

Universität Ulm  
Abteilung Pharmakologie und Toxikologie  
Leiter: Prof. Dr. Peter Gierschik

**Charakterisierung der EGFP-K-Ras und EGFP-N-Ras-  
induzierten ERK-2 Aktivierung in der humanen  
Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
(Dr. med.)  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Ulm

vorgelegt von  
Patrizia Eva Siegert  
geb. in Heydebreck/Cosel  
Ulm 2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin  
1. Berichterstatter: PD Dr. Klaudia Giehl  
2. Berichterstatter: PD Dr. Martin Wagner  
Tag der Promotion: 11.05.2006

**Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,  
das gelöst werden will.**

Galileo Galilei

# 1 Inhaltverzeichnis

1	Inhaltverzeichnis .....	1
2	Abkürzungen.....	3
3	Einleitung.....	6
3.1	Das Pankreaskarzinom.....	6
3.2	Ras .....	8
3.3	GFP-Fusionsproteine .....	16
3.4	Transfektion .....	17
3.5	Zielsetzung der Arbeit .....	19
4	Material.....	20
4.1	Chemikalien und Biochemikalien .....	20
4.2	Radiochemikalien.....	22
4.3	Enzyme und Molekularbiologische Kits.....	22
4.4	Molekulargewichtsmarker .....	22
4.5	Antikörper .....	24
4.6	Prokaryontische und eukaryontische Zellen .....	25
4.7	Expressionsplasmide .....	26
4.8	Standardlösungen und Medien.....	27
4.9	Zellkultur-Materialien.....	29
4.10	Geräte.....	29
4.11	Software .....	30
5	Methoden.....	31
5.1	Molekularbiologische Methoden.....	31
5.2	Mikrobiologische Methoden.....	35
5.3	Zellbiologische Methoden .....	38
5.4	Proteinbiochemische Methoden .....	41
5.5	Statistik und verwendete Computerprogramme.....	50
6	Ergebnisse.....	52
6.1	Klonierungen.....	52
6.2	Transiente Transfektion von PANC-1 Zellen .....	56
6.3	Einfluss von EGFP-Ras auf die Aktivität von ERK-2 .....	71
7	Diskussion.....	79
7.1	Expression und Funktionalität von EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen in PANC-1 Zellen .....	80

---

7.2	Einfluss von Ras auf ERK-2 in ruhenden Zellen .....	87
8	Zusammenfassung.....	92
9	Literaturverzeichnis.....	94
10	Danksagung.....	119
11	Lebenslauf.....	120
12	Publikationen/Kongressbeiträge .....	121

## 2 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-indolylphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
CMF-PBS	Calcium- und Magnesium-freie Phosphat-gepufferte Saline
cpm	<i>counts per minute</i>
DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	halbmaximale Konzentration
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm oder Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>

---

GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HA	Influenzavirus-Hämagglutinin-12CA-Epitop
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMW	<i>high molecular weight</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
JNK/SAPK	<i>c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LMW	<i>low molecular weight</i>
LPA	Lysophosphatidsäure
M	Mol pro Liter
mA	Milliampère
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEKK	MAPK/ERK Kinase Kinase
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
mg	Milligramm
min	Minute
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
m/V	Masse pro Volumen
ng	Nanogramm
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysis</i>

---

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB	<i>Phosphotyrosine-binding</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
rh	rekombinant human
Rho	<i>ras homologous protein</i>
RIPA	<i>radioimmuno-precipitation-buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SD	<i>standard deviation</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec.	Sekunde
SH2	<i>src homology domain 2</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween-20	Polyoxymethylensorbitan-monolaurat
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V/V	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid

## 3 Einleitung

### 3.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom steht an 4. Stelle der tumorbedingten Todesursachen (Parker *et al.*, 1997; Jemal *et al.*, 2002) mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 3 % (Greenlee *et al.*, 2001; Jemal *et al.*, 2002). Die fehlende rechtzeitige Erkennung und die frühe Ausbreitung dieses Tumors in umgebende Lymphknoten und Organe wie Leber und Magen tragen zu der schlechten Prognose bei. Bestrahlung und Chemotherapie erwiesen sich als ineffiziente Behandlungsmöglichkeiten und auch die chirurgische Resektion des Tumors und des umgebenden Gewebes konnte die 5-Jahres-Überlebensrate auf lediglich 20 % erhöhen (Zamboni *et al.*, 2000). Die Metastasierung erfolgt sowohl über Blut- und Lymphwege als auch durch perineurale Invasion entlang von intra- und extrapancreatischen Nerven (Nakao *et al.*, 1996). Im Rahmen der perineuralen Invasion benutzen die Tumorzellen die neuronalen Strukturen als Leitschiene zur Invasion und können sich somit schnell im extrapancreatischen Gewebe ausbreiten (Klöppel und Heitz, 1984; Marczell *et al.*, 1998).

#### 3.1.1 Molekulare Grundlagen des Pankreaskarzinoms

Der Prozess der malignen Transformation einer normalen Zelle in eine maligne Tumorzelle vollzieht sich schrittweise, indem es zur Akkumulation von genetischen Alterationen und Störungen in wichtigen zellulären Vorgängen wie Zellzyklus, Differenzierung oder Apoptose kommt (Evan und Vousden, 2001; Schneider *et al.*, 2003). Vergleichbar der Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms (zusammengefasst in Schneider *et al.*, 2003) wurde ein Progressionsmodell für das Pankreaskarzinom beschrieben. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas entwickelt sich über eine erste Veränderung des normalen Epithels zu einer flachen Epithelhyperplasie (PanIN-1A) und weiter zu einer papillären Hyperplasie mit oder ohne Atypien (PanIN-1B oder PanIN-2). Diese Veränderungen können in ein *Carcinoma in situ* übergehen, das letztendlich in ein invasives Pankreaskarzinom münden kann (Hruban *et al.*, 2001). Die morphologischen Prozesse korrelieren mit genetischen und epigenetischen Veränderungen, welche *in toto* zu der Entstehung des Pankreaskarzinoms führen (Hruban *et al.*, 2000).

Zu den wichtigsten genetischen Veränderungen des Pankreaskarzinoms gehören Punktmutationen im *K-ras* Gen. Sie sind bereits in bis zu 30 % aller frühen PanIN-Läsionen des Pankreas nachweisbar und zeigen eine Prävalenz von über 90 % im Pankreaskarzinom (Terhune *et al.*, 1998; Apple *et al.*, 1999; Hruban *et al.*, 2000). Aktivierende Mutationen des *ras*-Gens führen zu einem konstitutiv aktiven Ras-Protein und zur Aktivierung multipler Signaltransduktionskaskaden, die bedeutend für Proliferation, Überleben oder Invasion von Tumorzellen sind (Shields *et al.*, 2000; Giehl *et al.*, 2005). Ein weiteres wesentliches Charakteristikum des Pankreaskarzinoms ist der Verlust der Funktion des Tumorsuppressorgens *p53*. Die Schädigung von Zellen oder die Aktivierung von Onkogenen induzieren die Aktivierung des Tumorsuppressorgens *p53*, welches sich allerdings durch genomische Instabilität auszeichnet. Das *p53* Genprodukt bewirkt einen Zellzyklusarrest oder die Apoptose von Zellen als Schutz vor einer malignen Transformation (Levine, 1997; Gorunova *et al.*, 1998; Harada *et al.*, 2002).

