

Durch Phosphorylierung des Serins 552 erhält das Serin eine negative Ladung. Wie die Substitution des Serins 552 durch Glutaminsäure, hebt die Phosphorylierung des Serins 552 somit die intramolekulare Interaktion der PH-Domäne mit den Argininen 556 und 560 in Gab1 auf (Abb. 33).

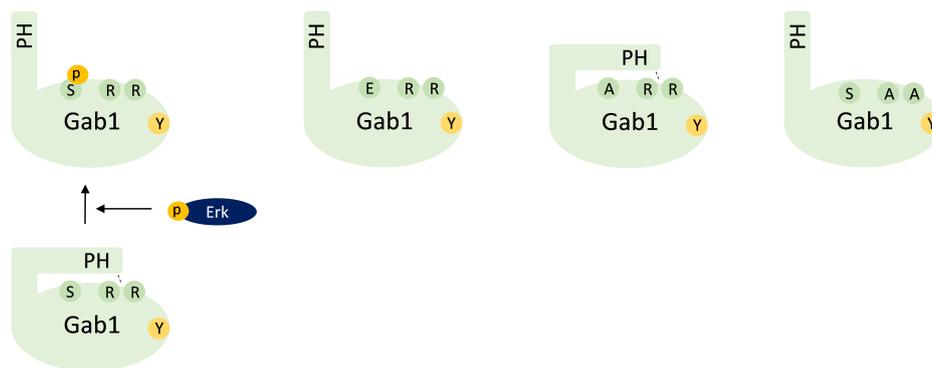


Abbildung 33: Die Regulation der inhibitorischen intramolekularen Interaktion in Gab1. Die N-terminale PH-Domäne in Gab1 interagiert mit den Argininen 556 und 560 im C-terminalen Bereich. Die Erk-abhängige Phosphorylierung des Serins 552 bedingt die negative Ladung dieser Aminosäure durch das Phosphat. Die Substitution des Serins 552 durch das negativ geladene Glutamat bedingt analog zur Phosphorylierung des Serins 552 die Aufhebung der intramolekularen Interaktion, die die Exponierung der PH-Domäne zur Folge hat. Die Substitution des Serins 552 durch hydrophiles Alanin hat keinen Einfluss auf die intramolekulare Interaktion der PH-Domäne mit den Argininen 556 und 560. Die Substitution der Arginine 556 und 560 durch Alanine führt zur konstitutiven Exponierung der PH-Domäne.

Die Hypothese, dass die Interaktion der N-terminalen PH-Domäne mit den Argininen 556 und 560 die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran inhibiert, kann somit bestätigt werden. Die MAPK-abhängige Phosphorylierung des Serins 552 bewirkt die Aufhebung der intramolekularen Interaktion und die Exponierung der PH-Domäne (Abb. 12, 16, 18 und 33). In dieser Konformation kann Gab1 mit PIP3 in der Plasmamembran interagieren (Abb. 16 und 18). So ist neben der PH-Domäne auch der Phosphorylierungsstatus des Serins 552 an der Regulation der Jak2-V617F- und Epo-induzierten Translokation von Gab1 beteiligt. Die Abhängigkeit der Gab1-Membrantranslokation von der Phosphorylierung des Serins 552 wurde auch bei der IL-6-induzierten Signaltransduktion beobachtet [101]. Es scheint sich somit um einen allgemeinen Regulationsmechanismus der PH-Domänen-vermittelten Translokation von Gab1 zu handeln, der abhängig von der Aktivierung der PI3K- und MAPK-Kaskade ist.

Welche Aminosäuren in der PH-Domäne die Interaktion zu den Argininen 556 und 560 vermitteln ist jedoch noch unbekannt. Die Interaktion der PH-Domäne mit dem Argininen 556 und 560 könnte aber zum einen über Ionenbindungen zwischen sauren Aminosäuren in der PH-Domäne mit den basischen Argininen entstehen. Zum anderen können die Arginine 556 und 560 auch Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen Aminosäuren, die ebenfalls Aminogruppen enthalten, in der PH-Domäne eingehen.

Ob die Translokation weiterer Gab-Familie Proteine wie in Gab1 reguliert sind, ist bisher nicht untersucht. Jedoch ist im C-terminalen Bereich des Gab-Familie Proteins Gab2 ein KSPxxKxxxR Motiv zu finden, welches dem R-S552-Pxx-R556-xxx-R560 Motiv in Gab1 sehr ähnlich ist [108] (Abb. 34). Daher wäre es möglich, dass die für Gab1 gezeigte Regulation der PH-vermittelten Translokation auch in anderen Gab-Familie Proteinen, wie Gab2, konserviert ist.

```
Gab1 529 VKPAPLEIKPLPEWEELQAPVRSPTITRSFARDSSRFPMSP----RPDSVHSTTSSSDSHD
Gab2 523 AKPTPLDLRNNVIDEL--PFKSPITKSWSRANHTFNSSSSQYCRPISTQSIITST-DSGD
```

Abbildung 34: Sequenz Alignment der humanen Gab-Familie Proteine Gab1 und Gab2. Abgebildet sind die Peptidsequenzen von Gab1 ab Position 529 und von Gab2 ab Position 523. Das Motiv RSPxxRxxxR in Gab1 und das Motiv KSPxxKxxxR in Gab2 sind grau hinterlegt.

Wie hier gezeigt wurde, gibt es im Vergleich zur physiologischen Epo-induzierten Signaltransduktion keine Unterschiede in der Regulation der Translokation von Gab1 in der pathophysiologischen Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion. Das konstitutiv an der Membran rekrutierte Gab1 könnte aber bei der dysregulierten Signalverschaltung und -weiterleitung in Jak2-V617F-positiven Zellen beteiligt sein. Es ist unbekannt, welchen Einfluss Gab1 auf die Entwicklung einer pathophysiologischen Signaltransduktion ausübt. Gab1 spielt bei der mit myeloproliferativen Neoplasien assoziierten ligandenunabhängigen Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen eine Rolle (Abb. 13C). Der Aufschluss von Mechanismen, die die Translokation von Gab-Familie Proteinen regulieren, könnte daher zur Erkennung und Entwicklung von neuen potentiellen Therapieansätzen von Krankheiten, wie z.B. den MPN, beitragen.

5.3 Die Epo- und Jak2-V617F induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1 sind unabhängig von der Plasmamembranrekrutierung

Die Interaktion der N-terminalen PH-Domäne mit den Argininen 556 und 560 in Gab1 wird durch die Phosphorylierung des Serins 552 aufgehoben. Die MAPK-abhängige Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 wurde für die Jak2-V617F- und die Epo-induzierte Signaltransduktion gezeigt (Abb. 21 und 22).

Hat die MAPK-abhängige Phosphorylierung des Serins 552 und die damit verbundene Membrantranslokation von Gab1 einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Tyrosinen in Gab1? Macht die Membrantranslokation erst möglich, dass Gab1, z.B. durch die an Rezeptoren assoziierten Jaks, phosphoryliert werden kann?

Die Gab1-S552A und Gab1- Δ PH Mutanten, die nicht mit PIP3 in der Plasmamembran interagieren (Abb. 16 und 18), werden Jak2-V617F- und Epo-induziert am Tyrosin 627 phosphoryliert (Abb. 17 und 19). Die Epo- und Jak2-V617F-induzierte Tyrosinphosphorylierung von Gab1 sind weiterhin nicht abhängig von der MAPK-Aktivität und der damit verbundenen Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 (Abb. 21 und 22).

Die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 und die dadurch bedingte Aufhebung der intramolekularen Interaktion der PH-Domäne mit dem C-terminalen Abschnitt von Gab1 sind daher nicht notwendig, um die Tyrosine in Gab1 als Substrate für Tyrosinkinase zunächst strukturell zugänglich zu machen. Weiterhin ist die Epo- und die Jak2-V617F induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 scheinbar entkoppelt von der MAPK-abhängigen und PH-Domänen-vermittelten Membrantranslokation von Gab1.

Jedoch ist die Epo- und Jak2-V617F-induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 627 der Gab1- Δ PH Mutante im Vergleich zum Gab1-WT geringer (Abb. 17 und 19). Dies erklärt sich durch die verzögerte Phosphorylierung des Tyrosins 627 der Gab1- Δ PH Mutante (Abb. 20). Diese Gab1-Mutante wird nicht an die Plasmamembran rekrutiert (Abb. 18). Eine Inhibition der PI3K-Aktivität reduziert die Epo-induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 627 von Gab1 (Abb. 24). Nach Inhibition der PI3K-Aktivität in Jak2-V617F exprimierenden Zellen dissoziiert Gab1 von der Membran in das Zytoplasma (Abb. 23) [103]. Dies bewirkt in Jak2-V617F exprimierenden Zellen im Gegensatz zur Epo-induzierten Signaltransduktion jedoch keine Reduktion der Jak2-V617F induzierten Phosphorylierung des Gab1 am Tyrosin 627 (Abb. 23). Die initiale Epo-induzierte Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran scheint die Phosphorylierung des Tyrosins 627 zu begünstigen. Dagegen hat bei der konstitutiven Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion die Translokation keinen verstärkenden Einfluss auf die Phosphorylierung des Tyrosins 627. So könnte die Epo-induzierte initiale Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran die Phosphorylierung des Tyrosins 627 der Gab1-Moleküle beschleunigen. Die Translokation an die Plasmamembran würde Gab1 als Substrat in die Nähe der rezeptor-assoziierten Jaks rekrutieren. Das Tyrosin 401 im Epo-R spielt bei der Epo-abhängigen Phosphorylierung von Gab1 am Tyrosin 627 eine Rolle [117, 161]. Es ist jedoch unbekannt, wie das phosphorylierte Tyrosin 401 im Epo-R mit der Gab1 Tyrosinphosphorylierung zusammenhängt. Die Epo-induzierte Phosphorylierung des Epo-R am Tyrosin 401 hat die Rekrutierung von SHP2 an den Epo-R zur Folge [86]. Die SHP2-abhängige Aktivierung der MAPK-Kaskade [93] könnte einen verstärkenden Einfluss auf die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 haben. Durch Rekrutierung von SHP2 an den Epo-R wird SHP2 an seinen Tyrosinen 542 und 580 phosphoryliert [86, 96]. Diese phosphorylierten Tyrosine werden durch die SH2-Domäne von Grb2 gebunden [93, 94]. Die Rekrutierung des Grb2:SOS-Komplexes an Rezeptor-gebundenes SHP2 und somit in die Nähe von Ras induziert die Aktivierung der MAPK-Kaskade. Die aktivierten Erk1 oder Erk2 können dann das Serin 552 in Gab1 phosphorylieren. Die PH-Domänen vermittelte Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran führt zur Translokation von Gab1 in die Nähe der am Epo-R assoziierten Jaks.

Die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 ist nicht essentiell von der Translokation an die Plasmamembran abhängig. Gab1, welches nicht direkt mit der Plasmamembran interagieren kann, wird Epo- und Jak2-V617F-induziert am Tyrosin 627 phosphoryliert. Die Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran kann jedoch das Phosphorylierungs-

niveau des Tyrosins 627 in der Gesamtheit der Gab1-Proteine erhöhen.

Im Vergleich zur physiologischen Epo-induzierten Signaltransduktion gibt es in der Regulation der Translokation und der Phosphorylierung von Gab1 in der pathophysiologischen Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion keine Unterschiede. Entgegen der Hypothese, dass Gab1 erst nach PH-Domänen-vermittelter Membranrekrutierung von den am Rezeptor befindlichen Janus-Kinasen an seinen Tyrosinen phosphoryliert werden kann, ist die Epo- und Jak2-V617F-induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 627 unabhängig von der Rekrutierung an die Plasmamembran. Wie kommt es zur Entkopplung der Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1 von dessen Plasmamembranrekrutierung?

5.4 Die Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1 ist abhängig von der Jak2-V617F-Kinaseaktivität

Die Epo- und Jak2-V617F-induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 wird unabhängig von der Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran vermittelt. Die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran würde die Rekrutierung von Gab1 in die Nähe der am Epo-R assoziierten Jak2 bzw. Jak2-V617F ermöglichen. Dieser Rekrutierungsmechanismus in die Nähe der Jaks scheint aber nicht für die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 notwendig zu sein. Wird Gab1 eventuell durch andere Tyrosin-Kinasen phosphoryliert?

Es ist bekannt, dass die IL-6- und G-CSF-abhängige Aktivierung von Src-Familie Kinasen in hämatopoetischen Zellen die Phosphorylierung von Tyrosinen in Gab1 und Gab2 induziert [127, 162]. Die SFKs interagieren nach Myristoylierung und Palmitoylierung aber nicht nur mit der Plasmamembran, sondern auch mit der perinukleären Membran [130, 131, 163]. SFKs könnten somit Gab1 an der Plasmamembran oder an der perinukleären Membran phosphorylieren. Die Jak2-V617F- und Epo-induzierte Phosphorylierung von Gab1 durch SFKs an der perinukleären Membran könnte die Entkopplung der PH-Domänen vermittelten Translokation an die Plasmamembran von der Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 erklären. Doch sind SFKs an der Phosphorylierung des Tyrosins 627 in der Jak2-V617F- bzw. Epo-induzierten Signaltransduktion beteiligt? Im Rahmen der am Lehrstuhl für Systembiologie der Otto-von-Guericke-Universität von Caroline Fabian angefertigten Bachelorarbeit wurde gezeigt, dass SFK in Hek293-Jak2-WT und -Jak2-V617F Zellen konstitutiv aktiv sind [164]. Die Inhibition der SFK-Aktivität hat aber keinen Einfluss auf die Jak2-V617F- oder Epo-induzierte Phosphorylierung von Gab1 am Tyrosin 627 [164]. Die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 ist somit nicht SFK-abhängig.

Obwohl SFKs nicht an der Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 in der Epo- und Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion beteiligt sind, könnten SFKs aber andere Tyrosine in Gab1 phosphorylieren. Die HGF-induzierte Rekrutierung von SFKs an c-Met ermöglicht die Phosphorylierung und Aktivierung von SFKs durch die aktivierte Rezeptortyrosinkinase c-Met [165]. Gab1 wird HGF-induziert an einigen Tyrosylresten durch SFKs und an anderen Tyrosylresten direkt durch die Rezeptortyrosinkinase c-Met phosphoryliert [128, 129]. In der durch Rezeptor-assoziierte Jak-Tyrosinkinasen vermittelten Signaltransduktion wurde eine solche Jak- und SFK-abhängige Phosphorylierung verschiedener Tyrosine in Gab1 bisher nicht untersucht und kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Nur durch die Epo-induzierte Aktivierung des Jak2-WT oder durch die Expression der konstitutiv aktiven Jak2-V617F Mutante wird die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 induziert [160]. Die Inhibition der Kinaseaktivität der Jak2-V617F führt zur Reduktion der Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1, wodurch SHP2 nicht mehr mit Gab1 interagiert (Abb. 27). Dies zeigt, dass die Phosphorylierung des Tyrosins 627 von

Gab1 abhängig von der Kinaseaktivität der Jak2-V617F ist. Es ist jedoch unbekannt, ob Gab1 ein direktes Substrat der Tyrosinkinase Jak2 ist oder ob andere Jak2-Kinase-abhängige Kinasen Gab1 am Tyrosin 627 phosphorylieren. So werden in hämatopoetischen Zellen neben SFKs und Jaks auch Nicht-Rezeptor-assoziierte Tyrosin-Kinasen der *feline sarcoma* (FES)-Familie exprimiert [166]. Die FES-Tyrosinkinase-Familie ist in der Lage Wachstumsfaktor-abhängig Substrate, wie STAT5 oder RasGAP im Zytoplasma hämatopoetischer Zellen zu phosphorylieren [167]. Zwar ist nicht bekannt, ob Gab1 ein Substrat der FES-Familie ist, aber die Phosphorylierung von Gab1 durch FES im Zytoplasma würde die von der PH-Domänen-vermittelte Translokation unabhängige Phosphorylierung des Tyrosins 627 in der Epo-R-vermittelten Signaltransduktion erklären.

Die Epo- oder Jak2-V617F-induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 durch SFKs kann ausgeschlossen werden. Eine Phosphorylierung des Tyrosins 627 von Gab1 an der Plasmamembran durch z.B. rezeptor-assoziierte Jaks ist somit wahrscheinlicher. Gibt es daher neben der PH-Domänen-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran einen anderen Mechanismus durch den Gab1 in die Nähe von an der Plasmamembran lokalisierten Tyrosinkinasen rekrutiert werden kann?

5.5 Die Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R ist unabhängig von der PH-Domänen vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran

Die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 ist in der Epo- und Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion unabhängig von der PH-Domänen-vermittelten Translokation an die Plasmamembran. Die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 ist weiterhin unabhängig von der Aktivität der Src-Familie Kinasen, aber abhängig von der Jak2-Kinaseaktivität. Dies deutet auf einen Mechanismus hin, der Gab1 in die Nähe der am aktivierten Epo-R assoziierten Jaks rekrutieren kann und Gab1 somit durch die aktive Jak2 phosphoryliert werden kann.

Wie wird Gab1 unabhängig von der PH-Domänen-vermittelten Translokation an die Plasmamembran in die Nähe der Rezeptor-assoziierten Jaks rekrutiert?

Die Expression der konstitutiv aktiven Jak2-V617F Mutante induziert die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R (Abb. 25-28). Die Kinaseaktivität der Jak2-V617F Mutante ist dabei wichtig für die Gab1:Epo-R-Interaktion (Abb. 27). In ihren Masterarbeiten konnten Ulrike Rettschlag und Mandy Hauck unabhängig voneinander zeigen, dass Gab1 auch nach Epo-induzierter Aktivierung von Jak2 mit dem Epo-R interagiert [168, 169]. Eine Aktivierung des Epo-R durch Epo oder durch die Jak2-V617F-Mutante ist daher für die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R notwendig.

Die Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R ist unabhängig von der Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 und der PH-Domänen-vermittelten Translokation an die Plasmamembran (Abb. 26). Die Rekrutierung von Gab1 an den aktivierten Epo-R würde somit die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 durch Rezeptor-assoziierte Jak2 bzw. Jak2-V617F ermöglichen. Auch andere Proteine, wie SHP2 oder STAT5 werden erst durch Rekrutierung an den aktivierten Epo-R durch Jak2 phosphoryliert [3]. Diesen Proteinen ist jedoch gemein, dass sie SH2-Domänen besitzen, mit denen sie phosphorylierte Tyrosine im Epo-R binden. Gab1 weist aber keine SH2-Domänen auf.

Bindet Gab1 daher direkt oder indirekt an den Epo-R? Es ist noch unbekannt, welche Domänen in Gab1 und dem Epo-R wichtig für die Gab1:Epo-R Interaktion sind.