Das Pankreaskarzinom ist durch eine Vielzahl epigenetischer Veränderungen charakterisiert. Die bedeutsamsten Veränderungen betreffen die Familie der *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptoren und ihrer Liganden, zu denen EGF (*epidermal growth factor*), TGF $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* ), Amphiregulin, Heparin-bindendes EGF und Epiregulin gehören (Smith *et al.*, 1987; Ebert *et al.*, 1994; Kobrin *et al.*, 1994; Korc *et al.*, 1992). Durch die Bindung von Liganden kommt es über Homo- oder Heterodimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors sowie nachfolgend zur Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege, wie zum Beispiel die Aktivierung der Signaltransduktion über die Phospholipase C (PLC) $\gamma$ 1, die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade oder über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und ihre nachgeschalteten Effektoren. Hierbei werden Signale über mehrere Kaskadenmitglieder in den Zellkern an Transkriptionsfaktoren weitergeleitet, die eine Progression durch die G1-Phase des Zellzyklus und somit die Proliferation von Zellen induzieren (zusammengefasst in Schneider *et al.*, 2003). Im Pankreaskarzinom konnte außerdem eine Überexpression des EGF-Rezeptors und seiner Liganden festgestellt werden (Ebert *et al.*, 1994, Giehl *et al.*, 2000). Pankreaskarzinome mit einer EGF-Rezeptor- und TGF $\alpha$ -Überexpression wiesen klinisch einen Krankheitsverlauf mit rascher Progression auf (Yamanaka *et al.*, 1993; Di Marco *et al.*, 1990; Friess *et al.*, 1999).

## 3.2 Ras

In menschlichen Zellen kommen drei *ras*-Gene vor, die für vier Ras-Proteine kodieren: H-Ras, N-Ras und die beiden *Splice*-Varianten K-Ras4A und K-Ras4B (Barbacid, 1987; Bos, 1989). Der Name Ras leitet sich von *rat sarcoma* ab, da *ras*-Gene zuerst in Harvey- (H-Ras) und Kirsten- (K-Ras)-Stämmen des *rat sarcoma* Virus entdeckt wurden (Barbacid, 1987). Der Name von N-Ras leitet sich von Neuroblastoma ab, in welchem das Gen als erstes identifiziert wurde. Das *N-ras* Gen befindet sich auf Chromosom 1. Das *H-ras* Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert und das *K-ras* Gen auf Chromosom 12 (Shimizu *et al.*, 1983). Ras-Proteine werden ubiquitär exprimiert und sind hoch konserviert. Sie gehören zur Ras-Superfamilie. Beim Menschen werden folgende Proteine in diese Familie eingeordnet: i) vier Ras-Proteine: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B, ii) vier Rap-Proteine: Rap1a, Rap1b, Rap2a und Rap2b, iii) zwei R-Ras ähnliche Proteine: R-Ras und TC21, iv) zwei Ral-Proteine: RalA und RalB, und v) Rheb-Protein (Bos, 1997; Takai *et al.*, 2001; Oxford und Theodorescu, 2003; Giehl, 2005). Ras-Proteine sind kleine GTPasen, d.h. GTP-spaltende Moleküle (s.a. 3.2.1.) mit einem Molekulargewicht von 21 kDa. Als GTPasen befinden sie sich in zwei unterschiedlichen Aktivitätszuständen in der Zelle. Im inaktiven Zustand sind Ras-Proteine an GDP gebunden. Durch die Abspaltung von GDP und die Bindung von GTP gehen Ras-Proteine in den aktiven Zustand über und können damit als membranassoziierte, intrazelluläre Proteine extrazelluläre Signale von der Zelloberfläche ins Innere der Zelle vermitteln. Ras-Proteine funktionieren als Schlüsselproteine für die Regulation der Zellproliferation, des Zellzyklus (Gille und Downward, 1999) und der Differenzierung (Marshall, 1995). Weitere wichtige Funktionen sind der Einfluss auf die Apoptose über Integrine vermittelte Signalübertragung (Clark und Hynes, 1996) und die Regulation der Angiogenese (Howe und Juliano, 1998).

H-Ras-, N-Ras- und K-Ras4B-Proteine bestehen aus 188 Aminosäuren, K-Ras4A dagegen aus 189 Aminosäuren (Lowy und Willumsen, 1993). K-Ras4A und K-Ras4B entstehen durch alternatives RNA-*splicing*. Sie unterscheiden sich in den letzten 23 Aminosäuren des C-Terminus (Barbacid, 1987; Khosravi-Far *et al.*, 1998). Innerhalb der ersten 86 Aminosäuren sind die vier Ras-Isoformen identisch. In diesem Bereich befinden sich die sogenannten *switch region1* und *switch region2* (Boriack-Sjodin *et al.*, 1998). Die *switch region1* (AS 32-40) ist für die Interaktion mit Effektorproteinen notwendig und stellt daher die Effektordomäne dar. Die *switch region2* (AS 63-73) ist an der Ras-

Aktivierung beteiligt, indem sie den Guaninnukleotid-Austausch vermittelt. Die letzten 25 AS der Proteine umfassen die hypervariable Domäne, welche abgesehen vom CAAX-Motiv (C = Cystein, A = aliphatische AS, X = Serin oder Methionin) in ihrer Aminosäuresequenz in den Isoformen stark variiert (Lowy und Willumsen, 1993).

Ras-Proteine werden als Vorläufer-Proteine im Zytosol der Zelle synthetisiert und erfahren eine posttranslationale Modifikation, um mit der Plasmamembran zu interagieren. Die Modifikation erfolgt in mehreren Schritten am CAAX-Motiv der carboxyterminalen Domäne. Als ersten Schritt wird der Cystein-Rest des CAAX-Motivs farnesyliert (Reiss *et al.*, 1990). Anschließend wird das farnesylierte Protein an die zytosolische Membran des Endoplasmatischen Retikulums gebracht, wo die Endopeptidase Rce 1 durch Proteolyse das AAX Tripeptid entfernt (Boyartchuk *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Otto *et al.*, 1999). Die  $\alpha$ -Carboxyl Gruppe des carboxyterminalen farnesylierten Cysteinrestes wird durch eine Isoprenylcystein-carboxyl Methyltransferase (Icmt) methyliert (Hrycyna *et al.*, 1991; Dai *et al.*, 1998). Während H-Ras, N-Ras und K-Ras4A einer Palmitoylierung an den Cystein-Resten ihrer hypervariablen Domäne unterzogen und über den Golgi-Apparat an die Plasmamembran transportiert werden, erreicht K-Ras4B über Mikrotubuli-abhängige Mechanismen oder über passive Diffusion die Plasmamembran (Choy *et al.*, 1999; Apolloni *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2000). Die Assoziation von K-Ras4B mit der Plasmamembran erfolgt über die carboxyterminalen Polylysin-Reste. Durch die posttranslationale Modifikation erhalten die Proteine einen hydrophoberen Charakter, welcher ihnen die Verankerung an die Membran ermöglicht und dadurch ihre biologische Aktivität bestimmt. Mittels einer Isoprenylierung werden die Ras-Proteine an der Membran verankert (Siddiqui *et al.*, 1998). Paz und Mitarbeiter konnten Galactin-1 als ein Ras-interagierendes Protein in der Plasmamembran identifizieren (Paz *et al.*, 2001). Dieses zur Familie der Lectine gehörende Protein tritt vermehrt in humanen Karzinomen auf und geht selektiv mit konstitutiv aktiven H-Ras (G12V) eine Bindung ein. Eine Überexpression von Galactin-1 korreliert mit einem erhöhten Gehalt an membranassoziierten und aktiven Ras-GTP und damit mit einer gesteigerten ERK-Aktivierung (Paz *et al.*, 2001), die wiederum transformierend wirkt.

Im Rahmen der Untersuchung der Membranassoziation der Ras-Proteine konnte eine unterschiedliche Verteilung der Isoformen in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Simons und Toomre, 2000). Hierbei handelt es sich um verschiedene Mikrodomänen der Membran mit unterschiedlicher Lipid- und/oder Proteinkomposition. Während sich K-Ras4B hauptsächlich in sogenannten *non-raft* Domänen befindet (Apolloni *et al.*, 2000;

Chen und Resh, 2001; Prior *et al.*, 2001; Niv *et al.*, 2002), ist H-Ras sowohl in *non-raft* als auch in *raft* Domänen der Plasmamembran verteilt. Durch Veränderung des Gehalts an GTP-gebundenen H-Ras-Protein kann das Vorkommen von H-Ras in *non-raft* Mikrodomänen erhöht werden (Prior *et al.*, 2001; Prior und Hancock, 2001). N-Ras-Proteine wurden sowohl in Kolokalisation mit H-Ras in der Plasmamembran als auch in *Caveolae* gefunden. Das sind in der Plasmamembran invaginierte und durch Caveolin aggregierte *lipid rafts*. Zudem konnte N-Ras in zellulären Ausläufern und Filopodien nachgewiesen werden (Rebollo *et al.*, 1999).

Aufgrund der identischen Ras-Effektor-Domäne (AS 32-40) der Ras-Isoformen wurde zunächst eine einheitliche Funktion für alle Ras-Proteine angenommen. Einige Studien belegen allerdings, dass die einzelnen Ras-Isoformen unterschiedliche zelluläre Funktionen wahrnehmen könnten (Carbone *et al.*, 1991; Maher *et al.*, 1995; James *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1998; Jones und Jackson, 1998). Die Entdeckung der unterschiedlichen Lokalisation der Ras-Proteine in der Plasmamembran bekräftigt die Hypothese einer isoformspezifischen Verteilung der Funktionen. Ein weiterer Hinweis für die Hypothese der unterschiedlichen Funktionen ist das unterschiedliche Vorkommen der Ras-Mutationen in humanen Karzinomen. Während veränderte K-Ras-Proteine vor allem in epithelialen Tumoren zu finden sind, kommen mutierte N-Ras-Proteine hauptsächlich in Tumoren des hämatopoetischen Systems vor. H-Ras-Mutationen treten selten in Karzinomen auf (Fujita *et al.*, 1984; Bos *et al.*, 1987; Visvanathan *et al.*, 1988). Ein weiterer Anhaltspunkt für die unterschiedliche Funktion der Isoformen ist, dass die Ras-Isoformen in verschiedenen Zellsystemen unterschiedliche Effektoren stimulieren und damit unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Ein Beispiel hierfür ist die stärkere Beteiligung von K-Ras an der Aktivierung von Raf-1 in RIE-1 epithelialen Zellen und NIH3T3 Zellen sowie Rat-1 Fibroblasten im Vergleich zu H-Ras. Im Gegensatz dazu ist H-Ras deutlich stärker in den Prozess der *focus formation* involviert (Jackson *et al.*, 1999). Außerdem unterstützen Studien mit *knockout* Mäusen die Hypothese der isoformspezifischen Funktion. *Knockout* Mäuse ohne Expression von H-Ras- und N-Ras-Proteinen weisen keine lebensbedrohlichen Defekte auf, während die Deletion des *K-ras* Gens embryonal letal ist (Umanoff *et al.*, 1995; Koera *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1997).

### 3.2.1 Ras-Aktivierung

Ras-Proteine wechseln wie andere GTP-bindende-Proteine in der Zelle zwischen zwei Aktivitätszuständen: dem aktiven GTP-gebundenen und dem inaktiven GDP-gebundenen Zustand. Im Ruhezustand sind bis zu 99,75 % des vorhandenen Ras an GDP gebunden (Buday und Downward, 1993; Scheele *et al.*, 1995; Li und Zhang, 2004). Die Aktivität von Ras und damit die Komplexbildung mit GTP wird durch eine Vielzahl externer Stimuli reguliert. Nach der Bindung eines extrazellulären Liganden, wie zum Beispiel EGF an den entsprechenden Rezeptor, kommt es zu seiner Dimerisierung und Aktivierung dieser Rezeptortyrosinkinase. Es folgt eine Autophosphorylierung von spezifischen Tyrosin-Resten in intrazellulären Regionen des Rezeptors und die Bindung von Adaptorproteinen wie z.B. Grb2 über *src homology 2* (SH2)-Domänen, welches im Komplex mit SOS vorliegt. Ras bindet zunächst mit einer geringen Affinität an SOS, welches die Abspaltung von GDP von Ras bewirkt. Dadurch entsteht ein hochaffiner Ras-SOS Komplex. Anschließend bindet GTP, das in einer höheren Konzentration in der Zelle vorkommt als GDP, an diesen Komplex und verdrängt SOS (Feig, 1999). Da SOS den GDP-GTP-Austausch beschleunigt, wird es auch *guanine nucleotide exchange factor* (GEF) genannt. Zur Gruppe der GEFs gehört eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine. Zu erwähnen sind unter anderem C3CG, p140Ras GRF, smgGDS, Vav (Denhardt, 1996) oder RasGRP1 bis 4 (Yang *et al.*, 2002; Reuther *et al.*, 2002) und RalGDS, PLC $\epsilon$  (Jin *et al.*, 2001). In verschiedenen Arbeiten konnten putative Präferenzen der Ras-GEFs in Bezug auf die Aktivierung der Ras-Isoformen dargestellt werden. So scheint RasGRF1 selektiv H-Ras und nicht N-Ras oder K-Ras4B zu aktivieren (Jones und Jackson, 1998). RasGRF2 aktiviert nur H-Ras (Gotoh *et al.*, 2001). Ebenso zeigen SOS1 und SOS2 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* unterschiedliche Präferenzen in der Ras-Aktivierung: SOS1 aktiviert alle vier Ras-Isoformen, während SOS2 selektiv H-Ras stimuliert (Liu *et al.*, 1993; Ohba *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001).

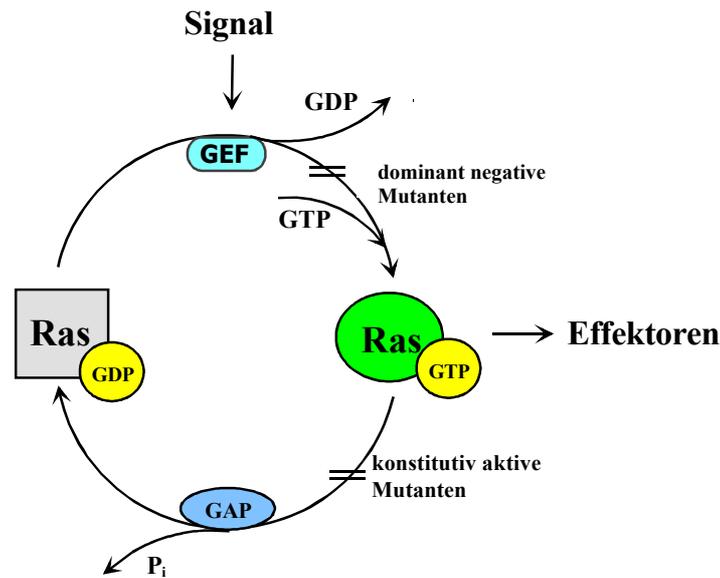
Im GTP-gebundenen, aktivierten Zustand können Ras-Proteine durch die Bindung an unterschiedlichen Effektorproteinen verschiedene Signaltransduktionswege regulieren. Zu den wichtigsten und am besten untersuchten Effektoren gehört die Signalweiterleitung an die Serin/Threonin Kinase Raf, die im nächsten Kapitel näher erläutert wird. Ein weiterer Effektor von Ras ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Mit ihrer katalytischen Untereinheit p110 interagiert sie direkt mit GTP-gebundenem Ras (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994). Durch die Aktivierung der PI3K wird die Translokation von PH-Domänen-

enthaltenden Proteinen, wie z.B. Akt/PKB und Btk (Katso *et al.*, 2001) an die Plasmamembran vermittelt, wo diese Proteine z.B. durch Phosphorylierung aktiviert werden. Eine Ras-Isoform-spezifische Präferenz der PI3K-Aktivierung konnte in COS-7 Zellen dargestellt werden, in denen aktives H-Ras die PI3K effizienter als K-Ras4B aktiviert (Yan *et al.*, 1998). Durch die Aktivierung der PI3K kann Ras auch die Aktivität von Proteinen der Rho-Familie regulieren. Die Bindung von PI3K an SOS, Vav oder Tiam1 aktiviert die GTPase Rac1 (Nimnual *et al.*, 1998; Han *et al.*, 1998; Michiels *et al.*, 1995). Ras kann jedoch auch unabhängig von der PI3K Rac1 aktivieren. Auch hier konnten isoformspezifische Unterschiede dargestellt werden: K-Ras4B bewirkt eine stärkere Rac1-Aktivierung als H-Ras. Dies konnte in Versuchen mit K-Ras4B (G12V)-exprimierenden REF-52 Zellen dargestellt werden, welche im Vergleich zu H-Ras-exprimierenden Zellen eine gesteigerte Rac1-induzierte Zellmotilität aufwiesen (Voice *et al.*, 1999; Walsh und Bar-Sagi, 2001).