So könnte die konstitutive SH3-vermittelte Interaktion von Grb2 mit Gab1 (Abb. 25) [104, 115] eine Rekrutierung des Grb2:Gab1-Komplexes an den Epo-R ermöglichen, wie es u.a. für die Interaktion von Gab1 mit dem EGF-Rezeptor beschrieben ist [122]. Grb2 bin-

det mit Hilfe seiner SH2-Domäne an das phosphorylierte Tyrosin 464 im Epo-R [97, 154]. Die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R ist jedoch unabhängig von der Bindung von Grb2 an Gab1 (Abb. 28). Somit kann die Hypothese zur Grb2-vermittelten Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R verworfen werden. Die Bindung von SHP2 an das phosphorylierte Tyrosin 401 im Epo-R [86] könnte ein anderer Rekrutierungsmechanismus von Gab1 an den Epo-R sein. Barua et al. beschreiben, dass SHP2 mit seinen beiden SH2-Domänen in der Lage ist an zwei unterschiedliche phosphorylierte Tyrosine gleichzeitig zu binden [150]. So könnte eine SH2-Domäne von SHP2 an den phosphorylierten Epo-R und die zweite SH2-Domäne von SHP2 an das phosphorylierte Tyrosin 627 in Gab1 binden. Dies würde die Rekrutierung von phosphoryliertem Gab1 an den Epo-R ermöglichen. Dazu müsste Gab1 jedoch bereits vor der Rekrutierung an den Epo-R z.B. im Zytoplasma phosphoryliert werden. Jedoch ist die Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R unabhängig von der Bindung von SHP2 an die phosphorylierten Tyrosine 627 und 659 in Gab1 (Abb. 28).

Doch wie kann Gab1 mit dem Epo-R interagieren? Für den HGF-Rezeptor c-Met ist beschrieben, dass ein 16-Aminosäure Bereich in der MBD von Gab1 (Abb. 7) mit dem phosphorylierten Tyrosin 1349 in c-Met interagiert [170]. Jedoch weist die MBD von Gab1 keine Sequenzhomologie zu anderen Phospho-Tyrosin-Bindedomänen, wie z.B. SH2-Domänen, auf [171]. Eine Hypothese wäre, dass das phosphorylierte Tyrosin 401 im Epo-R eine Gab1:Epo-R Interaktion vermittelt [161]. Es wäre daher möglich, dass die Interaktion von Gab1 mit dem phosphorylierten Epo-R über die MBD von Gab1 vermittelt wird (Abb. 34).

Jedoch ist noch unklar, wie die Gab1:Epo-R Interaktion tatsächlich vermittelt wird. Jak2-V617F ist nicht nur am Epo-R, sondern auch an den Zytokin-Rezeptoren Tpo-R und G-CSF-R assoziiert [49]. Unabhängig von der Gab1:Epo-R Interaktion könnte Gab1 somit auch nach Bindung an den Tpo-R oder G-CSF-R durch Jak2-V617F phosphoryliert werden. Andererseits wird Gab1 aber Epo-abhängig und somit Epo-R-vermittelt in Jak2-WT exprimierenden Zellen am Tyrosin 627 phosphoryliert [169, 168]. Die Gab1:Epo-R Interaktion könnte somit einen Rekrutierungsmechanismus von Gab1 in die Nähe der rezeptor-assoziierten Jak2-V617F Mutante darstellen. Unabhängig von der PH-Domänen abhängigen Translokation von Gab1, könnte Gab1 nach Bindung an den Epo-R sowohl durch den Jak2-WT als auch durch die Jak2-V617F Mutante phosphoryliert werden.

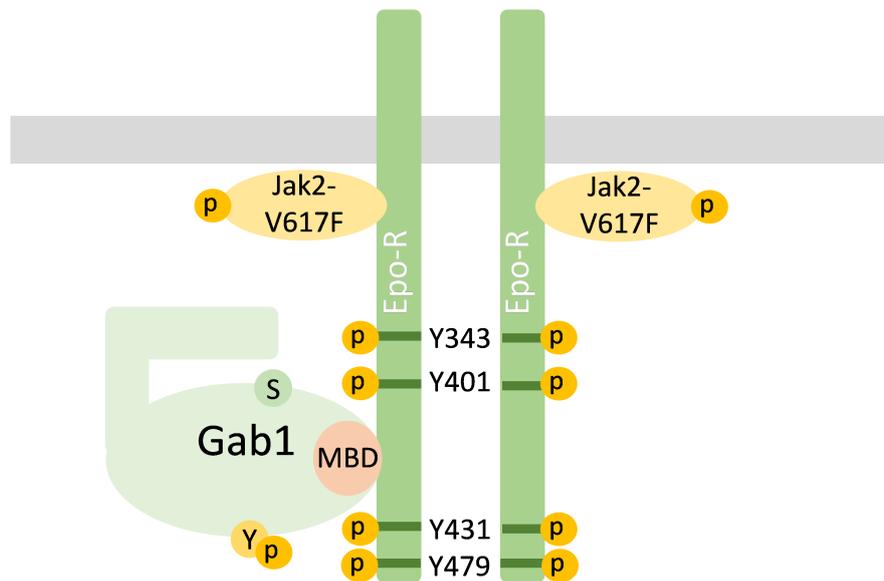


Abbildung 35: Mögliche Rekrutierung von Gab1 an den phosphorylierten Epo-R. Die Phosphorylierung des Epo-R könnte die Interaktion der MBD in Gab1 mit dem Epo-R induzieren. Nach Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R könnte Jak2-V617F die Tyrosine in Gab1 phosphorylieren.

Die Gab1- Δ PH Mutante wird schwächer am Tyrosin 627 phosphoryliert als der Gab1-WT. Daher ist es möglich, dass die PH-Domänen-vermittelte Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran und die Gab1:Epo-R Interaktion parallele Mechanismen zur Vermittlung der Tyrosinphosphorylierung von Gab1 darstellen. In der EGF-induzierten Signaltransduktion wird Gab1 mittels PH-Domäne oder über eine direkte Gab1:EGFR Interaktion an die Plasmamembran rekrutiert und kann so die EGF-induzierte MAPK-Kaskade amplifizieren [122]. Bei hohen EGF-Konzentrationen wird Gab1 vornehmlich direkt an den EGF-R rekrutiert. Mit abnehmender EGF-Konzentration wird Gab1 zunehmend PH-Domänen-vermittelt an PIP3 in der Plasmamembran rekrutiert. Die Hypothese von Sampaio et al. ist, dass bei geringen EGF-Konzentrationen weniger aktivierte und phosphorylierte EGF-R für die Interaktion mit Gab1 zur Verfügung stehen. Bei geringen EGF-Konzentrationen kann somit eine schwache EGF-R-vermittelte Aktivierung der MAPK-Kaskade durch die PH-Domänen-vermittelte Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran verstärkt werden [122]. Auch in der Epo-R-vermittelten Signaltransduktion könnten daher sowohl die Rekrutierung von Gab1 an PIP3 in der Plasmamembran als auch die Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R die Translokation von Gab1 in die Nähe der am Rezeptor assoziierten Jak2 vermitteln. Das Phosphorylierungsniveau der Gesamtheit aller Gab1-Proteine am Tyrosin 627 könnte somit von der Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R und an PIP3 abhängig sein (Abb. 36).

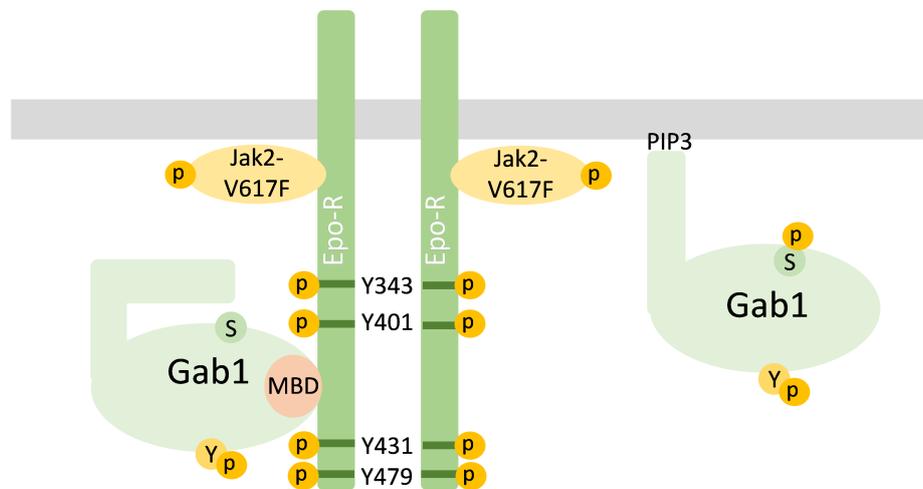


Abbildung 36: PH-Domänen-vermittelte und Epo-R-vermittelte Translokation von Gab1 an bzw. in die Nähe der Plasmamembran. Die Epo- und Jak2-V617F-induzierte Tyrosin Phosphorylierung von Gab1 könnte über zwei parallele Mechanismen vermittelt werden. Zum einen könnte Gab1 über die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R und zum anderen durch die Interaktion der Gab1 PH-Domäne mit PIP3 in der Plasmamembran in die Nähe der Rezeptor-assoziierten Jak2 bzw. Jak2-V617F rekrutiert werden. Somit könnten Jak2 bzw. Jak2-V617F Gab1 unabhängig von der Gab1:PIP3-Interaktion am Tyrosin 627 phosphorylieren.

Die Rekrutierung der Gab1- Δ PH- und der S552A-Mutanten an den auf der Zelloberfläche exprimierten Epo-R konnte aber nicht mittels konfokaler Mikroskopie gezeigt werden (Abb. 16 und 18). Eventuell ist die Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R sehr transient oder es sind nur geringe Mengen des Epo-R auf der Zelloberfläche exprimiert. So wäre die geringe Anzahl an Gab1:Epo-R Komplexen an der Plasmamembran im Vergleich zur Menge von zytoplasmatisch lokalisiertem Gab1 in der konfokalen Mikroskopie nicht detektierbar. Weiterhin formulieren Bulut et al. die Hypothese, dass der aktivierte Epo-R erst nach Internalisierung die Epo-R vermittelte Signaltransduktion effizient induzieren kann [172]. Daher könnte Gab1 auch mit internalisiertem Epo-R im Zytoplasma interagieren. Noch sind der Rekrutierungsmechanismus von Gab1 an den Epo-R und dessen Bedeutung für die Jak2-V617F-induzierte Signaltransduktion nicht verstanden. Doch welche Bedeutung die Gab1:Epo-R Interaktion besitzt, ist noch nicht verstanden.

Die Phosphorylierung von Gab1 am Tyrosin 627 ist unabhängig von der Interaktion von Gab1 mit PIP3 in der Plasmamembran und könnte von der Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R abhängig sein. Das Tyrosin 627 in Gab1 dient im phosphoryliertem Zustand neben dem Tyrosin 659 als Bindestelle für die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2. Kann SHP2 unabhängig von der Phosphorylierung des Serins 552, unabhängig von der daraus resultierenden Konformationsänderung in Gab1 und unabhängig von der Rekrutierung von Gab1 an PIP3 in der Plasmamembran mit Gab1 interagieren?

5.6 Die Bindung von SHP2 an Gab1 ist unabhängig von der Phosphorylierung des Serins 552 und der PH-Domänen-vermittelten Plasmamembranrekrutierung

Die Phosphorylierung der Tyrosine in Gab1 induziert die Rekrutierung u.a. der PI3K-Untereinheit p85, RasGAP und SHP2 an Gab1 [118]. Die Bindestellen dieser Interaktionspartner von Gab1 sind im ungeordneten C-terminalen Abschnitt von Gab1 lokalisiert (Abb. 7). Die intramolekulare Interaktion der geordneten N-terminalen PH-Domäne in Gab1 mit dem ungeordneten C-terminalen Bereich in Gab1 wird durch die Phosphorylierung des Serins 552 aufgehoben (Abb. 12). Somit könnten durch die Interaktion des C-terminalen Bereichs mit der PH-Domäne die Bindestellen für Gab1-Interaktionspartner sterisch blockiert sein. Bestimmte Bereiche in intrinsisch-ungeordneten Proteinen werden erst durch Phosphorylierungen oder Interaktionen für andere Interaktionspartner zugänglich [173]. Daher könnte erst durch Phosphorylierung von verschiedenen Serin-, Threonin- und Tyrosinseitenketten in Gab1 und durch die Rekrutierung anderer Interaktionspartner an Gab1 eine Struktur in Gab1 entstehen, die es SHP2 möglich macht, an Gab1 zu binden. Werden die Bindestellen in Gab1 erst durch die Exponierung der PH-Domäne zugänglich für die Interaktionspartner?

Jak2-V617F induziert die Phosphorylierung des Serins 552, die Translokation an die Plasmamembran und die Phosphorylierung der SHP2-Bindestelle Y627 von Gab1. Jedoch ist die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 unabhängig von der Phosphorylierung des Serins 552, der dadurch induzierten Konformationsänderung und unabhängig von der Translokation von Gab1 an die Plasmamembran (Abb. 16 und 21). Ist auch die Interaktion von SHP2 mit Gab1 unabhängig von der Konformation bzw. der Translokation von Gab1?

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Interaktion von Gab1 und SHP2 durch Jak2-V617F Expression induziert wird (Abb. 25). Die Interaktion von Gab1 und SHP2 ist aber unabhängig von der MAPK-abhängigen Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 (Abb. 26). Die Interaktion von SHP2 mit der Gab1-S552A Mutante zeigt, dass SHP2 unabhängig von der Konformationsänderung in Gab1, die die Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 induziert, an Gab1 bindet (Abb. 26). Auch die Gab1- Δ PH Mutante interagiert, induziert durch die Jak2-V617F Expression, mit SHP2. In der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion inhibiert die intramolekulare Interaktion der Gab1 PH-Domäne mit dem C-terminalen Bereich in Gab1 nicht die Interaktion von Gab1 mit SHP2. Die Interaktion von Gab1 mit SHP2 ist weiterhin unabhängig von der PH-Domänen-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran.

5.7 Die Interaktion von Gab1 und SHP2 ist essentiell für die Amplifikation der Epo- und Jak2-V617F-induzierten MAPK-Aktivität

Die Phosphorylierung von Gab1 und die Interaktionen von Gab1 mit SHP2 und Grb2 sind unabhängig von der PH-Domänen-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran. Doch welche Bedeutung haben die Interaktionen von SHP2 und Grb2 mit Gab1 in der Epo- und Jak2-V617F-induzierten Aktivierung der MAPK-Kaskade?

Die konstitutiv an der Plasmamembran assoziierten Gab1-S552E und Gab1 R556/560A Mutanten, die wie der Gab1-WT, konstitutiv mit dem Grb2:SOS-Komplex interagieren sollten, induzieren keine MAPK-Aktivierung in Abwesenheit eines exogenen Stimulus oder der Jak2-V617F-Expression (Abb. 17 und 19). Dies ist interessant, da die Rekrutierung von SOS an die Plasmamembran den Austausch von GDP durch GTP in Ras induzieren und somit die Aktivierung der MAPK-Kaskade ermöglichen sollte. Jedoch ist nicht nur die Rekrutierung von SOS in die Nähe von Ras notwendig um GDP durch GTP in Ras auszutauschen. Erst ein liganden-induzierter Stimulus induziert den SOS-

vermittelten Austausch von GDP durch GTP in Ras [174]. Jedoch hat die konstitutive Bindung der Grb2:SOS-Komplexes an die Prolin-reiche Region in Gab1 weder in der Epo- noch in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion einen Einfluss auf die Aktivierung der MAPK-Kaskade (Abb. 29 und 30).

Die verhinderte Rekrutierung von SHP2 an die Gab1- Δ SHP2 Mutante resultiert dagegen in einer deutlichen Reduktion der Epo- und der Jak2-V617F-induzierten Aktivierung der MAPK-Kaskade (Abb. 29 und 30). Die Bedeutung der Bindung von SHP2 an Gab1 für die zytokin-induzierte MAPK-Aktivierung wurde bereits beschrieben [175, 176, 132, 123, 177, 178]. Dabei kann SHP2 auf zwei Arten positiv auf die Aktivierung der MAPK-Kaskade wirken. SHP2 bindet an die phosphorylierten Tyrosine 627 und 659 in Gab1 (Abb. 25-28). Jak2-V617F-abhängig werden die Tyrosine 542 und 580 in SHP2 phosphoryliert. Phosphoryliertes SHP2 interagiert mit Gab1 (Abb. 25B). Diese stimulus-induzierte Bindung von SHP2 an Gab1 bewirkt zum einen die Rekrutierung von Grb2:SOS an Gab1, wodurch SHP2 als Adaptermolekül auf die MAPK-Kaskade Einfluss hat [93, 94]. Zum anderen löst die Bindung der SH2-Domänen des SHP2 an Gab1 die auto-inhibitorische Blockade der Phosphatase-Domäne von SHP2 auf [84, 85]. Die Phosphatase-Domäne ist dann aktiv und dephosphoryliert das Phospho-Tyrosin 317 in Gab1. Dieses Phospho-Tyrosin dient als Bindestelle für RasGAP [135]. RasGAP wirkt inhibierend auf die Ras:Raf-Interaktion und die MAPK-Aktivierung [179, 136, 180]. Die SHP2-vermittelte Dephosphorylierung des Phospho-Tyrosins 317 in Gab1 verhindert somit die Interaktion von Gab1 und RasGAP [135]. Wird SHP2 aber nicht an die Gab1- Δ SHP2 Mutante rekrutiert, so kann Gab1 mit RasGAP interagieren und es kommt zur Inhibition der MAPK-Aktivierung.

Ob sowohl die Adapter- als auch die Phosphatasefunktion von SHP2 bei der Epo- bzw. Jak2-V617F-induzierten MAPK-Aktivierung partizipieren, ist bisher nicht bekannt. Jedoch wirkt sich die Interaktion von SHP2 mit Gab1 amplifizierend auf die Epo- und Jak2-V617F-induzierte Aktivierung der MAPK-Kaskade aus.

Sowohl die Phosphorylierung des Tyrosins 627 als auch die Bindung von SHP2 an das phosphorylierte Tyrosin 627 in Gab1 sind unabhängig von der Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 und der Translokation von Gab1 an PIP3 in der Plasmamembran. Welche Bedeutung hat die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran für die Epo- und Jak2-V617F-induzierte Signaltransduktion?

5.8 Die Gab1-abhängige Verschaltung der PI3K- und MAPK-Kaskade

Die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran ist abhängig von der PI3K-Aktivität und wird Epo- und Jak2-V617F-abhängig induziert (Abb. 23) [103]. Jedoch ist die Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran weder in der Epo- noch in der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion nötig für die Phosphorylierung des Tyrosins 627 und für die Bindung von SHP2 an dieses phosphorylierte Tyrosin in Gab1 (Abb. 23, 24 und 26). Die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R könnte die Phosphorylierung von Gab1 am Tyrosin 627 (siehe 5.5) begünstigen.

Die Inhibition der PI3K-Aktivität reduziert sowohl die Epo- als auch die Jak2-V617F-induzierte Erk-Phosphorylierung (Abb. 23 und 24). Der verstärkende Einfluss der PI3K-Aktivität auf die Jak2-V617F-induzierte MAPK-Kaskade konnte auch in Jak2-V617F-positiven HEL Zellen beobachtet werden [103]. In der Epo-induzierten Signaltransduktion in primären erythroiden Vorläuferzellen wurde ebenfalls ein amplifizierender Einfluss der PI3K-Aktivität auf die Epo-induzierte MAPK-Kaskade beschrieben [181]. Der Einfluss der PI3K-Kaskade auf die MAPK-Aktivität kann wiederum mit der Gab1-abhängigen Verstärkung der MAPK-Kaskade erklärt werden. Die Inhibition der PI3K-Aktivität reduziert die PIP3-Menge und somit die PH-Domänen-vermittelte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran (Abb. 23) [101, 103]. Die Translokation von

Gab1 an die Plasmamembran hat zur Folge, dass die an Gab1 gebundenen Grb2:SOS- bzw. SHP2:Grb2:SOS-Komplexe in die Nähe von Ras rekrutiert werden. Nach PI3K-Inhibition wird der Gab1:SHP2:Grb2:SOS-Komplex nicht in die Nähe von Ras rekrutiert. Somit käme es nach Inhibition der PI3K-Aktivität nur zu einer geringen Aktivierung der MAPK-Kaskade. Auch in Jak2-V617F-positiven HEL Zellen, die kein Gab1 exprimieren, ist die MAPK-Aktivierung durch fehlende Rekrutierung der Gab1:Grb2:SOS- bzw. Gab1:SHP2:Grb2:SOS-Komplexe an die Plasmamembran deutlich reduziert (Abb. 13). Die Deletion der PH-Domäne in Gab1, analog zur Inhibition der PI3K-Aktivität, führt bei der IL-6-induzierten Signaltransduktion zu einer Abnahme der MAPK-Aktivität [101]. Die PI3K-abhängige und PH-Domänen-vermittelte Translokation von Gab1 an die Plasmamembran haben daher sowohl bei der Epo- als auch bei der Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion einen amplifizierenden Einfluss auf die MAPK-Aktivität. Zwar sind die Phosphorylierung von Gab1 am Tyrosin 627, die durch die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R vermittelt sein könnte, und die Bindung von SHP2 an das phosphorylierte Tyrosin 627 unabhängig von der Translokation von Gab1 an die Plasmamembran, jedoch wird die MAPK-Aktivierung durch die Rekrutierung von Gab1 bzw. des Gab1:SHP2-Komplexes an die Plasmamembran amplifiziert.

Die MAPK-Kaskade wird jedoch auch über die direkte Interaktion von Grb2:SOS oder SHP2 mit dem phosphorylierten Epo-R induziert [86, 97] (Abb. 37). So kann sowohl nach PI3K-Inhibition (Abb. 23 und 24) als auch unabhängig von Gab1 (Abb. 13) eine schwache Aktivierung der MAPK-Kaskade beobachtet werden, die Rezeptor-vermittelt induziert wird.

Die PI3K-abhängige Translokation von Gab1 an die Plasmamembran und somit die verstärkte Rekrutierung der Gab1-Interaktionspartner, wie SHP2 oder Grb2:SOS, in die Nähe von Ras sind wichtig für die Gab1-abhängige Amplifikation der Epo- und Jak2-V617F-induzierten Aktivierung der MAPK-Kaskade und somit für die Verschaltung der PI3K- und MAPK-Kaskade.

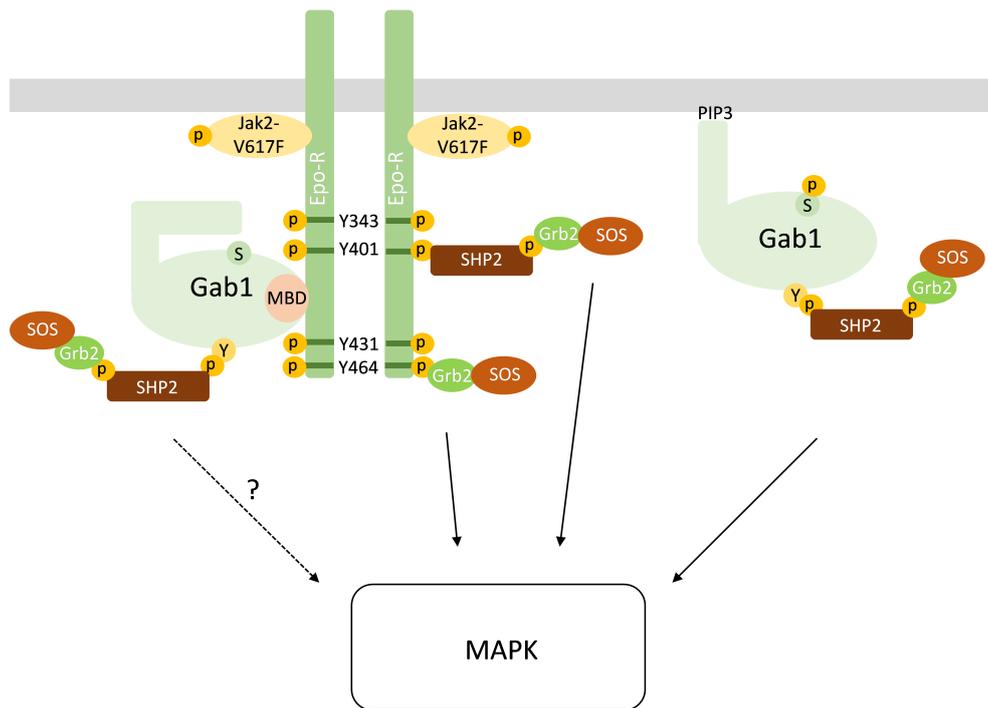


Abbildung 37: Mögliche Mechanismen zur PI3K- bzw. PIP3-abhängigen und -unabhängigen Amplifikation der MAPK-Kaskade. Durch die direkte Bindung des Grb2:SOS- oder des SHP2:Grb2:SOS-Komplexes an den Epo-R und die Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R würden Grb2:SOS-Komplexe unabhängig von PIP3 in der Plasmamembran in die Nähe des Membran-assoziierten Ras rekrutiert werden. Auch die PIP3-abhängige und PH-Domänen-vermittelte Translokation von Gab1 führt zur Rekrutierung des Grb2:SOS-Komplexes in die Nähe von Ras und somit zur Aktivierung der MAPK-Kaskade.

Um die pathophysiologische Proliferation in hämatopetischen Vorläuferzellen von Jak2-V617F-positiven Patienten zu behandeln werden verschiedene Therapienansätze untersucht und eingesetzt. So werden MPN-Patienten u.a. mit PI3K-Inhibitoren behandelt [182]. Die Inhibition der PI3K-Kaskade in Jak2-V617F positiven Zellen führt zur Reduktion der MAPK-Aktivierung (Abb. 23) und zur Reduktion der Proliferation von Jak2-V617F-positiven Zellen [103]. Jedoch führt die Inhibition der PI3K-Aktivität nicht zur Reduktion der MAPK-Aktivierung auf ein Niveau, wie es in Jak2-V617F-negativen Zellen beobachtet wird (Abb. 23). Die Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R und somit in die Nähe von Jak2-V617F ist unabhängig von der PH-Domänen-vermittelten Translokation an die Plasmamembran (Abb. 25, 26). Die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 könnte somit nach Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R durch Jak2-V617F katalysiert werden. Auch bei der Epo-induzierten Aktivierung von Jak2 und dem Epo-R wäre die Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R ein möglicher Mechanismus der die Entkopplung von Plasmamembranrekrutierung und Phosphorylierung von Gab1 bewirken würde [169, 168].

Die Rekrutierung von SHP2 an das phosphorylierte Tyrosin 627 in Gab1 führt zur Amplifikation der MAPK-Kaskade (Abb. 29 und 30). Da die durch den Epo-R:Gab1:SHP2-Komplex (Abb. 37) vermittelte Amplifikation der MAPK-Kaskade aber PI3K-unabhängig ist, wäre der Einsatz höherer und somit etwaiger schädlicher Konzentrationen von PI3K-Inhibitoren nicht zielführend um eine Reduktion der Proliferation Jak2-V617F positiver Zellen zu erzielen. Eine Behandlung aus Kombinationen verschiedener Inhibitoren wäre daher eher vielversprechend. So kann die Proliferation Jak2-V617F-positiver Zellen deut-

lich effizienter mit einer Kombination aus PI3K- und MAPK-Inhibitoren reduziert werden als mit den einzelnen Inhibitoren [103]. Wie schon in neueren klinischen Studien untersucht, sollten Kombinationen von Jak-, Mek- und PI3K- Inhibitoren eine erfolgreichere Behandlung der MPN-assoziierten Symptome ermöglichen [183, 184, 185].

5.9 Die Regulation der Phosphorylierung von Gab1 in der gp130-vermittelten Signaltransduktion

Ähnlich zur Jak2-V617F-induzierten Proliferation von hämatopoetischen Zellen, die in Jak2-V617F betroffenen Patienten zu Symptomen, wie zu einer Milz- oder Lebervergrößerung oder zur Hyperviskosität des Blutes führen, kann eine dysreguliertes IL-6-Signaltransduktion zur Ausbildung eines multiplen Myeloms führen [186]. IL-6-induziert bilden stark proliferierende B-Zellen zu viele Antikörper, was zu einer Hyperviskosität des Blutes führt. Die durch die dysregulierte IL-6-Signaltransduktion induzierte Hyperviskosität des Blutes wird, wie auch in der Jak2-V617F-induzierten Polycythämie Vera, durch eine Überproduktion von festen Blutbestandteilen als Syndrom der damit assoziierten Krankheiten induziert. Jedoch bewirkt eine dysregulierte IL-6-induzierte Signaltransduktion auch die Ausbildung von anderen Krankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis oder dem bronchialen Asthma [22]. Das Verständnis der Gab1-abhängigen Signalverschaltung in der IL-6-induzierten Signaltransduktion könnte daher auch die Entwicklung neuer Interventionsstrategien in der Bekämpfung dieser Krankheiten unterstützen.

Es wird angenommen, dass Gab1 auch nach IL-6-induzierter MAPK-Aktivierung Erkabhängig am Serin 552 phosphoryliert werden kann [101]. Die Phosphorylierung des Serins 552 bewirkt die Konformationsänderung von Gab1. Die Aufhebung der intramolekularen Interaktion der PH-Domäne mit dem C-terminalen Abschnitt in Gab1 durch die Phosphorylierung des Serins 552 führt zur IL-6-induzierten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran [101, 146]. Welche Bedeutung hat die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran für die IL-6-induzierte Phosphorylierung der Tyrosine von Gab1?

Erstmals konnte die Bedeutung der Phosphorylierung des Serins 552 für die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 in der IL-6-induzierten Signaltransduktion analysiert werden. In der Bachelorarbeit von Johannes Fritsch, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde, konnte mit Hilfe des Antikörpers, der das Epitop LQAPVR-[pS552]-PITRSF in Gab1 bindet, die IL-6-induzierte Phosphorylierung des Serins 552 nachgewiesen werden. Die Inhibition der MAPK-Kaskade reduziert die IL-6-induzierte Phosphorylierung am Serin 552 und am Tyrosin 627 in Gab1 [148]. Somit ist die Aktivierung der MAPK-Kaskade essentiell für die Vermittlung der Phosphorylierung des Serins 552 und des Tyrosins 627 in Gab1. Im Gegensatz zur Epo- und Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion hängt die IL-6-induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 627 somit stark von der Phosphorylierung des Serins 552 ab (Abb. 31). Die durch die Phosphorylierung des Serins 552 induzierte Exponierung der PH-Domäne in Gab1 muss stattfinden, damit Gab1 IL-6-induziert am Tyrosin 627 phosphoryliert werden kann [148]. Die Gab1- Δ PH Mutante wird in der gp130-vermittelten Signaltransduktion nicht am Tyrosin 627 phosphoryliert [101]. Auch die Inhibition der PI3K-Kaskade bewirkt, dass Gab1 IL-6-induziert nicht an die Plasmamembran rekrutiert und am Tyrosin 627 phosphoryliert wird [101].

Die Phosphorylierung von Gab1 scheint in der IL-6-induzierten Signaltransduktion essentiell von der PH-Domänen vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran abzuhängen. In der Epo-R-vermittelten Signaltransduktion wird Gab1 durch die PH-Domänen-vermittelte Translokation an die Plasmamembran und durch die Bindung an den aktivierten Epo-R (Abb. 25) in die Nähe der Jak2 rekrutiert. Ist Gab1 in räumlicher Nähe zur Jak2 kann Jak2 die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 katalysieren. Dagegen ist in der gp130-vermittelten Signaltransduktion bisher nur die Translokation an die Plasmamembran als möglicher Mechanismus zur Rekrutierung von Gab1 in die

Nähe der gp130-assoziierten Jak1 beschrieben [118]. Wird Gab1 IL-6-induziert nicht an die Plasmamembran rekrutiert, befindet sich Gab1 nicht in räumlicher Nähe zur aktivierten gp130-assoziierten Jak1, wodurch Gab1 nicht an seinem Tyrosin 627 phosphoryliert werden kann. Somit unterscheiden sich die gp130- und Epo-R-vermittelte Signaltransduktion in der Regulation der Phosphorylierung des *multi-site docking* Proteins Gab1 maßgeblich.

Doch welche Bedeutung hat Gab1 und die Phosphorylierung seiner Tyrosine in der gp130-vermittelten Signaltransduktion?

5.10 Die Bedeutung von Gab1 in der gp130-vermittelten Signaltransduktion

Der Vergleich von Gab1 exprimierenden und Gab1 defizienten murinen MEF und humanen Hek293-TREx FlpIn Zellen zeigt die Bedeutung von Gab1 in der gp130-vermittelten Signaltransduktion auf. Die Expression von Gab1 hat einen positiven Einfluss auf die späte Aktivierung der MAPK-Kaskade. Eine Gab1-abhängige Amplifikation der späten IL-6-induzierten Erk1/2-Phosphorylierung wurde bereits gezeigt [133], wobei die genaue zeitliche Terminierung der Gab1-vermittelten Amplifikation der MAPK-Kaskade in der IL-6-induzierten Signaltransduktion bisher unbekannt war. Der Gab1-abhängige positive *feedback* wirkt sich zwischen 10 und 30 min amplifizierend auf die IL-6-induzierte MAPK-Aktivierung in MEF Zellen aus (Abb. 32B). Auch in Hek293-TREx FlpIn Zellen ist in diesem Zeitraum nach Stimulation mit Hyper-IL-6 in Gab1 exprimierenden Zellen eine deutlich stärkere MAPK-Aktivierung als in Gab1-defizienten Zellen zu beobachten (Abb. 32C). Da die Hyper-IL-6-induzierte MAPK-Aktivierung in Zellen die mehr Gab1 exprimieren noch stärker ist, wird die Bedeutung von Gab1 in der IL-6-induzierten Signaltransduktion für die Amplifikation der MAPK-Kaskade noch deutlicher. Dagegen ist die initiale IL-6-induzierte Aktivierung der MAPK-Kaskade in Gab1-exprimierenden und defizienten Zellen identisch (Abb. 32B). Die initiale MAPK-Aktivierung scheint daher Gab1-unabhängig zu sein und könnte durch die IL-6-induzierte Interaktion von SHP2 mit gp130 vermittelt sein. Die Liganden-abhängige Phosphorylierung des Tyrosins 759 in gp130 dient SHP2 als Bindestelle. Infolge der Rekrutierung von SHP2 an gp130 wird SHP2 an den Tyrosinen 542 und 580 phosphoryliert [187]. Der Grb2:SOS-Komplex bindet an die phosphorylierten Tyrosine in SHP2 [93, 94] (Abb. 6B). Die IL-6-induzierte Rekrutierung von SHP2 bzw. des SHP2:Grb2:SOS-Komplexes an gp130 induziert somit die Rezeptor-vermittelte initiale Aktivierung der MAPK-Kaskade [148] (Abb. 31). Nach dieser initialen Aktivierung der MAPK-Kaskade wird die Erk1/2-abhängige Phosphorylierung von Gab1 am Serin 552 induziert [148]. Die daraus resultierende Rekrutierung an die Plasmamembran könnte die Phosphorylierung von Tyrosinen in Gab1 durch die gp130-assoziierte Jak1 bewirken.

Aber auch SFKs werden IL-6-induziert aktiviert [188]. Die Inhibition von SFKs hat eine Reduktion der Interleukin-6-induzierten Phosphorylierung von Tyrosin 627 in Gab1 zur Folge [189, 164]. Die Phosphorylierung der Tyrosine in Gab1 könnte somit auch durch SFKs erfolgen. In der HGF-induzierten Signaltransduktion kommt es zur Phosphorylierung unterschiedlicher Tyrosylreste in Gab1 zum einen durch den c-Met-Rezeptor und zum anderen durch Src [129]. Auch in der IL-6-induzierten Signaltransduktion wäre es daher möglich, dass die Phosphorylierung der verschiedenen Tyrosine in Gab1 durch Jaks oder SFKs katalysiert wird.

Die IL-6-induzierte Phosphorylierung der Tyrosine 627 und 659 in Gab1 ermöglicht die Rekrutierung von SHP2 [190]. Die Bindung von SHP2 an Gab1 induziert einen positiven *feedback*, der amplifizierend auf die IL-6-induzierte MAPK-Kaskade wirkt [101]. Somit sind sowohl die Expression als auch die Phosphorylierung von Gab1 am Tyrosin 627 essentiell für die Amplifikation der Interleukin-6-induzierten MAPK-Kaskade.