Aufgrund der langsamen intrinsischen GTPase-Aktivität der Ras-Proteine, welche nicht zu einer Deaktivierung der Ras-Proteine im Sinne einer effizienten Funktion als Signaltransduktionsprotein ausreichen würde, wird die Inaktivierung der Ras-Proteine über GTPase-aktivierende Proteine, *GTPase-activating proteins* (GAP), reguliert (Trahey und McCormick, 1987). GAPs katalysieren die Hydrolyse von Ras-GTP um ein  $10^5$ faches (Gideon *et al.*, 1992; Denhardt, 1996). In den letzten Jahren konnte eine Anzahl von Ras-GAPs identifiziert werden. Hierzu gehören unter anderem p120RasGAP, Neurofibromin, GAP1<sup>m</sup> und p100 GAP1<sup>m</sup> (Lowy und Willumsen, 1993; Denhardt, 1996; Parrini *et al.*; 1997). Onkogene Ras-Mutanten sind durch eine gestörte intrinsische GTPase-Aktivität und durch Insensitivität gegenüber GAPs gekennzeichnet (Scheffzek *et al.*, 1997). In vielen Karzinomen ist die Regulation der Ras-Aktivierung infolge einer Punktmutation im Kodon 12, 13, 59, 61 oder 63 von Ras gestört. Die häufigste Mutation findet in Kodon 12 statt. Die Mutation bewirkt einen Austausch von Glycin gegen Valin bzw. Asparaginsäure (Bos, 1989; Clark und Der, 1993). Diese Mutation erhöht die Affinität von Ras zu GTP und zudem werden die intrinsische GTPase-Aktivität von Ras und die Affinität zu GAPs reduziert (Bos, 1989; Trahey und McCormick, 1987). Somit verbleibt Ras im GTP-gebundenen aktivierten Zustand. Die Aktivierung der Ras-Proteine kann eine zelluläre Transformation mit gesteigerter Proliferation zur Folge haben. Diese deregulierte Proliferation wird auf eine permanente Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade zurückgeführt (Hamilton und Wolfman, 1998).

---

Neben den konstitutiv aktiven Mutanten konnten dominant negativ wirkende Alterationen in Ras-Proteinen charakterisiert werden (Sigal *et al.*, 1986; Feig und Cooper, 1988; Matallanas *et al.*, 2003). Durch eine Punktmutation vor allem in Kodon 15, 16 oder 17 kommt es zu einem Austausch von Serin gegen Asparagin insbesondere in Position 17. Die inhibierende Wirkung entsteht durch die höhere Affinität der Mutanten zu GEFs ohne nachfolgenden Nukleotidaustausch und eine erniedrigte Affinität zu Guaninnukleotiden. Die Affinitätsveränderungen werden durch den Verlust der  $Mg^{2+}$ -Bindung bedingt, an deren Stabilisierung die Aminosäure Serin beteiligt ist (Feig, 1999). Aufgrund dieser Veränderungen entsteht ein stabiler Ras-GDP-GEF-Komplex, welcher die Bindung von nachfolgenden Effektorproteinen verhindert. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Expression einer dominant negativen Mutante die Aktivierung der wildtypischen Ras-Isoformen durch Sequestrierung der GEFs blockiert (Stewart und Guan, 2000). Zusätzlich wurden unterschiedliche Spezifitäten in der inhibierenden Funktion der H-, N- und K-Ras (S17N)-Mutanten beobachtet. So war H-Ras (S17N) fähig, alle drei Ras-Isoformen zu inhibieren. K-Ras (S17N) blockierte die K-Ras- und in geringerem Maße auch die H-Ras-Aktivität. N-Ras (S17N) übte lediglich auf N-Ras-Proteine einen negativen Einfluss aus (Matallanas *et al.*, 2003). Abbildung 1 zeigt schematisch den Aktivierung/Deaktivierungs-Zyklus von Ras.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aktivierung und Deaktivierung von Ras.** Externe Signale aktivieren den GDP/GTP-Austausch an Ras-Proteinen. GEFs beschleunigen den Austausch von GDP zu GTP und das inaktive GDP-gebundene Ras wird in den aktiven GTP-gebundenen Zustand überführt. Nachfolgend interagiert Ras mit zahlreichen intrazellulären Effektoren. GAPs katalysieren die Hydrolyse von GTP zu GDP und das Ras-Protein wird wieder inaktiviert. Konstitutiv aktive Mutanten verbleiben im aktiven GTP-gebundenen Zustand. Dominant negative Mutanten dagegen können nicht in den aktiven Zustand übergehen.

### 3.2.2 Die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade

Ras spielt in der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und Transformation eine zentrale Rolle (Marshall, 1995; Gille und Downward, 1999). Ein für diese Prozesse entscheidender Signaltransduktionsweg ist die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade, eine der am besten charakterisierten Ras-abhängigen Signaltransduktionswege (van Biesen *et al.*, 1996). In Bezug auf Tumorzellen bedeutet dies, dass konstitutiv aktives Ras permanent die Raf-MEK-ERK-Kaskade stimuliert und somit zu einer verstärkten Proliferation der Zellen beiträgt. Die durch Phosphorylierung aktivierte *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), ein Protein der Familie der *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), transloziert in den Nukleus, aktiviert dort Transkriptionsfaktoren, die wiederum zur Erhöhung der DNA-Synthese und einer vermehrten Zellproliferation führen (Graves *et al.*; 1997).

Den ersten Schritt in der Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Kaskade stellt die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Raf dar. Bei Säugern sind drei Isoformen bekannt: A-Raf, B-Raf und c-Raf-1 (Rapp *et al.*, 1988). Aufgrund des überwiegenden Vorkommens von c-Raf-1 in humanen Zellen wird im Weiteren nur noch auf dieses Protein eingegangen. Strukturell besteht Raf aus den drei hochkonservierten Regionen CR1, CR2 und CR3, wobei die Regionen CR2 und 3 die regulatorischen Domänen *ras binding domain* (RBD) und *cysteine rich domain* (CRD) enthalten. Diese Regionen sind zur Bindung von Ras an Raf notwendig (Bruder *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1993; Brtva *et al.*, 1995). Zur Interaktion zwischen Ras und Raf ist eine Translokation von Raf an die Plasmamembran erforderlich, damit die volle katalytische Aktivität der Proteine erreicht werden kann (Leevers *et al.*, 1994; Stokoe *et al.*, 1994; Wittinghofer und Nassar, 1996). Die alleinige Translokation ist jedoch nicht ausreichend für eine maximale Aktivierung, die erst durch die Bindung weiterer wichtiger Faktoren ermöglicht wird. Hierzu gehören die 14-3-3 Proteine, Hsp90, p50, Phospholipide, Serin/Threonin- und Tyrosinkinase und der Ras-Kinase-Suppressor (Morrison *et al.*, 1997; Kolch, 2000; Dhillon *et al.*, 2002).