Die Amplifikation der MAPK-Kaskade kann sich verstärkend auf die Induktion MAPK-abhängiger Zielgene, die proliferativ und anti-apoptotisch wirken können [191, 192], auswirken. Es ist bekannt, dass die IL-6-induzierte Überexpression von Matrix Metalloprotease 13 (MMP13) MAPK-abhängig ist [193]. Die MMP-13 Überexpression ist u.a. mit humanen Karzinomen, der rheumatoiden Arthritis und Osteoarthritis assoziiert [194]. Die dysregulierte IL-6-induzierte Ausbildung maligner Zellen könnte daher durch die Gab1-abhängige Amplifikation der MAPK-Kaskade hervorgerufen werden. Durch eine pharmakologische Inhibition der PH-Domänen vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran, wie sie mit PI3K-Inhibitoren erzielt werden kann, wäre es vielleicht möglich die Amplifikation der IL-6-induzierten MAPK-Kaskade in malignen Zellen zu reduzieren. So stehen bereits Inhibitoren, die mit der PH-Domäne von Gab1 interagieren und somit die HGF-induzierte Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 verhindern zur Verfügung, die die Proliferation von Brustkrebszelllinien inhibieren können [195]. Durch die Inhibitoren wird die PH-Domäne in ihrer Konformation verändert. Zwar ist noch unbekannt wie diese Inhibitoren mechanistisch wirken, aber es wäre möglich, dass diese die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran und somit die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 hemmen. Die gezielte Inhibition der Phosphorylierung von Gab1 könnte auch die IL-6-induzierte Proliferation maligner Zellen hemmen. So werden Patienten mit multiplem Myelom bereits mit Mek- oder PI3K-Inhibitoren behandelt, um die IL-6-induzierte Proliferation maligner B-Zellen zu inhibieren [196, 197]. Eine Kombination von PI3K- und Mek-Inhibitoren wird aktuell in klinischen Studien bei verschiedenen Leukämie- oder Tumorerkrankungen erprobt [198]. Die Behandlung von malignen Zellen mit Hilfe einer Kombination von Mek- und PI3K-Inhibitoren könnte bereits bei geringeren Inhibitorkonzentrationen im Vergleich zur Therapie mit einzelnen Inhibitoren effektiver sein. Somit könnten Nebenwirkungen, wie z.B. Zytotoxizität gegenüber gesunden Zellen reduziert werden. Der Einsatz einer Kombinationstherapie aus Mek- und PI3K-Inhibitoren bei IL-6-induzierten Erkrankungen wäre vielversprechend, da im Gegensatz zur Epo-R-vermittelten Signaltransduktion die Phosphorylierung von Gab1 und die damit verbundene Amplifikation der MAPK-Kaskade stark PI3K-abhängig vermittelt wird und so der Einsatz eines PI3K-Inhibitors eine effizientere Therapiestrategie zur Behandlung von IL-6- als von Jak2-V617F- induzierten Krankheiten wäre. Denn die Tyrosin-Phosphorylierung und die damit verbundenen Interaktionen von Gab1 mit Bindungspartnern, wie SHP2, werden in der Epo- und Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion im Vergleich zur IL-6-induzierten Signaltransduktion unterschiedlich reguliert. Durch die Möglichkeit der Interaktion von Gab1 mit dem Epo-R wäre die Tyrosin-Phosphorylierung von der Rekrutierung von Gab1 an die Plasmamembran in der Epo-R vermittelten Signaltransduktion entkoppelt. Dagegen ist die IL-6-induzierte Rekrutierung von Gab1 an PIP3 in der Plasmamembran essentiell für die Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1.

Das *multi-site docking* Protein Gab1 ist sowohl wesentlich an der IL-6- als auch an der Epo- und Jak2-V617F-induzierten Aktivierung der MAPK-Kaskade beteiligt. Die Bedeutung von Gab1 in der IL-6-, Epo- und Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion ist somit für die Aktivierung der MAPK-Kaskade identisch. Nur wird die Gab1-abhängige Amplifikation der IL-6-, Epo- und Jak2-V617F-induzierten MAPK-Kaskade unterschiedlich reguliert. Dies zeigt die Notwendigkeit der Entwicklung unterschiedlicher Behandlungsstrategien von IL-6-, Epo- oder Jak2-V617F-assozierten Krankheiten auf.

6 Ausblick

Aus den in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnissen zur Regulation der Translokation und Phosphorylierung von Gab1 und deren Bedeutung für die Aktivierung der MAPK-Kaskade sowohl in der IL-6- und Epo- als auch in der pathophysiologischen Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion ergeben sich weitere interessante Fragestellungen.

6.1 Gibt es weitere regulatorische intramolekulare Interaktionen oder auch regulatorische intermolekulare Interaktionen in Gab1?

Die intramolekulare Interaktion der N-terminalen PH-Domäne mit den C-terminalen Argininen 556 und 560 in Gab1 wirkt inhibitorisch auf die Translokation von Gab1. Doch welche Aminosäuren in der PH-Domäne von Gab1 interagieren mit den Argininen 556 und 560? Mit Interaktionsstudien mutierter PH-Domänen könnte man die interagierenden Aminosäuren identifizieren. Die intramolekulare Interaktion der PH-Domäne mit dem C-terminalen Abschnitt von Gab1 könnte auch auf intermolekulare Interaktionen von Gab1 mit anderen Bindungspartnern Einfluss haben. Hier wäre interessant, ob Gab1 erst nach Konformationsänderung phosphoryliert wird oder die Phosphorylierung die Konformation von Gab1 verändern kann. Auch könnten die Phosphorylierung von Gab1 und die Rekrutierung von Interaktionspartnern an Gab1 erst eine Konformation in Gab1 induzieren, die es anderen Interaktionspartnern erst möglich macht, an Gab1 zu binden.

6.2 Wie wird die Phosphorylierung von Gab1 reguliert?

In der Epo-R-vermittelten Signaltransduktion ist die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 entkoppelt von der PH-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran. Die Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R könnte diese Entkopplung erklären. In dieser Arbeit konnte die Jak2-V617F-induzierte Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R gezeigt werden. Auch in der Epo-induzierten Signaltransduktion kommt es zur Rekrutierung von Gab1 an den Epo-R [169, 168]. Bisher wurde eine Gab1:Rezeptor Interaktion nur für Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie c-Met oder EGFR beschrieben [199, 104, 122]. Es ist noch unbekannt, wie Gab1 an den Epo-R rekrutiert wird und ob Gab1 an der Plasmamembran oder bereits zytoplasmatisch durch Tyrosinkinasen phosphoryliert wird.

In der HGF-induzierten Signaltransduktion werden einige Tyrosine in Gab1 durch c-Met und andere Tyrosine durch SFKs phosphoryliert [129]. Welche Tyrosinkinasen können also in der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen-vermittelten Signaltransduktion welche Tyrosine in Gab1 phosphorylieren? Welche physiologische Bedeutung hat die Phosphorylierung der einzelnen Gab1-Tyrosine und führt eine Dysregulation der Phosphorylierung einzelner Tyrosine zu einer pathophysiologischen Gab1-abhängigen Signaltransduktion?

6.3 Welche Signalwege werden Gab1-abhängig verstärkt oder verschaltet?

Die PI3K-abhängige Verstärkung der MAPK-Kaskade, die durch Gab1 vermittelt wird, ist eine von mehreren möglichen Gab1-abhängigen Verschaltungen von Signalkaskaden in physiologischen und pathophysiologischen Signaltransduktionsnetzwerken. Die Bindung von Interaktionspartnern an Gab1 ist dabei entscheidend für die Verschaltung von Signalwegen. Welche Interaktionen von Gab1 mit Bindungspartnern sind wichtig für eine physiologische oder pathophysiologische Signalweiterleitung?

Die direkte Bindung von Grb2:SOS an Gab1 hat in der Epo- und Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion keine Bedeutung für die Aktivierung der MAPK-Kaskade. Der Komplex aus Grb2 und SOS kann aber auch indirekt über SHP2 mit Gab1 interagieren. Es ist jedoch unbekannt, ob die indirekte Rekrutierung von Grb2:SOS an Gab1 über

SHP2 einen Einfluss auf die Aktivierung der MAPK-Kaskade hat. So könnten die direkte und indirekte Grb2:SOS Rekrutierung an Gab1 eine zweifache Sicherheit für die Gab1-abhängige Amplifikation der MAPK-Kaskade bedeuten. Eventuell wird so eine höhere Robustheit in der MAPK-Signaltransduktion gegenüber Störungen gewährleistet, die sich in der Evolution für die Physiologie der Zelle durchgesetzt und bewährt hat.

SHP2 hat sowohl als Phosphatase, die die Bindestelle des MAPK-Negativregulators RasGAP in Gab1 dephosphoryliert, als auch als Adapterprotein für die Rekrutierung des Grb2:SOS-Komplexes Einfluss auf die MAPK-Aktivierung. Bisher wurde noch nicht untersucht, ob die Phosphatase- und die Adapter-Funktion von SHP2 notwendig sind, um die Aktivierung der MAPK-Kaskade an Gab1 zu induzieren.

6.4 Welchen Kinetiken folgen die Interaktionen der Bindungspartner von Gab1?

Die Phosphorylierung der Tyrosine in Gab1 und somit die Bindung von Interaktionspartnern an Gab1 sind nicht statisch. Die Bindestellen für Interaktionspartner in Gab1 werden durch Tyrosinkinasen phosphoryliert und durch Phosphatasen dephosphoryliert, wodurch eine dynamische Regulation der Rekrutierung von SH2-Domänen Proteinen an Gab1 hervorgerufen wird. Daher wäre es interessant zu wissen, welche Kinetiken die Gab1-vermittelten Interaktionen haben. Denn noch ist unbekannt, ob z.B. die Interaktion von Gab1 mit SHP2 zeitlich mit der Gab1-abhängigen Amplifikation der MAPK-Kaskade korreliert. Gibt es in den Interaktionskinetiken Unterschiede in der physio- und pathophysiologischen Signaltransduktion, die eventuell auch als therapeutische Ansatzpunkte gezielter Interventionsmöglichkeiten in der Signaltransduktion dienen können?

Auch könnten sich verschiedene Interaktionen an Gab1 untereinander beeinflussen. So könnte die Bindung eines Interaktionspartners, die Bindung oder Dissoziation eines anderen Bindungspartners durch Konformationsänderung in Gab1 begünstigen oder sterisch verhindern.

6.5 Welche Bedeutung haben Gab1-Mutanten in malignen Zellen?

In malignen Zellen wurde eine durch somatische Mutation exprimierte Gab1-Mutante identifiziert, die an der Aminosäureposition 387 verändert ist [200]. Das Threonin an der Aminosäureposition 387 in Gab1 ist auch in Gab2 an der Aminosäureposition 391 konserviert. Die Phosphorylierung des Threonins 391 in Gab2 führt zur Rekrutierung von 14-3-3 an Gab2, wodurch es zur Terminierung der Gab2-abhängigen Signaltransduktion kommt [201]. Auch die Phosphorylierung des Threonins 387 in Gab1 könnte so einen wichtigen negativen *feedback* induzieren, der die Gab1-abhängige Signaltransduktion reguliert. Ist das Threonin 387 durch die Aminosäure Asparagin in der Gab1-Mutante substituiert, kommt es zur Hyperaktivierung Gab1-abhängiger Signalkaskaden und zur Entstehung von Mammakarzinomen [200]. Auch die Phosphorylierung des Tyrosins 317 in Gab1 induziert einen wichtigen negativen *feedback*. Die Bindung von RasGAP an das phosphorylierte Tyrosin 317 in Gab1 wirkt negativ auf die MAPK-Aktivierung [135]. Eine Störung der Interaktion von RasGAP und Gab1 könnte auch eine Hyperaktivierung der Gab1-abhängigen Signaltransduktion bewirken. So könnte auch die Y317F Gab1 Mutante, an die kein RasGAP bindet oder eine andere Gab1-Mutanten bei der Entstehung von Karzinomen beteiligt sein.

Das bessere Verständnis der Komplexität der Regulation der Gab1-vermittelten Verstärkung und Verschaltung von Signalkaskaden ermöglicht es die pathophysiologischen molekularen Mechanismen bei der Entstehung von Krankheiten, wie myeloproliferativen Neoplasien, Leukämien oder soliden Tumoren zu entschlüsseln. Die Entschlüsselung kann

weiterhin zur Entwicklung von neuen Therapien, die gegen diese pathophysiologischen Mechanismen gezielt wirken und idealerweise gleichzeitig eine physiologische Signaltransduktion wieder herstellen können, beitragen.

7 Zusammenfassung

Das *multi-site docking* Protein *Grb2-associated-binding protein 1* (Gab1) verschaltet durch die Rekrutierung von *SH2-domain-containing tyrosine phosphatase 2* (SHP2), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und dem *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2): *son of sevenless* (SOS)-Komplex die *mitogen activated protein kinase* (MAPK)- und PI3K-Kaskade miteinander. Der an Gab1 gebundene Grb2:SOS-Komplex oder die PI3-Kinase wirken auf Plasmamembran-assoziiertes *Rat sarcoma* (Ras) bzw. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in der Plasmamembran. Die Lokalisation von Gab1 und seinen Interaktionspartnern an der Plasmamembran ist daher von entscheidender Bedeutung für die Vermittlung der Gab1-abhängigen Signalkaskaden. Die Regulation der Translokation von Gab1 an die Plasmamembran ist somit ein wichtiger Mechanismus zur räumlichen und zeitlichen Kontrolle der Gab1-abhängigen Signalkaskaden.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Translokation von Gab1 an die Plasmamembran durch einen intramolekularen Klappmechanismus reguliert wird. Die N-terminale Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne in Gab1 interagiert mit den Argininen 556 und 560 im C-terminalen Abschnitt von Gab1. Nach Phosphorylierung des Serins 552 ist diese intramolekulare Interaktion gestört und die PH-Domäne wird exponiert. Erst in dieser Konformation kann die PH-Domäne mit der Plasmamembran interagieren.

Hämatopoetische Zellen, die die myeloproliferative Neoplasien (MPN) assoziierte und konstitutiv aktive Janus Kinase 2 (Jak2) Mutante Jak2-V617F exprimieren, proliferieren durch die konstitutive Aktivierung der *signal transducer and activator of transcription* (STAT)- und MAPK-Kaskade Zytokin-unabhängig. Diese MPN-assoziierte Proliferation hämatopoetischer Zellen führt u.a. zu Gefäß- und Organerkrankungen. In Jak2-V617F positiven Zellen wurde eine fehlregulierte Gab1 Translokation und Phosphorylierung beobachtet. Doch ob und wie Gab1 Einfluss auf die dysregulierte und MPN-assoziierte Jak2-V617F-Signaltransduktion nimmt, ist bisher unbekannt.

Hier konnte gezeigt werden, dass Gab1 die Jak2-V617F-induzierte Aktivierung der proliferativ wirkenden MAPK-Kaskade in und die Proliferation von erythroleukämischen (HEL) Zellen verstärkt. Neben der MAPK-abhängigen Phosphorylierung des Serins 552 induziert die Expression von Jak2-V617F die zytokin-unabhängige Translokation von Gab1 an die Plasmamembran, die Phosphorylierung des Tyrosins 627 in Gab1 und die Rekrutierung von SHP2 an das phosphorylierte Tyrosin 627. Die Rekrutierung von SHP2 an Gab1 ist essentiell für die Jak2-V617F- und Erythropoetin (Epo)-induzierte Aktivierung der MAPK-Kaskade.

In der Epo- und Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion ist die Vermittlung der Phosphorylierung des Gab1-Tyrosins 627 und die Interaktion mit SHP2 entkoppelt von der Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1 und von der PH-Domänen-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran. Die bisher unbekannt Interaktion von Gab1 mit dem Erythropoetin-Rezeptor (Epo-R) stellt einen möglichen Rekrutierungsmechanismus dar, durch den Gab1 in die räumliche Nähe der rezeptor-assoziierten Jak2 bzw. Jak2-V617F rekrutiert und somit phosphoryliert wird.

Im Gegensatz zur Epo- bzw. Jak2-V617F-induzierten Signaltransduktion ist die Phosphorylierung des Tyrosins 627 von Gab1 in der IL-6-induzierten Signaltransduktion abhängig von der MAPK-induzierten Phosphorylierung des Serins 552 in Gab1. Die Stärke der IL-6-induzierten Aktivierung der MAPK-Kaskade ist wiederum von der Expression des *multi-site docking* Proteins Gab1 abhängig.

So ist die Regulation der PH-Domänen-vermittelten Translokation von Gab1 an die Plasmamembran und die Bedeutung von Gab1 für die Amplifikation der MAPK-Kaskade in der Epo-, Jak2-V617F- und in der IL-6-induzierten Signaltransduktion identisch. Aber die Tyrosin-Phosphorylierung von Gab1 wird unterschiedlich und abhängig vom an der Signaltransduktion beteiligten Zytokin-Rezeptor vermittelt.

8 Summary

The multi-site docking protein Grb2-associated-binding protein 1 (Gab1) recruits SH2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 (SHP2), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2): son of sevenless (SOS) complex. Gab1 bound Grb2:SOS complex or PI3K act on rat sarcoma (Ras) or on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) in the plasmamembrane, respectively. Gab1 localization at the plasmamembrane is a prerequisite to mediate Gab1 dependent signaling cascades like mitogen activated protein kinase (MAPK)- and PI3K. Therefore, regulation of Gab1 translocation to the plasmamembrane is an essential mechanism to control Gab1 dependent signaling.

Here, it was shown, that translocation of Gab1 to the plasmamembrane is regulated by a switch-like mechanism. The N-terminal pleckstrin homology (PH) domain of Gab1 interacts with two arginines located in amino acid positions 556 and 560 in Gab1. Depending on serine 552 phosphorylation, the intramolecular interaction is abrogated enabling the PH domain to interact with phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) in the plasmamembrane.

Hematopoietic cells expressing the myeloproliferative neoplasm (MPN) associated and constitutively active Janus kinase 2 (Jak2) mutant Jak2-V617F proliferate in a cytokine-independent manner. Such a MPN-associated proliferation of hematopoietic cells is caused by permanent activation of signal transducer and activator of transcription (STAT)- and MAPK-signaling in Jak2-V617F positive cells and contributes i.a. to development of vessel and organ damage. In Jak2-V617F-positive cells, dysregulated Gab1 translocation and phosphorylation has been observed. It is unknown, whether Gab1 translocation to the plasmamembrane and Gab1 phosphorylation contribute to dysregulated and MPN-associated Jak2-V617F signal transduction.

Here, we could demonstrate, that Gab1 enhances Jak2-V617F induced activation of the pro-proliferative associated MAPK pathway in and proliferation of erythroleukaemia (HEL) cells. This indicates for the important role of Gab1 in promoting MPN-associated cell proliferation. Jak2-V617F induced MAPK activation leads to phosphorylation of serine 552 in Gab1 and translocation of Gab1 to the plasmamembrane. Jak2-V617F expression also induces phosphorylation of tyrosine residue 627 in Gab1. Phosphorylated tyrosine 627 in Gab1 serves as binding site for SHP2. Blocking SHP2 recruitment to Gab1 reduces Jak2-V617F induced MAPK activation. Also Erythropoietin (Epo)-dependent MAPK activation in Jak2-WT expressing cells depends on tyrosine 627 phosphorylation of Gab1. Therefore, complex formation of Gab1 and SHP2 is essential for the enhancement of MAPK activation in Erythropoietin receptor (Epo-R) mediated signaling.

For Epo- and Jak2-V617F induced signaling, phosphorylation of Gab1 tyrosine residue 627 does neither depend on phosphorylation of serine 552 in Gab1 nor on the interaction of Gab1 with PIP3 at the plasmamembrane. The so far unknown interaction of Gab1 with the Epo-R is a possible mechanism in recruiting Gab1 into close proximity to Epo-R associated Jak2-V617F. Recruited to the Epo-R, Gab1 could be phosphorylated by Jak2-V617F.

Interleukin-6 (IL-6)-induced MAPK-activation is essential for serine 552 phosphorylation in Gab1. However, and in contrast to Epo- and Jak2-V617F-induced signaling, IL-6-induced phosphorylation of Gab1 tyrosine 627 depends on MAPK-induced translocation of Gab1 to the plasmamembrane. Furthermore, strength of IL-6-induced MAPK activation strongly depends on Gab1 expression.

Taken together, regulation of PH-domain-mediated plasmamembrane translocation of Gab1 and Gab1 dependent MAPK amplification take place in Epo-, Jak2-V617F- and in IL-6-induced signaling. But, Gab1 tyrosine phosphorylation is mediated differently in a cytokine-receptor dependent manner.

9 Literatur

- [1] LOMBARDERO, M. ; KOVACS, K. ; SCHEITHAUER, B. W.: Erythropoietin: a hormone with multiple functions. In: *Pathobiology* 78 (2011), Nr. 1, 41–53
- [2] LAPPIN, T. R. ; MAXWELL, A. P. ; JOHNSTON, P. G.: EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions. In: *Stem Cells* 20 (2002), Nr. 6, 485–492
- [3] RICHMOND, T. D. ; CHOCHAN, M. ; BARBER, D. L.: Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. In: *Trends Cell Biol* 15 (2005), Mar, Nr. 3, 146–155
- [4] TOBU, M. ; IQBAL, O. ; FAREED, D. ; CHATHA, M. ; HOPPENSTEADT, D. ; BANSAL, V. ; FAREED, J.: Erythropoietin-induced thrombosis as a result of increased inflammation and thrombin activatable fibrinolytic inhibitor. In: *Clin Appl Thromb Hemost* 10 (2004), Jul, Nr. 3, S. 225–232
- [5] WESTENFELDER, C. ; BARANOWSKI, R. L.: Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. In: *Kidney Int* 58 (2000), Aug, Nr. 2, 647–657
- [6] RIBATTI, D. ; PRESTA, M. ; VACCA, A. ; RIA, R. ; GIULIANI, R. ; DELL'ERA, P. ; NICO, B. ; RONCALI, L. ; DAMMACCO, F.: Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. In: *Blood* 93 (1999), Apr, Nr. 8, S. 2627–2636
- [7] LI, J. ; VESEY, D. A. ; JOHNSON, D. W. ; GOBE, G.: Erythropoietin reduces cisplatin-induced apoptosis in renal carcinoma cells via a PKC dependent pathway. In: *Cancer Biol Ther* 6 (2007), Dec, Nr. 12, S. 1944–1950
- [8] SCHOLZ, H. ; SCHUREK, H. J. ; ECKARDT, K. U. ; BAUER, C.: Role of erythropoietin in adaptation to hypoxia. In: *Experientia* 46 (1990), Dec, Nr. 11-12, S. 1197–1201
- [9] LIVNAH, O. ; STURA, E. A. ; JOHNSON, D. L. ; MIDDLETON, S. A. ; MULCAHY, L. S. ; WRIGHTON, N. C. ; DOWER, W. J. ; JOLLIFFE, L. K. ; WILSON, I. A.: Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å. In: *Science* 273 (1996), Jul, Nr. 5274, S. 464–471
- [10] SYED, R. S. ; REID, S. W. ; LI, C. ; CHEETHAM, J. C. ; AOKI, K. H. ; LIU, B. ; ZHAN, H. ; OSSLUND, T. D. ; CHIRINO, A. J. ; ZHANG, J. ; FINER-MOORE, J. ; ELLIOTT, S. ; SITNEY, K. ; KATZ, B. A. ; MATTHEWS, D. J. ; WENDOLOSKI, J. J. ; EGRIE, J. ; STROUD, R. M.: Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. In: *Nature* 395 (1998), Oct, Nr. 6701, 511–516
- [11] YOSHIMURA, A. ; ZIMMERS, T. ; NEUMANN, D. ; LONGMORE, G. ; YOSHIMURA, Y. ; LODISH, H. F.: Mutations in the Trp-Ser-X-Trp-Ser motif of the erythropoietin receptor abolish processing, ligand binding, and activation of the receptor. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Jun, Nr. 16, S. 11619–11625
- [12] HILTON, D. J. ; WATOWICH, S. S. ; KATZ, L. ; LODISH, H. F.: Saturation mutagenesis of the WSXWS motif of the erythropoietin receptor. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Mar, Nr. 9, S. 4699–4708
- [13] LIVNAH, O. ; STURA, E. A. ; MIDDLETON, S. A. ; JOHNSON, D. L. ; JOLLIFFE, L. K. ; WILSON, I. A.: Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. In: *Science* 283 (1999), Feb, Nr. 5404, S. 987–990

- [14] KUBATZKY, K. F. ; RUAN, W. ; GUREZKA, R. ; COHEN, J. ; KETTELER, R. ; WATOWICH, S. S. ; NEUMANN, D. ; LANGOSCH, D. ; KLINGMÜLLER, U.: Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. In: *Curr Biol* 11 (2001), Jan, Nr. 2, S. 110–115
- [15] PELLETIER, S. ; GINGRAS, S. ; FUNAKOSHI-TAGO, M. ; HOWELL, S. ; IHLE, J. N.: Two domains of the erythropoietin receptor are sufficient for Jak2 binding/activation and function. In: *Mol Cell Biol* 26 (2006), Nov, Nr. 22, 8527–8538
- [16] WILSON, I. A. ; JOLLIFFE, L. K.: The structure, organization, activation and plasticity of the erythropoietin receptor. In: *Curr Opin Struct Biol* 9 (1999), Dec, Nr. 6, S. 696–704
- [17] HEINRICH, P. C. ; BEHRMANN, I. ; HAAN, S. ; HERMANN, H. M. ; MÜLLER-NEUEN, G. ; SCHAPER, F.: Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. In: *Biochem J* 374 (2003), Aug, Nr. Pt 1, 1–20
- [18] PETERS, M. ; MÜLLER, A. M. ; ROSE-JOHN, S.: Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. In: *Blood* 92 (1998), Nov, Nr. 10, S. 3495–3504
- [19] YAMANAKA, Y. ; NAKAJIMA, K. ; FUKADA, T. ; HIBI, M. ; HIRANO, T.: Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation. In: *EMBO J* 15 (1996), Apr, Nr. 7, S. 1557–1565
- [20] SCHIRMACHER, P. ; PETERS, M. ; CILIBERTO, G. ; BLESSING, M. ; LOTZ, J. ; MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K. H. ; ROSE-JOHN, S.: Hepatocellular hyperplasia, plasmacytoma formation, and extramedullary hematopoiesis in interleukin (IL)-6/soluble IL-6 receptor double-transgenic mice. In: *Am J Pathol* 153 (1998), Aug, Nr. 2, 639–648
- [21] VAN SNICK, J.: Interleukin-6: an overview. In: *Annu Rev Immunol* 8 (1990), 253–278
- [22] KAMIMURA, D. ; ISHIHARA, K. ; HIRANO, T.: IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. In: *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149 (2003), 1–38
- [23] REYNAUD, D. ; PIETRAS, E. ; BARRY-HOLSON, K. ; MIR, A. ; BINNEWIES, M. ; JEANNE, M. ; SALA-TORRA, O. ; RADICH, J. P. ; PASSEGUÉ, E.: IL-6 controls leukemic multipotent progenitor cell fate and contributes to chronic myelogenous leukemia development. In: *Cancer cell* 20 (2011), Nov, S. 661–673
- [24] XU, Y. ; KERSHAW, N. J. ; LUO, C. S. ; SOO, P. ; POCOCK, M. J. ; CZABOTAR, P. E. ; HILTON, D. J. ; NICOLA, N. A. ; GARRETT, T. P. J. ; ZHANG, J.-G.: Crystal structure of the entire ectodomain of gp130: insights into the molecular assembly of the tall cytokine receptor complexes. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (2010), Jul, S. 21214–21218
- [25] BOULANGER, M. J. ; GARCIA, K. C.: Shared cytokine signaling receptors: structural insights from the gp130 system. In: *Advances in protein chemistry* 68 (2004), S. 107–146
- [26] TAGA, T. ; HIBI, M. ; HIRATA, Y. ; YAMASAKI, K. ; YASUKAWA, K. ; MATSUDA, T. ; HIRANO, T. ; KISHIMOTO, T.: Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. In: *Cell* 58 (1989), Aug, Nr. 3, S. 573–581

- [27] LÜTTICKEN, C. ; WEGENKA, U. M. ; YUAN, J. ; BUSCHMANN, J. ; SCHINDLER, C. ; ZIEMIECKI, A. ; HARPUR, A. G. ; WILKS, A. F. ; YASUKAWA, K. ; TAGA, T.: Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. In: *Science* 263 (1994), Jan, Nr. 5143, S. 89–92
- [28] NARAZAKI, M. ; WITTHUHN, B. A. ; YOSHIDA, K. ; SILVENNOINEN, O. ; YASUKAWA, K. ; IHLE, J. N. ; KISHIMOTO, T. ; TAGA, T.: Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1994), Mar, S. 2285–2289
- [29] GUSCHIN, D. ; ROGERS, N. ; BRISCOE, J. ; WITTHUHN, B. ; WATLING, D. ; HORN, F. ; PELLEGRINI, S. ; YASUKAWA, K. ; HEINRICH, P. ; STARK, G. R.: A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. In: *The EMBO journal* 14 (1995), Apr, S. 1421–1429
- [30] BOULANGER, M. J. ; CHOW, D.-c. ; BREVNOVA, E. E. ; GARCIA, K. C.: Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. In: *Science* 300 (2003), Jun, Nr. 5628, 2101–2104
- [31] GIESE, B. ; RODERBURG, C. ; SOMMERAUER, M. ; WORTMANN, S. B. ; METZ, S. ; HEINRICH, P. C. ; MÜLLER-NEWEN, G.: Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. In: *J Cell Sci* 118 (2005), Nov, Nr. Pt 21, 5129–5140
- [32] GRÖTZINGER, J. ; KERNEBECK, T. ; KALLEN, K. J. ; ROSE-JOHN, S.: IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both? In: *Biol Chem* 380 (1999), Nr. 7-8, 803–813
- [33] MURAKAMI, M. ; HIBI, M. ; NAKAGAWA, N. ; NAKAGAWA, T. ; YASUKAWA, K. ; YAMANISHI, K. ; TAGA, T. ; KISHIMOTO, T.: IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. In: *Science* 260 (1993), Jun, Nr. 5115, S. 1808–1810
- [34] WALLWEBER, H. J. A. ; TAM, C. ; FRANKE, Y. ; STAROVASNIK, M. A. ; LUPARDUS, P. J.: Structural basis of recognition of interferon- α receptor by tyrosine kinase 2. In: *Nat Struct Mol Biol* 21 (2014), May, Nr. 5, 443–448
- [35] KOHLHUBER, F. ; ROGERS, N. C. ; WATLING, D. ; FENG, J. ; GUSCHIN, D. ; BRISCOE, J. ; WITTHUHN, B. A. ; KOTENKO, S. V. ; PESTKA, S. ; STARK, G. R. ; IHLE, J. N. ; KERR, I. M.: A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. In: *Mol Cell Biol* 17 (1997), Feb, Nr. 2, S. 695–706
- [36] HAAN, C. ; KREIS, S. ; MARGUE, C. ; BEHRMANN, I.: Jaks and cytokine receptors—an intimate relationship. In: *Biochem Pharmacol* 72 (2006), Nov, Nr. 11, 1538–1546
- [37] WITTHUHN, B. A. ; QUELLE, F. W. ; SILVENNOINEN, O. ; YI, T. ; TANG, B. ; MIURA, O. ; IHLE, J. N.: JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. In: *Cell* 74 (1993), Jul, Nr. 2, S. 227–236
- [38] KIM, H. ; BAUMANN, H.: Transmembrane domain of gp130 contributes to intracellular signal transduction in hepatic cells. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (1997), Dezember, S. 30741–30747

- [39] UNGUREANU, D. ; WU, J. ; PEKKALA, T. ; NIRANJAN, Y. ; YOUNG, C. ; JENSEN, O. N. ; XU, C.-F. ; NEUBERT, T. A. ; SKODA, R. C. ; HUBBARD, S. R. ; SILVENNOINEN, O.: The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. In: *Nat Struct Mol Biol* 18 (2011), Sep, Nr. 9, 971–976
- [40] BANDARANAYAKE, R. M. ; UNGUREANU, D. ; SHAN, Y. ; SHAW, D. E. ; SILVENNOINEN, O. ; HUBBARD, S. R.: Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. In: *Nature structural & molecular biology* 19 (2012), Aug, S. 754–759
- [41] LUPARDUS, P. J. ; ULTSCH, M. ; WALLWEBER, H. ; BIR KOHLI, P. ; JOHNSON, A. R. ; EIGENBROT, C.: Structure of the pseudokinase-kinase domains from protein kinase TYK2 reveals a mechanism for Janus kinase (JAK) autoinhibition. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (2014), Jun, Nr. 22, 8025–8030
- [42] SAHARINEN, P. ; SILVENNOINEN, O.: The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Dec, Nr. 49, 47954–47963
- [43] CHATTI, K. ; FARRAR, W. L. ; DUHÉ, R. J.: Tyrosine phosphorylation of the Janus kinase 2 activation loop is essential for a high-activity catalytic state but dispensable for a basal catalytic state. In: *Biochemistry* 43 (2004), Apr, Nr. 14, 4272–4283
- [44] FENG, J. ; WITTHUHN, B. A. ; MATSUDA, T. ; KOHLHUBER, F. ; KERR, I. M. ; IHLE, J. N.: Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. In: *Molecular and cellular biology* 17 (1997), Mai, S. 2497–2501
- [45] RANE, S. G. ; REDDY, E. P.: Janus kinases: components of multiple signaling pathways. In: *Oncogene* 19 (2000), Nov, Nr. 49, 5662–5679
- [46] JAMES, C. ; UGO, V. ; LE COUÉDIC, J.-P. ; STAERK, J. ; DELHOMMEAU, F. ; LACOUT, C. ; GARÇON, L. ; RASLOVA, H. ; BERGER, R. ; BENNACEUR-GRISCELLI, A. ; VILLEVAL, J. L. ; CONSTANTINESCU, S. N. ; CASADEVALL, N. ; VAINCHENKER, W.: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. In: *Nature* 434 (2005), Apr, Nr. 7037, 1144–1148
- [47] SAHARINEN, P. ; VIHINEN, M. ; SILVENNOINEN, O.: Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. In: *Mol Biol Cell* 14 (2003), Apr, Nr. 4, 1448–1459
- [48] SHAN, Y. ; GNANASAMBANDAN, K. ; UNGUREANU, D. ; KIM, E. T. ; HAMMARÉN, H. ; YAMASHITA, K. ; SILVENNOINEN, O. ; SHAW, D. E. ; HUBBARD, S. R.: Molecular basis for pseudokinase-dependent autoinhibition of JAK2 tyrosine kinase. In: *Nat Struct Mol Biol* 21 (2014), Jul, Nr. 7, 579–584
- [49] VAINCHENKER, W. ; CONSTANTINESCU, S. N.: JAK/STAT signaling in hematological malignancies. In: *Oncogene* 32 (2013), May, Nr. 21, 2601–2613
- [50] ZHAO, R. ; XING, S. ; LI, Z. ; FU, X. ; LI, Q. ; KRANTZ, S. B. ; ZHAO, Z. J.: Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. In: *J Biol Chem* 280 (2005), Jun, Nr. 24, 22788–22792

- [51] BAXTER, E. J. ; SCOTT, L. M. ; CAMPBELL, P. J. ; EAST, C. ; FOUROUCLAS, N. ; SWANTON, S. ; VASSILIOU, G. S. ; BENCH, A. J. ; BOYD, E. M. ; CURTIN, N. ; SCOTT, M. A. ; ERBER, W. N. ; GREEN, A. R. ; , C. G. P.: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. In: *Lancet* 365 (2005), Nr. 9464, S. 1054–1061
- [52] LEVINE, R. L. ; WADLEIGH, M. ; COOLS, J. ; EBERT, B. L. ; WERNIG, G. ; HUNTLY, B. J. P. ; BOGGON, T. J. ; WLODARSKA, I. ; CLARK, J. J. ; MOORE, S. ; ADELSPERGER, J. ; KOO, S. ; LEE, J. C. ; GABRIEL, S. ; MERCHER, T. ; D'ANDREA, A. ; FRÖHLING, S. ; DÖHNER, K. ; MARYNEN, P. ; VANDENBERGHE, P. ; MESA, R. A. ; TEFFERI, A. ; GRIFFIN, J. D. ; ECK, M. J. ; SELLERS, W. R. ; MEYERSON, M. ; GOLUB, T. R. ; LEE, S. J. ; GILLILAND, D. G.: Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. In: *Cancer Cell* 7 (2005), Apr, Nr. 4, 387–397
- [53] KRALOVICS, R. ; PASSAMONTI, F. ; BUSER, A. S. ; TEO, S.-S. ; TIEDT, R. ; PASSWEG, J. R. ; TICHELLI, A. ; CAZZOLA, M. ; SKODA, R. C.: A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. In: *N Engl J Med* 352 (2005), Apr, Nr. 17, 1779–1790
- [54] HOFFMAN, R. ; PRCHAL, J. T. ; SAMUELSON, S. ; CIUREA, S. O. ; RONDELLI, D.: Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative disorders: biology and treatment. In: *Biol Blood Marrow Transplant* 13 (2007), Jan, Nr. 1 Suppl 1, 64–72
- [55] KOPPIKAR, P. ; BHAGWAT, N. ; KILPIVAARA, O. ; MANSHOURI, T. ; ADLI, M. ; HRICIK, T. ; LIU, F. ; SAUNDERS, L. M. ; MULLALLY, A. ; ABDEL-WAHAB, O. ; LEUNG, L. ; WEINSTEIN, A. ; MARUBAYASHI, S. ; GOEL, A. ; GÖNEN, M. ; ESTROV, Z. ; EBERT, B. L. ; CHIOSIS, G. ; NIMER, S. D. ; BERNSTEIN, B. E. ; VERSTOVSEK, S. ; LEVINE, R. L.: Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. In: *Nature* 489 (2012), Sep, Nr. 7414, 155–159
- [56] IHLE, J. N.: The Janus protein tyrosine kinases in hematopoietic cytokine signaling. In: *Semin Immunol* 7 (1995), Aug, Nr. 4, 247–254
- [57] TAKEDA, K. ; AKIRA, S.: STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. In: *Cytokine & growth factor reviews* 11 (2000), Sep, S. 199–207
- [58] WOJCHOWSKI, D. M. ; GREGORY, R. C. ; MILLER, C. P. ; PANDIT, A. K. ; PIRCHER, T. J.: Signal transduction in the erythropoietin receptor system. In: *Exp Cell Res* 253 (1999), Nov, Nr. 1, 143–156
- [59] HEINRICH, P. C. ; BEHRMANN, I. ; MÜLLER-NEWEN, G. ; SCHAPER, F. ; GRAEVE, L.: Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. In: *Biochem J* 334 (Pt 2) (1998), Sep, S. 297–314
- [60] STAHL, N. ; FARRUGGELLA, T. J. ; BOULTON, T. G. ; ZHONG, Z. ; DARNELL, J. Jr ; YANCOPOULOS, G. D.: Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. In: *Science* 267 (1995), Mar, Nr. 5202, S. 1349–1353
- [61] AKIRA, S. ; NISHIO, Y. ; INOUE, M. ; WANG, X. J. ; WEI, S. ; MATSUSAKA, T. ; YOSHIDA, K. ; SUDO, T. ; NARUTO, M. ; KISHIMOTO, T.: Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor

- involved in the gp130-mediated signaling pathway. In: *Cell* 77 (1994), Apr, Nr. 1, S. 63–71
- [62] FANG, J. ; MENON, M. ; KAPELLE, W. ; BOGACHEVA, O. ; BOGACHEV, O. ; HOUDE, E. ; BROWNE, S. ; SATHYANARAYANA, P. ; WOJCHOWSKI, D. M.: EPO modulation of cell-cycle regulatory genes, and cell division, in primary bone marrow erythroblasts. In: *Blood* 110 (2007), Oct, Nr. 7, 2361–2370
- [63] SILVA, M. ; BENITO, A. ; SANZ, C. ; PROSPER, F. ; EKHTERAEE, D. ; NUÑEZ, G. ; FERNANDEZ-LUNA, J. L.: Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Aug, Nr. 32, S. 22165–22169
- [64] SOCOLOVSKY, M. ; FALLON, A. E. ; WANG, S. ; BRUGNARA, C. ; LODISH, H. F.: Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. In: *Cell* 98 (1999), Jul, Nr. 2, S. 181–191
- [65] JURA, J. ; WEGRZYN, P. ; KOROSTYNSKI, M. ; GUZIK, K. ; OCZKO-WOJCIECHOWSKA, M. ; JARZAB, M. ; KOWALSKA, M. ; PIECHOTA, M. ; PRZEWOLOCKI, R. ; KOJ, A.: Identification of interleukin-1 and interleukin-6-responsive genes in human monocyte-derived macrophages using microarrays. In: *Biochim Biophys Acta* 1779 (2008), Nr. 6-7, 383–389
- [66] BARRÉ, B. ; VIGNERON, A. ; COQUERET, O.: The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter. In: *J Biol Chem* 280 (2005), Apr, Nr. 16, 15673–15681
- [67] NAKA, T. ; NARAZAKI, M. ; HIRATA, M. ; MATSUMOTO, T. ; MINAMOTO, S. ; AONO, A. ; NISHIMOTO, N. ; KAJITA, T. ; TAGA, T. ; YOSHIZAKI, K. ; AKIRA, S. ; KISHIMOTO, T.: Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. In: *Nature* 387 (1997), Jun, Nr. 6636, 924–929
- [68] YOSHIMURA, A. ; NAKA, T. ; KUBO, M.: SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. In: *Nat Rev Immunol* 7 (2007), Jun, Nr. 6, 454–465
- [69] JEGALIAN, A. G. ; WU, H.: Differential roles of SOCS family members in EpoR signal transduction. In: *J Interferon Cytokine Res* 22 (2002), Aug, Nr. 8, 853–860
- [70] YASUKAWA, H. ; MISAWA, H. ; SAKAMOTO, H. ; MASUHARA, M. ; SASAKI, A. ; WAKIOKA, T. ; OHTSUKA, S. ; IMAIZUMI, T. ; MATSUDA, T. ; IHLE, J. N. ; YOSHIMURA, A.: The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. In: *EMBO J* 18 (1999), Mar, Nr. 5, 1309–1320
- [71] SASAKI, A. ; YASUKAWA, H. ; SHOUDA, T. ; KITAMURA, T. ; DIKIC, I. ; YOSHIMURA, A.: CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Sep, Nr. 38, 29338–29347
- [72] SCHMITZ, J. ; WEISSENBACH, M. ; HAAN, S. ; HEINRICH, P. C. ; SCHAPER, F.: SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Apr, Nr. 17, S. 12848–12856
- [73] RUI, L. ; YUAN, M. ; FRANTZ, D. ; SHOELSON, S. ; WHITE, M. F.: SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nov, Nr. 44, 42394–42398

- [74] KERSHAW, N. J. ; LAKTYUSHIN, A. ; NICOLA, N. A. ; BABON, J. J.: Reconstruction of an active SOCS3-based E3 ubiquitin ligase complex in vitro: identification of the active components and JAK2 and gp130 as substrates. In: *Growth Factors* 32 (2014), Feb, Nr. 1, 1–10
- [75] YOSHIMURA, A. ; YASUKAWA, H.: JAK's SOCS: a mechanism of inhibition. In: *Immunity* 36 (2012), Feb, Nr. 2, 157–159
- [76] QUELLE, F. W. ; WANG, D. ; NOSAKA, T. ; THIERFELDER, W. E. ; STRAVOPODIS, D. ; WEINSTEIN, Y. ; IHLE, J. N.: Erythropoietin induces activation of Stat5 through association with specific tyrosines on the receptor that are not required for a mitogenic response. In: *Mol Cell Biol* 16 (1996), Apr, Nr. 4, S. 1622–1631
- [77] YOSHIMURA, A.: The CIS family: negative regulators of JAK-STAT signaling. In: *Cytokine Growth Factor Rev* 9 (1998), Nr. 3-4, S. 197–204
- [78] MATSUMOTO, A. ; MASUHARA, M. ; MITSUI, K. ; YOKOUCHI, M. ; OHTSUBO, M. ; MISAWA, H. ; MIYAJIMA, A. ; YOSHIMURA, A.: CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. In: *Blood* 89 (1997), May, Nr. 9, S. 3148–3154
- [79] FUNAKOSHI-TAGO, M. ; MORIWAKI, T. ; UEDA, F. ; TAMURA, H. ; KASAHARA, T. ; TAGO, K.: Phosphorylated CIS suppresses the Epo or JAK2 V617F mutant-triggered cell proliferation through binding to EpoR. In: *Cellular signalling* 31 (2017), Februar, S. 41–57
- [80] YI, T. L. ; CLEVELAND, J. L. ; IHLE, J. N.: Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. In: *Mol Cell Biol* 12 (1992), Feb, Nr. 2, S. 836–846
- [81] FREEMAN, R. Jr ; PLUTZKY, J. ; NEEL, B. G.: Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992), Dec, Nr. 23, S. 11239–11243
- [82] KLINGMÜLLER, U. ; LORENZ, U. ; CANTLEY, L. C. ; NEEL, B. G. ; LODISH, H. F.: Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. In: *Cell* 80 (1995), Mar, Nr. 5, S. 729–738
- [83] JIAO, H. ; BERRADA, K. ; YANG, W. ; TABRIZI, M. ; PLATANIAS, L. C. ; YI, T.: Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. In: *Mol Cell Biol* 16 (1996), Dec, Nr. 12, S. 6985–6992
- [84] BARFORD, D. ; NEEL, B. G.: Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. In: *Structure* 6 (1998), Mar, Nr. 3, S. 249–254
- [85] HOF, P. ; PLUSKEY, S. ; DHE-PAGANON, S. ; ECK, M. J. ; SHOELSON, S. E.: Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. In: *Cell* 92 (1998), Feb, Nr. 4, S. 441–450
- [86] TAUCHI, T. ; DAMEN, J. E. ; TOYAMA, K. ; FENG, G. S. ; BROXMEYER, H. E. ; KRYSTAL, G.: Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis. In: *Blood* 87 (1996), Jun, Nr. 11, S. 4495–4501

- [87] LU, W. ; SHEN, K. ; COLE, P. A.: Chemical dissection of the effects of tyrosine phosphorylation of SHP-2. In: *Biochemistry* 42 (2003), May, Nr. 18, 5461–5468
- [88] YIN, T. ; SHEN, R. ; FENG, G. S. ; YANG, Y. C.: Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Jan, Nr. 2, S. 1032–1037
- [89] KIM, D. J. ; TREMBLAY, M. L. ; DIGIOVANNI, J.: Protein tyrosine phosphatases, TC-PTP, SHP1, and SHP2, cooperate in rapid dephosphorylation of Stat3 in keratinocytes following UVB irradiation. In: *PLoS One* 5 (2010), Nr. 4, e10290
- [90] WU, T. R. ; HONG, Y. K. ; WANG, X.-D. ; LING, M. Y. ; DRAGOI, A. M. ; CHUNG, A. S. ; CAMPBELL, A. G. ; HAN, Z.-Y. ; FENG, G.-S. ; CHIN, Y. E.: SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Dec, Nr. 49, 47572–47580
- [91] NEEL, B. G. ; GU, H. ; PAO, L.: The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. In: *Trends Biochem Sci* 28 (2003), Jun, Nr. 6, 284–293
- [92] KON-KOZLOWSKI, M. ; PANI, G. ; PAWSON, T. ; SIMINOVITCH, K. A.: The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Feb, Nr. 7, S. 3856–3862
- [93] FUKADA, T. ; HIBI, M. ; YAMANAKA, Y. ; TAKAHASHI-TEZUKA, M. ; FUJITANI, Y. ; YAMAGUCHI, T. ; NAKAJIMA, K. ; HIRANO, T.: Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. In: *Immunity* 5 (1996), Nov, Nr. 5, S. 449–460
- [94] MIURA, K. ; WAKAYAMA, Y. ; TANINO, M. ; ORBA, Y. ; SAWA, H. ; HATAKEYAMA, M. ; TANAKA, S. ; SABE, H. ; MOCHIZUKI, N.: Involvement of EphA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of extracellular signal-regulated kinase. In: *Oncogene* 32 (2013), Nov, Nr. 45, 5292–5301
- [95] LORENZ, U.: SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels. In: *Immunol Rev* 228 (2009), Mar, Nr. 1, 342–359
- [96] VOGEL, W. ; LAMMERS, R. ; HUANG, J. ; ULLRICH, A.: Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. In: *Science* 259 (1993), Mar, Nr. 5101, S. 1611–1614
- [97] BARBER, D. L. ; CORLESS, C. N. ; XIA, K. ; ROBERTS, T. M. ; D'ANDREA, A. D.: Erythropoietin activates Raf1 by an Shc-independent pathway in CTLL-EPO-R cells. In: *Blood* 89 (1997), Jan, Nr. 1, S. 55–64
- [98] CHANG, F. ; STEELMAN, L. S. ; LEE, J. T. ; SHELTON, J. G. ; NAVOLANIC, P. M. ; BLALOCK, W. L. ; FRANKLIN, R. A. ; MCCUBREY, J. A.: Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. In: *Leukemia* 17 (2003), Jul, Nr. 7, 1263–1293
- [99] BONFINI, L. ; MIGLIACCIO, E. ; PELICCI, G. ; LANFRANCONE, L. ; PELICCI, P. G.: Not all Shc's roads lead to Ras. In: *Trends Biochem Sci* 21 (1996), Jul, Nr. 7, S. 257–261

- [100] WÖHRLE, F. U. ; DALY, R. J. ; BRUMMER, T.: Function, regulation and pathological roles of the Gab/DOS docking proteins. In: *Cell Commun Signal* 7 (2009), 22
- [101] EULENFELD, R. ; SCHAPER, F.: A new mechanism for the regulation of Gab1 recruitment to the plasma membrane. In: *J Cell Sci* 122 (2009), Jan, Nr. Pt 1, 55–64
- [102] OKU, S. ; TAKENAKA, K. ; KURIYAMA, T. ; SHIDE, K. ; KUMANO, T. ; KIKUSHIGE, Y. ; URATA, S. ; YAMAUCHI, T. ; IWAMOTO, C. ; SHIMODA, H. K. ; MIYAMOTO, T. ; NAGAFUJI, K. ; KISHIMOTO, J. ; SHIMODA, K. ; AKASHI, K.: JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. In: *British journal of haematology* 150 (2010), Aug, S. 334–344
- [103] WOLF, A. ; EULENFELD, R. ; GÄBLER, K. ; ROLVERING, C. ; HAAN, S. ; BEHRMANN, I. ; DENECKE, B. ; HAAN, C. ; SCHAPER, F.: JAK2-V617F-induced MAPK activity is regulated by PI3K and acts synergistically with PI3K on the proliferation of JAK2-V617F-positive cells. In: *JAKSTAT* 2 (2013), Jul, Nr. 3, e24574
- [104] HOLGADO-MADRUGA, M. ; EMLET, D. R. ; MOSCATELLO, D. K. ; GODWIN, A. K. ; WONG, A. J.: A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. In: *Nature* 379 (1996), Feb, Nr. 6565, 560–564
- [105] ZHAO, C. ; YU, D. H. ; SHEN, R. ; FENG, G. S.: Gab2, a new pleckstrin homology domain-containing adapter protein, acts to uncouple signaling from ERK kinase to Elk-1. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Jul, Nr. 28, S. 19649–19654
- [106] WOLF, I. ; JENKINS, B. J. ; LIU, Y. ; SEIFFERT, M. ; CUSTODIO, J. M. ; YOUNG, P. ; ROHRSCHEIDER, L. R.: Gab3, a new DOS/Gab family member, facilitates macrophage differentiation. In: *Mol Cell Biol* 22 (2002), Jan, Nr. 1, S. 231–244
- [107] SIMISTER, P. C. ; SCHAPER, F. ; O'REILLY, N. ; MCGOWAN, S. ; FELLER, S. M.: Self-organization and regulation of intrinsically disordered proteins with folded N-termini. In: *PLoS Biol* 9 (2011), Nr. 2, e1000591
- [108] SIMISTER, P. C. ; FELLER, S. M.: Order and disorder in large multi-site docking proteins of the Gab family—implications for signalling complex formation and inhibitor design strategies. In: *Mol Biosyst* 8 (2012), Jan, Nr. 1, 33–46
- [109] KRIEGER, J. M. ; FUSCO, G. ; LEWITZKY, M. ; SIMISTER, P. C. ; MARCHANT, J. ; CAMILLONI, C. ; FELLER, S. M. ; DE SIMONE, A.: Conformational recognition of an intrinsically disordered protein. In: *Biophys J* 106 (2014), Apr, Nr. 8, 1771–1779
- [110] ISAKOFF, S. J. ; CARDOZO, T. ; ANDREEV, J. ; LI, Z. ; FERGUSON, K. M. ; ABAGYAN, R. ; LEMMON, M. A. ; ARONHEIM, A. ; SKOLNIK, E. Y.: Identification and analysis of PH domain-containing targets of phosphatidylinositol 3-kinase using a novel in vivo assay in yeast. In: *EMBO J* 17 (1998), Sep, Nr. 18, 5374–5387
- [111] MAROUN, C. R. ; MOSCATELLO, D. K. ; NAUJOKAS, M. A. ; HOLGADO-MADRUGA, M. ; WONG, A. J. ; PARK, M.: A conserved inositol phospholipid binding site within the pleckstrin homology domain of the Gab1 docking protein is required for epithelial morphogenesis. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Oct, Nr. 44, S. 31719–31726
- [112] CHUNG, T. D. ; YU, J. J. ; KONG, T. A. ; SPIOTTO, M. T. ; LIN, J. M.: Interleukin-6 activates phosphatidylinositol-3 kinase, which inhibits apoptosis in human prostate cancer cell lines. In: *Prostate* 42 (2000), Jan, Nr. 1, S. 1–7

- [113] XIE, S. ; LIN, H.-K. ; NI, J. ; YANG, L. ; WANG, L. ; DI SANT'AGNESE, P. A. ; CHANG, C.: Regulation of interleukin-6-mediated PI3K activation and neuroendocrine differentiation by androgen signaling in prostate cancer LNCaP cells. In: *Prostate* 60 (2004), Jun, Nr. 1, 61–67
- [114] BACKER, J. M. ; MYERS, M. Jr ; SHOELSON, S. E. ; CHIN, D. J. ; SUN, X. J. ; MIRALPEIX, M. ; HU, P. ; MARGOLIS, B. ; SKOLNIK, E. Y. ; SCHLESSINGER, J.: Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. In: *EMBO J* 11 (1992), Sep, Nr. 9, S. 3469–3479
- [115] LEWITZKY, M. ; KARDINAL, C. ; GEHRING, N. H. ; SCHMIDT, E. K. ; KONKOL, B. ; EULITZ, M. ; BIRCHMEIER, W. ; SCHAEFER, U. ; FELLER, S. M.: The C-terminal SH3 domain of the adapter protein Grb2 binds with high affinity to sequences in Gab1 and SLP-76 which lack the SH3-typical P-x-x-P core motif. In: *Oncogene* 20 (2001), Mar, Nr. 9, 1052–1062
- [116] BIRCHMEIER, W. ; BRINKMANN, V. ; NIEMANN, C. ; MEINERS, S. ; DICESARE, S. ; NAUNDORF, H. ; SACHS, M.: Role of HGF/SF and c-Met in morphogenesis and metastasis of epithelial cells. In: *Ciba Found Symp* 212 (1997), S. 230–40; discussion 240–6
- [117] WICKREMA, A. ; UDDIN, S. ; SHARMA, A. ; CHEN, F. ; ALSAYED, Y. ; AHMAD, S. ; SAWYER, S. T. ; KRYSTAL, G. ; YI, T. ; NISHADA, K. ; HIBI, M. ; HIRANO, T. ; PLATANIAS, L. C.: Engagement of Gab1 and Gab2 in erythropoietin signaling. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Aug, Nr. 35, S. 24469–24474
- [118] TAKAHASHI-TEZUKA, M. ; YOSHIDA, Y. ; FUKADA, T. ; OHTANI, T. ; YAMANAKA, Y. ; NISHIDA, K. ; NAKAJIMA, K. ; HIBI, M. ; HIRANO, T.: Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. In: *Mol Cell Biol* 18 (1998), Jul, Nr. 7, S. 4109–4117
- [119] BIRCHMEIER, C. ; BIRCHMEIER, W. ; GHERARDI, E. ; VANDE WOUDE, G. F.: Met, metastasis, motility and more. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003), Dec, Nr. 12, 915–925
- [120] LOCK, L. S. ; MAROUN, C. R. ; NAUJOKAS, M. A. ; PARK, M.: Distinct recruitment and function of Gab1 and Gab2 in Met receptor-mediated epithelial morphogenesis. In: *Mol Biol Cell* 13 (2002), Jun, Nr. 6, 2132–2146
- [121] BATZER, A. G. ; ROTIN, D. ; UREÑA, J. M. ; SKOLNIK, E. Y. ; SCHLESSINGER, J.: Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. In: *Mol Cell Biol* 14 (1994), Aug, Nr. 8, S. 5192–5201
- [122] SAMPAIO, C. ; DANCE, M. ; MONTAGNER, A. ; EDOUARD, T. ; MALET, N. ; PERRET, B. ; YART, A. ; SALLES, J.-P. ; RAYNAL, P.: Signal strength dictates phosphoinositide 3-kinase contribution to Ras/extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation via differential Gab1/Shp2 recruitment: consequences for resistance to epidermal growth factor receptor inhibition. In: *Mol Cell Biol* 28 (2008), Jan, Nr. 2, 587–600
- [123] CUNNICK, J. M. ; MENG, S. ; REN, Y. ; DESPONTS, C. ; WANG, H.-G. ; DJEU, J. Y. ; WU, J.: Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Mar, Nr. 11, 9498–9504