Die Aktivierung von c-Raf-1 durch Ras erfolgt in mehreren Schritten. Der genaue Mechanismus konnte allerdings noch nicht vollständig charakterisiert werden, es sind lediglich einzelne Teilschritte bekannt (Kerkhoff und Rapp, 2001; Dhillon *et al.*, 2002). So kommt es zu einer Dephosphorylierung von c-Raf-1 an Serin259 (Jaumot und Hancock, 2001; Kubicek *et al.*, 2002) und Phosphorylierung weiterer Reste, unter anderem von Serin338 und Tyrosin341 (Mason *et al.*, 1999). In den weiteren Reaktionen sind ferner Lipid-Modulatoren wie zum Beispiel Phosphatidyl-Serin involviert. Sie entfernen das 14-3-3 Protein und bilden einen Ras-unabhängigen Anker für c-Raf-1 (Clark *et al.*, 1997; McPherson *et al.*, 1999; Rizzo *et al.*, 2000; Hekman *et al.*, 2002). Aktiviertes Raf assoziiert über seine katalytische Domäne mit MEK, dabei wird MEK an Serin218 und Serin222 innerhalb seiner katalytischen Domäne phosphoryliert (Seger und Krebs, 1995; Denhardt, 1996). MEK, wovon in Säugern drei Isoformen (MEK1, MEK2 und MEK3) existieren, phosphoryliert seinerseits die beiden *extracellular signal-regulated kinases* ERK-1 und ERK-2, auch bekannt unter dem Namen p42 bzw. p44 *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), an Tyrosin- und Threoninresten innerhalb eines TEY-Motivs der Domäne VIII (Seger und Krebs, 1995; Denhardt, 1996; Campbell *et al.*, 1998). Nach der Aktivierung kann ERK sowohl nukleäre als auch nicht-nukleäre Effektoren phosphorylieren, wie z.B. Rsk, Mikrotubuli-assoziierte Proteine, cytosolische Phospholipase A2 und

Transkriptionsfaktoren Elk-1 (Graves *et al.*, 1997), c-Jun, c-Myc und c-Fos, welche mit der Regulation der Proliferation von Zellen assoziiert sind (Khosravi-Far, 1998). Zusätzlich wird die Protein-Synthese über MNK1 stimuliert und die Bildung von aktiven Cyclin D-CDK4-Komplexen erleichtert (Lavoie *et al.*, 1996; Whitmarsh und Davis, 2000). ERK kann aber auch durch die Phosphorylierung von c-Raf-1 und/oder MEK selbstregulierend in die Kaskade eingreifen (Davis, 1993).

### 3.3 GFP-Fusionsproteine

Zur Untersuchung der Funktion von ektopen Ras-Proteinen in PANC-1 Pankreaskarzinomzellen wurden EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine hergestellt. Das diesen Fusionsproteinen zugrunde liegende *green fluorescent protein* (GFP) wurde von Shimomura und Kollegen 1962 entdeckt (Shimomura *et al.*, 1962). Es stellte sich heraus, dass die Qualle *Aequorea victoria* bei der Übertragung von Energie des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Proteins Aequorin auf das GFP grünes Licht produziert (Shimomura *et al.*; 1962; Ward *et al.*, 1980). Das Gen für GFP wurde kloniert und anschließend charakterisiert (Prasher *et al.*, 1992; Inouye und Tsuji, 1994). Analysen der Expression sowohl in eukaryontischen als auch in prokaryontischen Zellen zeigten, dass die Fluoreszenz des GFP unabhängig von Kofaktoren, Substraten oder zusätzlichen Genen erfolgte. Weitere Vorteile des GFP ist die Stabilität gegenüber zahlreichen äußeren Einflüssen, wie Oxidation und Reduktion oder pH-Veränderungen, und die Stabilität gegenüber bestimmten Chemikalien (1 % SDS oder 8 M Harnstoff) oder Temperaturveränderungen (Chalfie *et al.*; 1994, Inouye und Tsuji, 1994; Wang und Hazelrigg, 1994). Die Fluoreszenz des GFP ist am ausgeprägtesten bei einer Zellkultivierung bei 15°C, bei 37°C nimmt sie um 25 % ab. GFP ist speziesindifferent und kann somit in jeder Spezies exprimiert werden, allerdings konnten Unterschiede in der Expression des Proteins und Stärke der Fluoreszenz beobachtet werden.

Strukturell stellt sich das Chromophor des Proteins als ein zyklisches Tripeptid dar, welches nur bei einer kompletten Einbettung im GFP fluoresziert (Cody *et al.*, 1993). Das GFP-Protein ist ein „11-Strang- $\beta$ -Rohr“, welches eine  $\alpha$ -Helix umgibt (Ormö *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Diese Konformation gewährleistet den Ausschluss von Lösungsmittel und Sauerstoff aus der Umgebung des Chromophors. Die Fähigkeit zur Fluoreszenz wird nach einer posttranslationalen Modifikation erreicht. Eine zyklische Reaktion und eine

Oxidation formen das Protein (Heim *et al.*, 1994; Davis *et al.*, 1995). Diese Schritte erfolgen entweder autokatalytisch oder werden durch ubiquitäre Faktoren unterstützt. Bis dato wurden zahlreiche Varianten des GFPs kloniert, darunter auch das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) von Clontech Laboratories Inc., USA, welches in dieser Arbeit verwendet wurde. Durch den Austausch von Phenylalanin in Position 64 gegen Leucin resultierte eine verbesserte Faltung des so mutierten GFP-Proteins bei 37°C. Der Austausch von Serin in Position 65 gegen Threonin optimierte die chromophore Ionisation. Eine unbeabsichtigte, aber neutrale Mutation führte zum Austausch von Histidin in Position 231 gegen Leucin (Cormack *et al.*, 1996). EGFP besitzt bei der Emission bei 507 nm eine 35fach stärkere Fluoreszenz als Wildtyp GFP (Cormack *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Für die Expression von EGFP-Fusionsproteinen gibt es zahlreiche Vektoren. Für diese Arbeit wurden hauptsächlich die Vektoren pEGFP-C2 und pEGFP-C3 benutzt. Durch die Verwendung solcher EGFP-Fusionsproteine kann deren Lokalisation unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Anregung bei 488 nm auch in lebenden Zellen untersucht werden (Flach *et al.*, 1994; Wang und Hazelrigg, 1994). Folglich ist die Verwendung der EGFP-Fusionsproteine zur Beobachtung der Zellen beim Vorgang der Migration oder anderen zellulären Prozessen geeignet. Bei der Herstellung von EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen wurde der EGFP-Anteil an den N-Terminus von Ras kloniert, da sich das CAAX-Motiv für die posttranslationale Modifikation C-terminal befindet und somit die Funktion des Ras-Proteins verändert werden könnte, wenn dort eine Fusionierung mit einem anderen Protein erfolgen würde.

### 3.4 Transfektion

Um fremde Gene in Säugerzellen einzuschleusen und damit deren Produkte exprimieren zu können, werden die entsprechenden cDNAs in Expressionsplasmide kloniert und an unterschiedliche Reagenzien gekoppelt. Bedingt durch die Kopplung an bestimmte Reagenzien wird die DNA in den Zellkern transportiert und dort aufgenommen. Dieser Vorgang wird Transfektion genannt.

Beim Vorgang einer transienten Transfektion wird die Fremd-DNA zwar in den Zellkern aufgenommen, aber nicht in das Genom der Zelle integriert. Durch den Transfer der DNA in die Zelle wird diese in mehrere Bruchstücke zerlegt und wieder verknüpft, es entstehen sogenannte Transgenome (Ruddle, 1979; Ruddle, 1980; Scangos *et al.*, 1981). Ihre Anzahl

verringert sich durch nukleolytischen Abbau und während der Zellteilung, da sie nicht an die Tochterzelle weitergegeben werden. Folglich erfolgt die Expression der Genprodukte lediglich in einem Zeitfenster von 12 bis 72 Stunden. Der Vorteil der transienten Transfektion ist, dass Analysen bereits 1 bis 3 Tage nach Gentransfer möglich sind und hohe Proteinexpressionsraten erzielt werden können. Im Gegenzug hierzu wird bei einer stabilen Transfektion die Fremd-DNA in das Genom der Zelle integriert und bei der Zellteilung weitergegeben. Allerdings nimmt nur ein geringer Anteil der Zellen die Fremd-DNA in ihr Genom auf. Zur Kultivierung und Selektion der transfizierten Zellen sind Antibiotika-Resistenzgene in den Plasmiden enthalten (Wigler *et al.*, 1979; Graf *et al.*, 1979; Lewis *et al.*, 1980).