- [124] ROSHAN, B. ; KJELSBERG, C. ; SPOKES, K. ; ELDRED, A. ; CROVELLO, C. S. ; CANTLEY, L. G.: Activated ERK2 interacts with and phosphorylates the docking protein GAB1. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Dec, Nr. 51, S. 36362–36368
- [125] LEHR, S. ; KOTZKA, J. ; AVCI, H. ; SICKMANN, A. ; MEYER, H. E. ; HERKNER, A. ; MULLER-WIELAND, D.: Identification of major ERK-related phosphorylation sites in Gab1. In: *Biochemistry* 43 (2004), Sep, Nr. 38, 12133–12140
- [126] BISOTTO, S. ; FIXMAN, E. D.: Src-family tyrosine kinases, phosphoinositide 3-kinase and Gab1 regulate extracellular signal-regulated kinase 1 activation induced by the type A endothelin-1 G-protein-coupled receptor. In: *Biochem J* 360 (2001), Nov, Nr. Pt 1, S. 77–85
- [127] PODAR, K. ; MOSTOSLAVSKY, G. ; SATTLER, M. ; TAI, Y.-T. ; HAYASHI, T. ; CATLEY, L. P. ; HIDESHIMA, T. ; MULLIGAN, R. C. ; CHAUHAN, D. ; ANDERSON, K. C.: Critical role for hematopoietic cell kinase (Hck)-mediated phosphorylation of Gab1 and Gab2 docking proteins in interleukin 6-induced proliferation and survival of multiple myeloma cells. In: *J Biol Chem* 279 (2004), May, Nr. 20, 21658–21665
- [128] WATANABE, T. ; TSUDA, M. ; MAKINO, Y. ; KONSTANTINOVA, T. ; NISHIHARA, H. ; MAJIMA, T. ; MINAMI, A. ; FELLER, S. M. ; TANAKA, S.: Crk adaptor protein-induced phosphorylation of Gab1 on tyrosine 307 via Src is important for organization of focal adhesions and enhanced cell migration. In: *Cell Res* 19 (2009), May, Nr. 5, 638–650
- [129] CHAN, P.-C. ; SUDHAKAR, J. N. ; LAI, C.-C. ; CHEN, H.-C.: Differential phosphorylation of the docking protein Gab1 by c-Src and the hepatocyte growth factor receptor regulates different aspects of cell functions. In: *Oncogene* 29 (2010), Feb, Nr. 5, 698–710
- [130] KOEGL, M. ; ZLATKINE, P. ; LEY, S. C. ; COURTNEIDGE, S. A. ; MAGEE, A. I.: Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. In: *Biochem J* 303 (Pt 3) (1994), Nov, S. 749–753
- [131] PATWARDHAN, P. ; RESH, M. D.: Myristoylation and membrane binding regulate c-Src stability and kinase activity. In: *Mol Cell Biol* 30 (2010), Sep, Nr. 17, 4094–4107
- [132] CUNNICK, J. M. ; MEI, L. ; DOUPNIK, C. A. ; WU, J.: Phosphotyrosines 627 and 659 of Gab1 constitute a bisphosphoryl tyrosine-based activation motif (BTAM) conferring binding and activation of SHP2. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Jun, Nr. 26, 24380–24387
- [133] ITOH, M. ; YOSHIDA, Y. ; NISHIDA, K. ; NARIMATSU, M. ; HIBI, M. ; HIRANO, T.: Role of Gab1 in heart, placenta, and skin development and growth factor- and cytokine-induced extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase activation. In: *Mol Cell Biol* 20 (2000), May, Nr. 10, S. 3695–3704
- [134] FUKUMOTO, T. ; KUBOTA, Y. ; KITANAKA, A. ; YAMAOKA, G. ; OHARA-WAKI, F. ; IMATAKI, O. ; OHNISHI, H. ; ISHIDA, T. ; TANAKA, T.: Gab1 transduces PI3K-mediated erythropoietin signals to the Erk pathway and regulates erythropoietin-dependent proliferation and survival of erythroid cells. In: *Cell Signal* 21 (2009), Dec, Nr. 12, 1775–1783

- [135] MONTAGNER, A. ; YART, A. ; DANCE, M. ; PERRET, B. ; SALLES, J.-P. ; RAYNAL, P.: A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation. In: *J Biol Chem* 280 (2005), Feb, Nr. 7, 5350–5360
- [136] DE ROCCA SERRA-NÉDÉLEC, A. ; EDOUARD, T. ; TRÉGUER, K. ; TAJAN, M. ; ARAKI, T. ; DANCE, M. ; MUS, M. ; MONTAGNER, A. ; TAUBER, M. ; SALLES, J.-P. ; VALET, P. ; NEEL, B. G. ; RAYNAL, P. ; YART, A.: Noonan syndrome-causing SHP2 mutants inhibit insulin-like growth factor 1 release via growth hormone-induced ERK hyperactivation, which contributes to short stature. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (2012), Mar, Nr. 11, 4257–4262
- [137] SHIOYAMA, W. ; NAKAOKA, Y. ; HIGUCHI, K. ; MINAMI, T. ; TANIYAMA, Y. ; NISHIDA, K. ; KIDOYA, H. ; SONOBE, T. ; NAITO, H. ; ARITA, Y. ; HASHIMOTO, T. ; KURODA, T. ; FUJIO, Y. ; SHIRAI, M. ; TAKAKURA, N. ; MORISHITA, R. ; YAMAUCHI-TAKIHARA, K. ; KODAMA, T. ; HIRANO, T. ; MOCHIZUKI, N. ; KOMURO, I.: Docking protein Gab1 is an essential component of postnatal angiogenesis after ischemia via HGF/c-met signaling. In: *Circ Res* 108 (2011), Mar, Nr. 6, 664–675
- [138] NAKAOKA, Y. ; KOMURO, I.: Gab docking proteins in cardiovascular disease, cancer, and inflammation. In: *Int J Inflamm* 2013 (2013), 141068
- [139] WANG, W. ; XU, S. ; YIN, M. ; JIN, Z. G.: Essential roles of Gab1 tyrosine phosphorylation in growth factor-mediated signaling and angiogenesis. In: *Int J Cardiol* 181 (2015), Feb, 180–184
- [140] STEPHENS, L. ; ANDERSON, K. ; STOKOE, D. ; ERDJUMENT-BROMAGE, H. ; PAINTER, G. F. ; HOLMES, A. B. ; GAFFNEY, P. R. ; REESE, C. B. ; MCCORMICK, F. ; TEMPST, P. ; COADWELL, J. ; HAWKINS, P. T.: Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. In: *Science* 279 (1998), Jan, Nr. 5351, S. 710–714
- [141] INOKI, K. ; LI, Y. ; ZHU, T. ; WU, J. ; GUAN, K.-L.: TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. In: *Nat Cell Biol* 4 (2002), Sep, Nr. 9, 648–657
- [142] KIYATKIN, A. ; AKSAMITIENE, E. ; MARKEVICH, N. I. ; BORISOV, N. M. ; HOEK, J. B. ; KHOLODENKO, B. N.: Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Jul, Nr. 29, 19925–19938
- [143] LAUBACH, J. P. ; FU, P. ; JIANG, X. ; SALTER, K. H. ; POTTI, A. ; ARCASOY, M. O.: Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. In: *Exp Hematol* 37 (2009), Dec, Nr. 12, 1411–1422
- [144] PFAFFL, M. W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Res* 29 (2001), May, Nr. 9, S. e45
- [145] EYCKERMAN, S. ; LEMMENS, I. ; LIEVENS, S. ; VAN DER HEYDEN, J. ; VERHEE, A. ; VANDEKERCKHOVE, J. ; TAVERNIER, J.: Design and use of a mammalian protein-protein interaction trap (MAPPIT). In: *Sci STKE* 2002 (2002), Dec, Nr. 162, pl18

- [146] WOLF, A. ; EULENFELD, R. ; BONGARTZ, H. ; HESSENKEMPER, W. ; SIMISTER, P. C. ; LIEVENS, S. ; TAVERNIER, J. ; FELLER, S. M. ; SCHAPER, F.: MAPK-induced Gab1 translocation to the plasma membrane depends on a regulated intramolecular switch. In: *Cell Signal* 27 (2015), Feb, Nr. 2, 340–352
- [147] HAAN, S. ; WÜLLER, S. ; KACZOR, J. ; ROLVERING, C. ; NÖCKER, T. ; BEHRMANN, I. ; HAAN, C.: SOCS-mediated downregulation of mutant Jak2 (V617F, T875N and K539L) counteracts cytokine-independent signaling. In: *Oncogene* 28 (2009), Aug, Nr. 34, 3069–3080
- [148] FRITSCH, J.: *Phosphorylierung des multi-site docking Proteins Gab1 am Serin 552 und Tyrosin 627 nach Aktivierung des IL-6-Signalweges*, Lehrstuhl für Systembiologie, OvGU Magdeburg, Diplomarbeit, Mar 2015
- [149] ANDRAOS, R. ; QIAN, Z. ; BONENFANT, D. ; RUBERT, J. ; VANGREVELINGHE, E. ; SCHEUFLER, C. ; MARQUE, F. ; RÉGNIER, C. H. ; DE POVER, A. ; RYCKELYNCK, H. ; BHAGWAT, N. ; KOPPIKAR, P. ; GOEL, A. ; WYDER, L. ; TAVARES, G. ; BAFFERT, F. ; PISSOT-SOLDERMANN, C. ; MANLEY, P. W. ; GAUL, C. ; VOSHOL, H. ; LEVINE, R. L. ; SELLERS, W. R. ; HOFMANN, F. ; RADIMERSKI, T.: Modulation of activation-loop phosphorylation by JAK inhibitors is binding mode dependent. In: *Cancer Discov* 2 (2012), Jun, Nr. 6, 512–523
- [150] BARUA, D. ; FAEDER, J. R. ; HAUGH, J. M.: Structure-based kinetic models of modular signaling protein function: focus on Shp2. In: *Biophys J* 92 (2007), Apr, Nr. 7, 2290–2300
- [151] OGATA, A. ; CHAUHAN, D. ; TEOH, G. ; TREON, S. P. ; URASHIMA, M. ; SCHLOSSMAN, R. L. ; ANDERSON, K. C.: IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. In: *J Immunol* 159 (1997), Sep, Nr. 5, S. 2212–2221
- [152] CHEBATH, J. ; FISCHER, D. ; KUMAR, A. ; OH, J. W. ; KOLETT, O. ; LAPIDOT, T. ; FISCHER, M. ; ROSE-JOHN, S. ; NAGLER, A. ; SLAVIN, S. ; REVEL, M.: Interleukin-6 receptor-interleukin-6 fusion proteins with enhanced interleukin-6 type pleiotropic activities. In: *Eur Cytokine Netw* 8 (1997), Dec, Nr. 4, S. 359–365
- [153] LU, X. ; HUANG, L. J.-S. ; LODISH, H. F.: Dimerization by a cytokine receptor is necessary for constitutive activation of JAK2V617F. In: *J Biol Chem* 283 (2008), Feb, Nr. 9, 5258–5266
- [154] UEDA, F. ; TAGO, K. ; TAMURA, H. ; FUNAKOSHI-TAGO, M.: Three Tyrosine Residues in the Erythropoietin Receptor Are Essential for Janus Kinase 2 V617F Mutant-induced Tumorigenesis. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (2017), Februar, S. 1826–1846
- [155] WEBER, A. ; BORGHOUTS, C. ; BRENDDEL, C. ; MORIGGL, R. ; DELIS, N. ; BRILL, B. ; VAFAZADEH, V. ; GRONER, B.: Stat5 Exerts Distinct, Vital Functions in the Cytoplasm and Nucleus of Bcr-Abl+ K562 and Jak2(V617F)+ HEL Leukemia Cells. In: *Cancers* 7 (2015), März, S. 503–537
- [156] WALZ, C. ; AHMED, W. ; LAZARIDES, K. ; BETANCUR, M. ; PATEL, N. ; HENNIGHAUSEN, L. ; ZALESKAS, V. M. ; VAN ETTEN, R. A.: Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice. In: *Blood* 119 (2012), April, S. 3550–3560

- [157] YAN, D. ; HUTCHISON, R. E. ; MOHI, G.: Critical requirement for Stat5 in a mouse model of polycythemia vera. In: *Blood* 119 (2012), April, S. 3539–3549
- [158] GILL, J. H. ; KIRWAN, I. G. ; SEARGENT, J. M. ; MARTIN, S. W. ; TIJANI, S. ; ANIKIN, V. A. ; MEARN, A. J. ; BIBBY, M. C. ; ANTHONY, A. ; LOADMAN, P. M.: MMP-10 is overexpressed, proteolytically active, and a potential target for therapeutic intervention in human lung carcinomas. In: *Neoplasia* 6 (2004), Nr. 6, 777–785
- [159] CROUCHER, D. R. ; SAUNDERS, D. N. ; LOBOV, S. ; RANSON, M.: Revisiting the biological roles of PAI2 (SERPINB2) in cancer. In: *Nat Rev Cancer* 8 (2008), Jul, Nr. 7, 535–545
- [160] LECOQ-LAFON, C. ; VERDIER, F. ; FICHELSON, S. ; CHRÉTIEN, S. ; GISSELBRECHT, S. ; LACOMBE, C. ; MAYEUX, P.: Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of GAB1 and its association with SHC, SHP2, SHIP, and phosphatidylinositol 3-kinase. In: *Blood* 93 (1999), Apr, Nr. 8, S. 2578–2585
- [161] BOUSCARY, D. ; PENE, F. ; CLAESSENS, Y.-E. ; MULLER, O. ; CHRÉTIEN, S. ; FONTENAY-ROUPIE, M. ; GISSELBRECHT, S. ; MAYEUX, P. ; LACOMBE, C.: Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. In: *Blood* 101 (2003), May, Nr. 9, 3436–3443
- [162] ZHU, Q.-S. ; ROBINSON, L. J. ; ROGINSKAYA, V. ; COREY, S. J.: G-CSF-induced tyrosine phosphorylation of Gab2 is Lyn kinase dependent and associated with enhanced Akt and differentiative, not proliferative, responses. In: *Blood* 103 (2004), May, Nr. 9, 3305–3312
- [163] DAVID-PFEUTY, T. ; NOUVIAN-DOOGHE, Y.: Highly specific antibody to Rous sarcoma virus src gene product recognizes nuclear and nucleolar antigens in human cells. In: *Journal of virology* 69 (1995), Mar, S. 1699–1713
- [164] FABIAN, C.: *Die Rolle der Src-Familie Kinasen in der Vermittlung der Gab1-Y627-Phosphorylierung in der Epo- und IL-6-induzierten Signaltransduktion*, Lehrstuhl für Systembiologie, OvGU Magdeburg, Diplomarbeit, 2016
- [165] RAHIMI, N. ; HUNG, W. ; TREMBLAY, E. ; SAULNIER, R. ; ELLIOTT, B.: c-Src kinase activity is required for hepatocyte growth factor-induced motility and anchorage-independent growth of mammary carcinoma cells. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (1998), Dezember, S. 33714–33721
- [166] GREER, P.: Closing in on the biological functions of Fps/Fes and Fer. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (2002), April, S. 278–289
- [167] SENIS, Y. A. ; CRAIG, A. W. B. ; GREER, P. A.: Fps/Fes and Fer protein-tyrosinekinases play redundant roles in regulating hematopoiesis. In: *Experimental hematology* 31 (2003), August, S. 673–681
- [168] RETTSCHLAG, U.: *Identifizierung von Gab1-Interaktionspartnern und die Regulation der Gab1-Phosphorylierung (pY627) durch MAPK- und PI3K-Aktivität in Jak2-WT und Jak2-V617F exprimierenden Zellen*, Lehrstuhl für Systembiologie, OvGU Magdeburg, Diplomarbeit, 2016
- [169] HAUCK, M.: *Erythropoietin-induzierte Signalkomplexbildung am multi-site docking Protein Gab1*, Lehrstuhl für Systembiologie, OvGU Magdeburg, Diplomarbeit, 2015