Von den zur Verfügung stehenden unterschiedlichen Transfektionsmethoden wurde in dieser Promotionsarbeit die liposomenvermittelte Transfektion verwendet. Hierbei bilden Ultraschall-behandelte kationische Lipidmoleküle in wässriger Lösung positiv geladene Liposome, welche einen Komplex mit der negativ geladenen DNA eingehen und dabei bis zu 100 % der in Lösung vorhandenen Nukleinsäuren binden können. Dieser Liposomen-Nukleinsäuren-Komplex wird an der Zelloberfläche adsorbiert, fusioniert mit der Plasmamembran und wird in einem Endozytoseprozess in das Zytoplasma und in den Zellkern transportiert. Die Vorteile dieser Methode sind die Unempfindlichkeit gegenüber pH-Wertänderungen und die hohe Transfektionseffizienz (Felgner *et al.*, 1994).

Als weitere Transfektionsmethode sei die technisch aufwendige Mikroinjektion genannt, mit welcher zwar eine hohe Transfektionseffizienz erreicht werden kann, jedoch aufgrund der geringen Zellzahl (maximal 500 Zellen) keine biochemischen Analysen möglich sind (Abarzua *et al.*, 1995; Marrero *et al.*, 1998; Fenton *et al.*, 1998). Weiter sind die bereits 1962 etablierte Calcium-Phosphat-Präzipitation (Szybalski und Szybalska, 1962), die Elektroporation, die Polykation-vermittelte oder die durch Viren vermittelte Transfektion zu nennen.

### **3.5 Zielsetzung der Arbeit**

Das Pankreaskarzinom weist eine erhöhte Inzidenz von *K-ras*-Mutationen auf und Veränderungen des *K-ras* Gens scheinen bedeutsam für die Pathogenese des Pankreaskarzinoms zu sein. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Um die Auswirkung mutierter K-Ras-Proteine im Vergleich mit N-Ras-Proteinen auf die Raf-MEK-ERK-Kaskade zu analysieren, wurden wildtypische, konstitutiv aktive und dominant negative EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine hergestellt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Expression und die Aktivität dieser Fusionsproteine nach transienter Transfektion in Zellen der humanen Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 zu charakterisieren. Des Weiteren sollte ein mögliches unterschiedliches Verhalten der K- und N-Ras-Proteine hinsichtlich der Signalweiterleitung und deren Einfluss auf die MAP Kinase ERK-2 untersucht werden, um mögliche isoformspezifische Unterschiede zu erarbeiten.

## 4 Material

### 4.1 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid-Lösung (30 % m/V)	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose, <i>molecular biology grade</i>	Invitrogen, Leek, Holland
Ammoniumpersulfat (APS)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ampicillin, Natrium-Salz	Sigma, Taufkirchen
Aprotinin	Bayer, Leverkusen
BCA <i>Protein Assay Reagent A</i>	Pierce, Sankt Augustin
BCIP	AppliChem, Darmstadt
Bisacrylamid-Lösung (2 % m/V)	Roth, Karlsruhe
BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )	Serva, Heidelberg
<i>Coomassie brilliant blue R 250</i>	Serva, Heidelberg
<i>Donor calf serum</i> (Kälberserum)	Invitrogen, Leek, Holland
DMEM	Invitrogen, Leek, Holland
DMRIE-C Reagenz	Invitrogen, Leek, Holland
DMSO	Merck, Darmstadt
DTT	Roth, Karlsruhe
ECL™ <i>Western Blotting Detection Reagent</i> RPN 2106	Amersham Pharmacia, Freiburg
<i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent</i> <i>Substrate SuperSignal</i>	Pierce, Sankt Augustin
EDTA	Roche Diagnostics, Mannheim
EGF ( <i>epidermal growth factor</i> )	PePro Tech. Inc., Rocky Hill, New Jersey, USA
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)	Invitrogen, Leek, Holland
Gel-blotting-Papier GB002	Schleicher&Schuell, Dassel
Glutathion-Sepharose™ 4B	Amersham Pharmacia, Freiburg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, Taufkirchen

---

IPTG	Roche Diagnostics, Mannheim
Kanamycinsulfat	Serva, Heidelberg
Kodak X-Omat Röntgenfilme	Sigma, Taufkirchen
Kupfer (II)-Sulfat	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin	Serva, Heidelberg
L-Glutamin	Invitrogen, Leek, Holland
Magermilchpulver	Glücksklee
MBP (95-98) S5 Peptid	Thermo Hybaid, Ulm
NBT	AppliChem, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumglycerophosphat	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Natriumpyrophosphat	Sigma, Taufkirchen
NBT	AppliChem, Darmstadt
Nitrozellulosemembranfilter (0,45 µm)	Schleicher&Schuell, Dassel
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck-Schuschardt, Hohenbrunn
Pepstatin A	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Leek, Holland
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Polymax RT Entwickler/Fixierer ( Kodak )	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S-Lösung	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Boehringer, Ingelheim
Trichloressigsäure	Serva, Heidelberg
Tris	Amersham, Braunschweig
Triton X-100	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen, Leek, Holland
Trypton	Difco, Detroit, Massachussets, USA
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
<i>Yeast-Extract</i> (Hefe-Extrakt)	Serva, Heidelberg

Alle verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in p.a. Qualität von den Firmen Roth, Karlsruhe, Merck, Darmstadt und Sigma, Taufkirchen bezogen.

## 4.2 Radiochemikalien

$[\gamma^{32}\text{-P}]\text{ATP}$  (5000 Ci/mmol)                      Amersham, Braunschweig

## 4.3 Enzyme und Molekularbiologische Kits

Alkalische Phosphatase (aus Kälberserum)	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	AGS, Heidelberg; MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Sigma MAXI PREP Kit	Sigma, Taufkirchen
Strataprep EF Plasmid Midiprep Kit	Stratagene, Amsterdam, Holland

## 4.4 Molekulargewichtsmarker

### 4.4.1 Molekulargewichtsmarker für Agarosegelelektrophorese

BioSizer III ( $\lambda$ -DNA <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI gespalten)	AGS, Heidelberg
Fragmentgrößen in Basenpaare (bp)	21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125

## 4.4.2 Molekulargewichtsmarker für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

*High Molecular Weight* Standard Mixture (SDS-6H) Sigma, Taufkirchen

**Tabelle 1: HMW Molekulargewichtsmarker**

Protein	Molekulargewicht [kDa]
Myosin (Kaninchenmuskel)	205
$\beta$ -Galaktosidase ( <i>E.coli</i> )	116
Phosphorylase B (Kaninchenmuskel)	97,4
Albumin (Rind)	66
Albumin (Ei)	45
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	36

*Low Molecular Weight* Standard Mixture (SDS-7) Sigma, Taufkirchen

**Tabelle 2: LMW Molekulargewichtsmarker**

Protein	Molekulargewicht[kDa]
Albumin (Rind)	66
Albumin (Ei)	45
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	36
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	29
Trypsinogen (Rinderpankreas)	24
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	20,1
$\alpha$ -Lactalbumin (Kuhmilch)	14,2

## 4.5 Antikörper

### 4.5.1 Primäre Antikörper

Tabelle 3: primäre Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Verdünnung (in Waschpuffer)</b>
Anti HA (12CA5) IgG, # 1 583 816	Maus, monoklonal	Roche Diagnostics, Mannheim	1:1000
Anti-ERK-2 (MAPK)-(C-14), IgG, sc-154	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Californien, USA	1:1000
Anti-GFP (Klon 7.1+13.1) # 1814 460	Maus, monoklonal	Roche Diagnostics, Mannheim	1:1000
Anti-GFP, # 8362-1	Maus, monoklonal	Roche Diagnostics, Mannheim	1:500-1:1000
Anti-Phospho-p44/42 MAPK, IgG, # 9101S	Kaninchen, polyklonal	New England Biolabs, Beverly, USA	1:1000
Anti-pan-Ras (Ab-3), IgG, (OP40)	Maus, monoklonal	Oncogene, Research, San Diego, Californien, USA	1:1000
Anti-Rac1 IgG2b, R56220	Maus, monoklonal	Transduction Laboratories, Franklin Lakes, Indiana, USA	1:500