- [170] LOCK, L. S. ; FRIGAULT, M. M. ; SAUCIER, C. ; PARK, M.: Grb2-independent recruitment of Gab1 requires the C-terminal lobe and structural integrity of the Met receptor kinase domain. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Aug, Nr. 32, 30083–30090
- [171] SCHAEFER, U. ; GEHRING, N. H. ; FUCHS, K. P. ; SACHS, M. ; KEMPKE, B. ; BIRCHMEIER, W.: Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. In: *J Cell Biol* 149 (2000), Jun, Nr. 7, S. 1419–1432
- [172] BULUT, G. B. ; SULAHIAN, R. ; MA, Y. ; CHI, N.-w. ; HUANG, L. J.-s.: Ubiquitination regulates the internalization, endolysosomal sorting, and signaling of the erythropoietin receptor. In: *J Biol Chem* 286 (2011), Feb, Nr. 8, 6449–6457
- [173] LEWITZKY, M. ; SIMISTER, P. C. ; FELLER, S. M.: Beyond 'furballs' and 'dumpling soups' - towards a molecular architecture of signaling complexes and networks. In: *FEBS letters* 586 (2012), August, S. 2740–2750
- [174] BYRNE, J. L. ; PATERSON, H. F. ; MARSHALL, C. J.: p21Ras activation by the guanine nucleotide exchange factor Sos, requires the Sos/Grb2 interaction and a second ligand-dependent signal involving the Sos N-terminus. In: *Oncogene* 13 (1996), Nov, Nr. 10, S. 2055–2065
- [175] CUNNICK, J. M. ; DORSEY, J. F. ; MUNOZ-ANTONIA, T. ; MEI, L. ; WU, J.: Requirement of SHP2 binding to Grb2-associated binder-1 for mitogen-activated protein kinase activation in response to lysophosphatidic acid and epidermal growth factor. In: *J Biol Chem* 275 (2000), May, Nr. 18, S. 13842–13848
- [176] MAROUN, C. R. ; NAUJOKAS, M. A. ; HOLGADO-MADRUGA, M. ; WONG, A. J. ; PARK, M.: The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. In: *Mol Cell Biol* 20 (2000), Nov, Nr. 22, S. 8513–8525
- [177] MENG, S. ; CHEN, Z. ; MUNOZ-ANTONIA, T. ; WU, J.: Participation of both Gab1 and Gab2 in the activation of the ERK/MAPK pathway by epidermal growth factor. In: *Biochem J* 391 (2005), Oct, Nr. Pt 1, 143–151
- [178] LARAMÉE, M. ; CHABOT, C. ; CLOUTIER, M. ; STENNE, R. ; HOLGADO-MADRUGA, M. ; WONG, A. J. ; ROYAL, I.: The scaffolding adapter Gab1 mediates vascular endothelial growth factor signaling and is required for endothelial cell migration and capillary formation. In: *J Biol Chem* 282 (2007), Mar, Nr. 11, 7758–7769
- [179] BARD-CHAPEAU, E. A. ; YUAN, J. ; DROIN, N. ; LONG, S. ; ZHANG, E. E. ; NGUYEN, T. V. ; FENG, G.-S.: Concerted functions of Gab1 and Shp2 in liver regeneration and hepatoprotection. In: *Mol Cell Biol* 26 (2006), Jun, Nr. 12, 4664–4674
- [180] REDDY, R. J. ; GAJADHAR, A. S. ; SWENSON, E. J. ; ROTHENBERG, D. A. ; CURRAN, T. G. ; WHITE, F. M.: Early signaling dynamics of the epidermal growth factor receptor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016), Feb
- [181] KLINGMÜLLER, U. ; WU, H. ; HSIAO, J. G. ; TOKER, A. ; DUCKWORTH, B. C. ; CANTLEY, L. C. ; LODISH, H. F.: Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Apr, Nr. 7, S. 3016–3021

- [182] PANDEY, R. ; KAPUR, R.: Targeting phosphatidylinositol-3-kinase pathway for the treatment of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. In: *Mol Cancer* 14 (2015), Jun, 118
- [183] ODENIKE, O.: Beyond JAK inhibitor therapy in myelofibrosis. In: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2013* (2013), 545–552
- [184] CHOONG, M. L. ; PECQUET, C. ; PENDHARKAR, V. ; DIACONU, C. C. ; YONG, J. W. Y. ; TAI, S. J. ; WANG, S. F. ; DEFOUR, J.-P. ; SANGTHONGPITAG, K. ; VILLEVAL, J.-L. ; VAINCHENKER, W. ; CONSTANTINESCU, S. N. ; LEE, M. A.: Combination treatment for myeloproliferative neoplasms using JAK and pan-class I PI3K inhibitors. In: *J Cell Mol Med* 17 (2013), Nov, Nr. 11, 1397–1409
- [185] KAPLAN, J. B. ; STEIN, B. L. ; MCMAHON, B. ; GILES, F. J. ; PLATANIAS, L. C.: Evolving Therapeutic Strategies for the Classic Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms. In: *EBioMedicine* 3 (2016), Jan, 17–25
- [186] GADÓ, K. ; DOMJÁN, G. ; HEGYESI, H. ; FALUS, A.: Role of INTERLEUKIN-6 in the pathogenesis of multiple myeloma. In: *Cell Biol Int* 24 (2000), Nr. 4, 195–209
- [187] SCHAPER, F. ; GENDO, C. ; ECK, M. ; SCHMITZ, J. ; GRIMM, C. ; ANHUF, D. ; KERR, I. M. ; HEINRICH, P. C.: Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. In: *Biochem J* 335 (Pt 3) (1998), Nov, S. 557–565
- [188] HALLEK, M. ; NEUMANN, C. ; SCHÄFFER, M. ; DANHAUSER-RIEDL, S. ; BUBNOFF, N. von ; VOS, G. de ; DRUKER, B. J. ; YASUKAWA, K. ; GRIFFIN, J. D. ; EMMERICH, B.: Signal transduction of interleukin-6 involves tyrosine phosphorylation of multiple cytosolic proteins and activation of Src-family kinases Fyn, Hck, and Lyn in multiple myeloma cell lines. In: *Experimental hematology* 25 (1997), Dezember, S. 1367–1377
- [189] HOLGADO-MADRUGA, M. ; WONG, A. J.: Gab1 is an integrator of cell death versus cell survival signals in oxidative stress. In: *Mol Cell Biol* 23 (2003), Jul, Nr. 13, S. 4471–4484
- [190] NAKAOKA, Y. ; NISHIDA, K. ; FUJIO, Y. ; IZUMI, M. ; TERAJ, K. ; OSHIMA, Y. ; SUGIYAMA, S. ; MATSUDA, S. ; KOYASU, S. ; YAMAUCHI-TAKIHARA, K. ; HIRANO, T. ; KAWASE, I. ; HIROTA, H.: Activation of gp130 transduces hypertrophic signal through interaction of scaffolding/docking protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 in cardiomyocytes. In: *Circ Res* 93 (2003), Aug, Nr. 3, 221–229
- [191] JANKNECHT, R. ; ERNST, W. H. ; PINGOUD, V. ; NORDHEIM, A.: Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. In: *EMBO J* 12 (1993), Dec, Nr. 13, S. 5097–5104
- [192] KERKHOFF, E. ; HOUBEN, R. ; LÖFFLER, S. ; TROPPEMAIR, J. ; LEE, J. E. ; RAPP, U. R.: Regulation of c-myc expression by Ras/Raf signalling. In: *Oncogene* 16 (1998), Jan, Nr. 2, 211–216
- [193] TANG, C.-H. ; CHEN, C.-F. ; CHEN, W.-M. ; FONG, Y.-C.: IL-6 increases MMP-13 expression and motility in human chondrosarcoma cells. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (2011), April, S. 11056–11066

- [194] JOHANSSON, N. ; AHONEN, M. ; KÄRÄHÄNEN, V. M.: Matrix metalloproteinases in tumor invasion. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 57 (2000), Januar, S. 5–15
- [195] CHEN, L. ; DU-CUNY, L. ; MOSES, S. ; DUMAS, S. ; SONG, Z. ; REZAEIAN, A. H. ; LIN, H.-K. ; MEUILLET, E. J. ; ZHANG, S.: Novel inhibitors induce large conformational changes of GAB1 pleckstrin homology domain and kill breast cancer cells. In: *PLoS computational biology* 11 (2015), Jan, S. e1004021
- [196] HIDESHIMA, T. ; CHAUHAN, D. ; KIZILTEPE, T. ; IKEDA, H. ; OKAWA, Y. ; PODAR, K. ; RAJE, N. ; PROTOPOPOV, A. ; MUNSHI, N. C. ; RICHARDSON, P. G. ; CARRASCO, R. D. ; ANDERSON, K. C.: Biologic sequelae of I κ B kinase (IKK) inhibition in multiple myeloma: therapeutic implications. In: *Blood* 113 (2009), May, Nr. 21, 5228–5236
- [197] TAI, Y.-T. ; FULCINITI, M. ; HIDESHIMA, T. ; SONG, W. ; LEIBA, M. ; LI, X.-F. ; RUMIZEN, M. ; BURGER, P. ; MORRISON, A. ; PODAR, K. ; CHAUHAN, D. ; TASSONE, P. ; RICHARDSON, P. ; MUNSHI, N. C. ; GHOBRIAL, I. M. ; ANDERSON, K. C.: Targeting MEK induces myeloma-cell cytotoxicity and inhibits osteoclastogenesis. In: *Blood* 110 (2007), Sep, Nr. 5, 1656–1663
- [198] ROBERTS, P. J. ; USARY, J. E. ; DARR, D. B. ; DILLON, P. M. ; PFEFFERLE, A. D. ; WHITTLE, M. C. ; DUNCAN, J. S. ; JOHNSON, S. M. ; COMBEST, A. J. ; JIN, J. ; ZAMBONI, W. C. ; JOHNSON, G. L. ; PEROU, C. M. ; SHARPLESS, N. E.: Combined PI3K/mTOR and MEK inhibition provides broad antitumor activity in faithful murine cancer models. In: *Clin Cancer Res* 18 (2012), Oct, Nr. 19, 5290–5303
- [199] WEIDNER, K. M. ; DI CESARE, S. ; SACHS, M. ; BRINKMANN, V. ; BEHRENS, J. ; BIRCHMEIER, W.: Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. In: *Nature* 384 (1996), Nov, Nr. 6605, 173–176
- [200] ORTIZ-PADILLA, C. ; GALLEGO-ORTEGA, D. ; BROWNE, B. C. ; HOCHGRÄFE, F. ; CALDON, C. E. ; LYONS, R. J. ; CROUCHER, D. R. ; RICKWOOD, D. ; ORMANDY, C. J. ; BRUMMER, T. ; DALY, R. J.: Functional characterization of cancer-associated Gab1 mutations. In: *Oncogene* 32 (2013), May, Nr. 21, 2696–2702
- [201] BRUMMER, T. ; LARANCE, M. ; HERRERA ABREU, M. T. ; LYONS, R. J. ; TIMPSON, P. ; EMMERICH, C. H. ; FLEUREN, E. D. G. ; LEHRBACH, G. M. ; SCHRAMEK, D. ; GUILHAUS, M. ; JAMES, D. E. ; DALY, R. J.: Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 terminates signalling by the Gab2 docking protein. In: *The EMBO journal* 27 (2008), September, S. 2305–2316

10 Abkürzungen

A	Alanin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
C	Cystein
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Csk	<i>C-src tyrosine kinase</i>
D	Asparaginsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Epo	Erythropoetin
Erk	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
F	Phenylalanin
FKS	fötale Kälberserum
Gab1	<i>Grb2-associated binder 1</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
gp	Glykoprotein
Grb2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HEK293	<i>human embryonic kidney cell line</i>
HepG2	humane Hepatom-Zelllinie
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IL	Interleukin
IL-6R α	Interleukin-6 α -Rezeptoruntereinheit (gp80)
IL-6R β	Interleukin-6 β -Rezeptoruntereinheit (gp130)
JAK	Janus Kinase

KD	<i>knock-down</i>
KIR	<i>kinase inhibitory region</i>
LB	<i>lysogeni broth</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
p	phospho-
P	Prolin
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
R	Arginin
Ras	<i>retrovirus associated sequence</i>
Raf-1	<i>rat fibrosarcoma 1</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	<i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
S	Serin
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SFK	<i>Src family kinases</i>
SH2	<i>Src homology domain 2</i>
SH3	<i>Src homology domain 3</i>
SHP2	<i>SH2 domain-containing phosphatase 2</i>

sIL-6R α	lösliche IL-6 α -Rezeptoruntereinheit
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T	Threonin
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TC-45	T-Zell Protein-Tyrosin-Phosphatase 45
TC-PTP	T-Zell Protein-Tyrosin-Phosphatase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TYK	Tyrosinkinase der Janus-Familie
V	Valin
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

11 Danksagung

Der ersten Person, der ich meinen Dank aussprechen möchte, ist Prof. Dr. Fred Schaper. Er hat mir die Möglichkeit gegeben meine Dissertation am Lehrstuhl für Systembiologie anzufertigen und bot mir ein interessantes und herausforderndes Projekt an. Durch die Bearbeitung dieses Projekts durfte ich mir ein sehr weiten und komplexen wissenschaftlichen Horizont aneignen. Weiterhin war es durch die herausragende Ausstattung der Labore am Lehrstuhl für Systembiologie möglich eine Bandbreite an zellbiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Methoden zu erlernen, die mein wissenschaftliches Profil gestärkt und ausgebaut haben. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Fred Schaper für ein stets offenes Ohr und für unterstützende, fördernde und hilfreiche Diskussionen.

Besonderen Dank richte ich zudem an Dr. Anna Dittrich, die mich während der gesamten Zeit am Lehrstuhl für Systembiologie wissenschaftlich gefördert, mich an anderen Projekten hat teilhaben lassen und mir sehr viele nützliche Tipps zum Verfassen dieser Dissertation gegeben hat.

Ich danke Dr. Wiebke Hessenkemper für die wundervolle Zusammen- und Zuarbeit im Labor und das gemeinsame erfolgreiche Abschließen des geförderten Projektes. Ein Dank auch an die Kooperationspartner Iris Behrmann, Claude und Serge Haan aus Luxemburg und Stephan M. Feller, Marc Lewitzky und Katharina Mandel aus Oxford und Halle a. d. Saale für materielle und gedankliche Unterstützung.

Auch ein Dank an alle anderen Mitarbeiter am Lehrstuhl für Systembiologie, den konstruktiven Gesprächsrunden bei Kaffee und Kuchen und die herausragende Arbeitsatmosphäre durch und mit euch.

Ich bin sehr dankbar für die Unterstützung durch meine Familie und meiner Freunde, die immer interessiert an meinem Fortschritt waren und mich moralisch immer wieder aufgebaut haben diese Arbeit erfolgreich zu beenden.

12 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema

**Bedeutung des *multi-site docking* Proteins Gab1 in der Epo-, Jak2-V617F-
und IL-6-induzierten Signaltransduktion**

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 17. Mai 2017

Hannes Bongartz

13 Lebenslauf

Persönliche Details

Name Hannes Bongartz
Geburtsdatum 19.12.1987
Geburtsort Köthen (Anhalt)
Nationalität Deutsch

Studium

10/2007 - 10/2011 Biosystemtechnik (Bachelor) an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit dem Abschluss Bachelor of Science
10/2011 - 06/2013 Biosystemtechnik (Master) an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit dem Abschluss Master of Science
Seit 11/2013 Promotionsstudium am Lehrstuhl für Systembiologie von Prof. Dr. Fred Schaper des Instituts für Biologie an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Publikationen

01/2015 A. Wolf, R. Eulendorf, H. Bongartz, W. Hessenkemper, P. C. Simister, S. Lievens, J. Tavernier, S. M. Feller, F. Schaper, MAPK-induced Gab1 translocation to the plasma membrane depends on a regulated intramolecular switch., *Cell Signal* 27 (2) (2015), 340-352. (doi: 10.1016/j.cellsig.2014.11.017)
04/2016 J. Pinno, H. Bongartz, O. Klepsch, N. Wundrack, V. Poli, F. Schaper, A. Dittrich, Interleukin-6 influences stress-signalling by reducing the expression of the mTOR-inhibitor REDD1 in a STAT3-dependent manner., *Cell Signal* 28 (8) (2016), 907-916. (doi: 10.1016/j.cellsig.2016.04.004)
03/2017 H. Bongartz, W. Hessenkemper, C. Müller, M. Fensky, J. Fritsch, K. Mandel, I. Behrmann, C. Haan, T. Fischer, S. M. Feller, F. Schaper, The multi-site docking protein Gab1 is constitutively phosphorylated independent from its recruitment to the plasma membrane in Jak2-V617F-positive cells and mediates proliferation of human erythroleukaemia cells., *Cell Signal* 35 (2017), 37-47. (doi: 10.1016/j.cellsig.2017.03.021)

Präsentationen und**Poster**

- 05/2014 **JAK2-V617F- and IL-6-induced MAPK activity is regulated by PI3K and acts synergistically with PI3K on the phosphorylation of Gab1**
Posterpräsentation auf der ICIS MidTerm Conference Interleukin-6 Biology-Pathophysiology-Therapy, 14.-16.5.2014, Kiel (Deutschland)
- 11/2014 **Involvement of MAPK- and PI3K pathway in Gab1 translocation and phosphorylation**
Posterpräsentation auf der 18. Signal Transduction - Receptors, Mediators, Genes der STS, 5.-7.11.2014, Weimar (Deutschland)
- 05/2015 **Gab1 : SHP2 complex formation in Jak2-V617F expressing cells is crucial for constitutive MAPK activation**
Posterpräsentation auf der International Conference on Cytokine Signaling in Cancer, 24.-29.5.2015, Kreta (Griechenland)
- 11/2016 **Interrelation of Gab1 and SHP2 in pathogenic Jak2-V617F-induced MAPK signaling**
Posterpräsentation auf der 20. Signal Transduction - Receptors, Mediators, Genes der STS, 9.-11.11.2016, Weimar (Deutschland)

Auszeichnungen und**Stipendien**

- 11/2014 **Travel Grant Stipendium der STS**
Für die Posterpräsentation „Involvement of MAPK- and PI3K pathway in Gab1 translocation and phosphorylation“ auf der 18. Signal Transduction - Receptors, Mediators, Genes der STS, 5.-7.11.2014, Weimar (Deutschland)
- 05/2015 **Travel Grant Stipendium der International Conference on Cytokine Signaling in Cancer**
Für die Posterpräsentation „Gab1 : SHP2 complex formation in Jak2-V617F expressing cells is crucial for constitutive MAPK activation“ auf der International Conference on Cytokine Signaling in Cancer, 24.-29.5.2015, Kreta (Griechenland)

Betreute**Abschlussarbeiten**

- Ulrike Rettschlag (2014) Bachelorarbeit „Überprüfung von Antikörpern hinsichtlich ihrer Spezifität für die Phosphorylierung am Serin 552 im Gab1-Molekül nach Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und Untersuchung potentieller synergistischer Effekte zwischen der Interleukin-6-induzierten MAPK-Aktivität und dem PI3K-Signalweg“
- Berno Dalichau (2014) Bachelorarbeit „Bedeutung der Epo-induzierten MAPK- und PI3K-Kaskade für die Gab1-Phosphorylierung am Tyrosin 627“
- Johannes Fritsch (2015) Bachelorarbeit „Phosphorylierung des *multi-site docking* Proteins Gab1 am Serin 552 und Tyrosin 627 nach Aktivierung des IL-6-Signalweges“
- Melissa Fensky (2015) Masterarbeit „Die Bedeutung der Epo-induzierten und Jak2-vermittelten PI3K- und MAPK-Signalkaskaden für die Gab1-Phosphorylierung am Tyrosin 627,“

Magdeburg, den 17. Mai 2017

Hannes Bongartz