## 4.5.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 4: sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung (in Waschpuffer)
Anti-Kaninchen IgG, A-6154, HRP	Ziege	Sigma, Taufkirchen	1:1000
Anti-Maus, IgG, A-5278; HRP	Ziege	Sigma, Taufkirchen	1:1000
Anti-Maus, IgG (H+L); # 97012804; HRP	Ziege	Pierce, St. Augustin	1:5000
Anti-Kaninchen, IgG (H+L), #31460; HRP	Ziege	Pierce, St. Augustin	1:5000
Anti-Maus, IgG, A-3562; AP	Ziege	Sigma, Taufkirchen	1:2500
Anti-Kaninchen, IgG (H+L), #36234; AP	Maus	Dianova, Hamburg	1:1000

### Abkürzungen:

IgG: Immunglobulin; HRP: *horse-radish peroxidase*; AP: Alkalische Phosphatase

## 4.6 Prokaryontische und eukaryontische Zellen

### 4.6.1 *Escherichia coli* Stämme

DH5 $\alpha$  Clontech, ITC Biotechnology, Heidelberg

BL21 (DE3) Novagen/R&D Systems, Wiesbaden

## 4.6.2 Eukaryontische Zelllinien

PANC-1 CRL-1469 ATCC: *American Type Culture Collection*; Manassas, Virginia, USA  
Humane Pankreaskarzinomzelllinie epithelialer Morphologie (Lieber *et al.*, 1975). Eine Punktmutation im Kodon 12 des *K-ras*-Gens (GGT-GDT) führt zum Austausch von Glycin gegen Asparaginsäure und damit zu einem konstitutiv aktiven K-Ras-Protein (Giehl *et al.*, 2000)

## 4.7 Expressionsplasmide

### 4.7.1 Prokaryontische Plasmide

pGEX-2TK

Amersham Pharmacia, Freiburg

pGEX-2TK/RBD

Erhalten von Johannes Bos, Utrecht, Holland (Hermann *et al.* 1995; de Rooij und Bos, 1997)

pGEX-2TK/PAK-CD

Erhalten von John Collard, Amsterdam, Holland (Sander *et al.*; 1998)

## 4.7.2 Eukaryontische Plasmide

pEGFP-C3	Clontech, Palo Alto, Kalifornien, USA
pcDNA3/HA-ERK-2	Dr. J.S. Gutkind, Bethesda, Maryland, USA
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Leek, Holland
pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12V)	Frau PD Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12D)	Frau PD Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C2/K-Ras (S17N)	Frau PD Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C3/HA-H-Ras (S17N)	Frau PD Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C3/HA-N-Ras (G12)	Frau PD Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C3/HA-N-Ras (G12V)	Frau PD Dr. Klaudia Giehl

## 4.8 Standardlösungen und Medien

### 4.8.1 Standardlösungen

1 x PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1,5 mM CaCl <sub>2</sub> ; 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 7,4
1 x CMF-PBS	140 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,2
1 x TBS (Tris-gepufferte Saline)	50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5
5 x Tris-Glycin-Puffer	2 M Glycin; 250 mM Tris/HCl; 0,5 % (m/V) SDS; pH 8,5
Transferpuffer	25 mM Tris/HCl; 0,1 % (m/V) SDS; 1,5 % (m/V) Glycin; 20 % (V/V) Methanol; pH 8,3

## 4.8.2 Bakterien-Medien

Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium	1 % (m/V) Trypton; 1 % (m/V) NaCl; 0,5 % (m/V) Hefe-Extrakt; pH 7,5 (mit NaOH eingestellt), autoklaviert
Luria-Bertani ( LB )-Agarplatten	1 % (m/V) Trypton; 1 % (m/V) NaCl; 0,5 % (m/V) Hefe-Extrakt; 1,5 % (m/V) Agar; pH 7,5 (mit NaOH eingestellt) Nach dem Autoklavieren wurde das noch flüssige Medium in Kulturschalen gegossen.

Durch Zugabe von 25 µg/ml Kanamycinsulfat oder 75 µg/ml Ampicillin wurden flüssige LB-Selektionsmedien und Selektionsplatten hergestellt.

## 4.8.3 Zellkultur-Medien

Die verwendeten eukaryontischen Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle Medium*, ohne Natriumpyruvat, mit 4,5 g/l Glucose und Pyridoxin HCl (DMEM; Invitrogen, Leek, Holland) mit folgenden Zusätzen gezogen:

10 % (V/V) <i>fetal calf serum</i> (FCS)	Invitrogen, Leek, Holland
1 % (V/V) L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen, Leek, Holland
1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin (10000 IU, 10 mg/ml)	Invitrogen, Leek, Holland

Alle Zusätze wurden vor dem Gebrauch sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße).

## 4.9 Zellkultur-Materialien

Das Plastikmaterial für Zellkultur-Arbeiten wurde von den Firmen Falcon/Becton-Dickinson, Labor Schubert, München, oder Renner, Dannstadt, bezogen.

## 4.10 Geräte

AnalySIS-Dokumentationssystem, Doku 3.1	SoftImaging System, Münster
Axiovert 25 Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Beckman DU 640 Photometer	Beckman Instruments, München
Beckman Zentrifuge J2-HS (Rotoren: JA 10, JA 20)	Beckman Instruments, München
Certomat R Bakterienschüttler	Braun, Melsungen
CO <sub>2</sub> -Inkubator, Typ CB 210	WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Eppendorf Tischzentrifuge 5415-C	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge 5417-C	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop IX70	Olympus, Hamburg
Flüssigszintillationszähler LSC 2200 CA	Packard, Dreieich
Gelelektrophorese-Kammer Dual Mini, 8 x 10 cm	Sigma, Taufkirchen
Gelelektrophorese-Kammer (16 x 18 cm)	Hoefer, San Francisco, Californien, USA
Heraeus Sepatech Megafuge 1.0	Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart
Horizontalgelkammer	MBT-Brand, Heidelberg
Mischgerät REAX2	Heidolph, Kelheim
Minifuge GL	Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart
Netzgerät EPS200	Pharmacia Biotech, Freiburg
Peltier Thermal Cycler PTC 200	Biozyme, Hess. Oldendorf
<i>Sammy-Dry</i> -Blotkammer	Schleicher & Schuell, Dassel
<i>Speed Vac Concentrator</i> 5301	Eppendorf, Hamburg

---

Sicherheitswerkbank Hera Safe	Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart
Sonifier B-12	Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Tankblotkammer (B2157; 14 x 13 x 16 cm)	Sigma, Taufkirchen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

## 4.11 Software

GraphPad Prism®, 32 bit	GraphPad Software, San Diego, Californien,
Version für Windows95, Version2.01	USA
Micrografx Designer 7.0	Micrografx Inc., München
Micrografx Picture Publisher 7	Micrografx Inc., München
ImageQUANT 5.0 für Windows NT	Molecular Dynamics, Freiburg
AnalySIS-Dokumentationssystem, Doku 3.1	SoftImaging System, Münster

## 5 Methoden

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 Medien

Alle verwendeten Bakterienkulturen wurden in Luria-Bertani (LB)–Medium (siehe 4.8.2.) kultiviert. Durch Autoklavieren wurde das Medium sterilisiert.

Nach Autoklavieren des LB-Agars wurde es auf 60°C abgekühlt, bei Bedarf das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt und der LB-Agar in Einmalpetrischalen gegossen.

Zur Selektion von Bakterien wurden folgende Selektionsmedien verwendet:

LB <sup>Amp+</sup> -Medium:	75 µg/ml Ampicillin
LM <sup>Kana+</sup> -Medium:	25 µg/ml Kanamycinsulfat

#### 5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Plasmid-DNA wurde entsprechend ihres Molekulargewichtes in einem elektrischen Feld in einer Horizontalgelkammer mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente:

Tabelle 5: Trennungsbereich linearer DNA

Agarose [% in (m/V)]	Trennungsbereich linearer DNA (kB)
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3

Die Agarose wurde in 1 x TAE aufgekocht, auf 60°C abgekühlt und in Horizontalgelkammern der Größe 8,5 x 7,5 cm mit einem 10 oder 14 Taschenkamm gegossen. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer im Verhältnis 6:1 versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 bis 100 V für 30-60 min.

1 x TAE Puffer : 40 mM Tris/Acetat; 1 mM EDTA; pH 8,0

6 x DNA-Probenpuffer: 0,25 % (m/V) Bromphenolblau;  
0,25 % (m/V) Xylene Cyanol FF;  
30 % (V/V) Glycerin

### 5.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme schneiden die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen und ermöglichen so die Entstehung von linearer DNA mit glatten oder überstehenden Enden.

Standardansatz (analytischer Spaltansatz): 0,5-1 µg DNA  
0,5 µl Restriktionsenzym (5-10 U/µl)  
(AGS, Heidelberg)  
1 µl 10 x Restriktionspuffer  
(AGS, Heidelberg)  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl auffüllen

Der Spaltansatz wurde für mindestens 1 h bei der für das jeweilige Restriktionsenzym erforderlichen Temperatur inkubiert, die DNA anschließend elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Agarosegel für 5 min bei RT in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml in 1 x TAE) inkubiert und die DNA-Banden mittels UV-Beleuchtung bei  $\lambda = 312$  nm auf einem Transilluminator (Bachofer) visualisiert.

### 5.1.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen, Hilden, nach Angaben des Herstellers.

Eine weitere Möglichkeit war, die ausgeschnittenen Gelstücke durch silanisierte Glaswolle von Serva, Heidelberg, in 0,5 ml Eppendorf-Gefäß bei 4000 x g für 10 min bei RT zu zentrifugieren und die DNA im Durchfluss anschließend mit dem 5fachen Volumen 99,8%igen Ethanol (-20°C) und 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat (pH 7,0) über Nacht zu fällen (siehe 5.1.7.).

### 5.1.5 Ligation von DNA

Ligation ist die Verknüpfung von doppelsträngiger DNA durch Bildung einer Phosphodiesterbindung.

Ligationsansatz:

1 µl *Insert*-DNA (0,1-0,5 µg)  
1 µl Vektor-DNA (20-50 ng)  
1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl)(Roche  
Diagnostics, Mannheim)  
1 µl 10x Ligationspuffer (Roche  
Diagnostics, Mannheim)  
auf 10 µl mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen.  
Der Ansatz wurde für 16 h bei 15°C  
inkubiert

10 x Ligationspuffer (Roche Diagnostics,  
Mannheim):

660 mM Tris/HCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>;  
10 mM DTE; 10 mM ATP; pH 7,5

#### Ready-to-go-Ligation:

Die Standardreagenzien des Ligationsansatzes liegen hier in lyophilisierter Form vor und wurden durch 20 ng Vektor-DNA und 100 ng DNA-Fragment ergänzt. Der Ligationsansatz wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und für 45 min bei 15 °C inkubiert.

### 5.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Kleinere Mengen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des *NucleoSpin* Systems von Machery-Nagel, Düren, isoliert. Hierzu wurde eine 1,5 ml LB-Übernachtskultur mit Plasmid-DNA transformierter Bakterien hergestellt. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 220 Upm bei 37°C in LB<sup>Amp<sup>+</sup></sup>- oder LB<sup>Kana<sup>+</sup></sup>-Medium. Anschließend wurde die DNA entsprechend den Angaben des Herstellers aus den Bakterien isoliert.

Für die Gewinnung von größeren DNA-Mengen wurden 200 ml Bakterien-Flüssigkultur hergestellt, nachdem zuvor eine Einzelkolonie in 5 ml LB<sup>Amp<sup>+</sup></sup> - oder LB<sup>Kana<sup>+</sup></sup>-Medium vermehrt wurde. Die 200 ml Bakterienkultur wurde über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert und unter Verwendung des *StrataPrep® EF Plasmid Midiprep Kits*, Stratagen, La Jolla, Californien, USA, nach Angaben des Herstellers isoliert. Die erhaltene DNA wurde anschließend durch eine Ethanolfällung zusätzlich gereinigt und ankonzentriert.

### 5.1.7 Ethanolfällung von Plasmid-DNA

Zur Fällung der DNA aus wässrigen Lösungen wurde der Ansatz auf mindestens 100 µl Volumen aufgefüllt, 2 Volumen 100 % Ethanol (-20°C) sowie 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 7,0, hinzugefügt und über Nacht bei -20°C oder für 1 h bei -80°C präzipitiert. Anschließend wurde dieser Ansatz durch Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 14000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5414-C) pelletiert, mit 500 µl 70 % (V/V) Ethanol (-20°C) gewaschen und wiederum für 10 min bei 4°C bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das gewonnene DNA-Pellet wurde in einem Vakuumkonzentrator getrocknet und in einer angemessenen Menge ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 5.1.8 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung wurde spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Dabei entspricht eine Einheit bei einer optischen Dichte bei 260 nm ( $OD_{260 \text{ nm}} = 1$ ) einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  Doppelstrang-DNA. Die Konzentration der DNA lässt sich folgendermaßen bestimmen:

$$\text{DNA-Konzentration} = \frac{OD_{260} \times 50 \mu\text{g} \times \text{VF}}{1000 \mu\text{l}} \quad (\text{VF} = \text{Verdünnungsfaktor})$$

Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA-Lösung. Eine reine DNA-Lösung weist einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 auf. Abweichungen von diesem Wert beruhen auf Verunreinigungen durch z.B. Proteine oder Phenol/Chloroform.

## 5.2 Mikrobiologische Methoden

### 5.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien besitzen die Fähigkeit, fremde DNA aufzunehmen. Durch gezielte Veränderung der Kulturbedingungen im Labor (z.B. Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  oder Hitzeschock) kann Kompetenz induziert und somit die Transformation, d.h. die Aufnahme der DNA ermöglicht werden.

Eine Einzelkolonie oder 50  $\mu\text{l}$  einer Gefrierkultur des Bakterienstammes DH5 $\alpha$  wurde über Nacht unter Schütteln bei 220 rpm bei 37°C in LB-Medium inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 500  $\mu\text{l}$  entnommen, in 100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,3-0,4 weiterkultiviert. Die Zellen wurden anschließend in einem sterilen Polypropylenröhrchen für 5 min bei 2500 x g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 50 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$  (4 °C) resuspendiert. Die Bakterien wurden für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 2500 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$  mit 30 % (V/V) Glycerin (4°C) aufgenommen. Die Zellen konnten nun

entweder für eine Transformation weiterverwendet oder in 600 µl Aliquots nach Schockgefrieren im Ethanol/Trockeneisbad bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 5.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 100 µl TCM-Puffer sowie 0,1-1 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach kurzem Mischen wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 3 min. Der Ansatz wurde danach auf Eis abgekühlt, anschließend wurden 700 µl LB-Medium hinzugefügt und für 40 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Aus dem Ansatz wurden 100-500 µl entnommen, auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Antibiotika-resistente Kolonien wurden anschließend in 3 ml LB-Selektionsmedium überführt und zur weiteren Verwendung kultiviert.

TCM-Puffer: 10 mM Tris/HCl; pH 7,5; 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ;  
10 mM  $\text{MgCl}_2$

### 5.2.3 Expression und Aufreinigung von GST und GST-RBD

Ausgehend von einer Gefrierkultur BL21(DE3)/pGEX2TK oder BL21(DE3)/pGEX2TK/RBD wurde eine 50 ml Vorkultur angelegt und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 200 rpm im Schüttler im  $\text{LB}^{\text{Amp}^+}$ -Medium inkubiert. Diese Kultur wurde 1:10 mit  $\text{LB}^{\text{Amp}^+}$ -Flüssigmedium verdünnt und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6-1 kultiviert. Nach Erreichen dieser optischen Dichte wurde die Expression von GST (Glutathion-S-Transferase) und GST-RBD (Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und der *Ras-binding-domain* RBD von c-Raf-1) durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert und für weitere 2 h bei  $30^{\circ}\text{C}$  und 200 rpm inkubiert. Die Kultur wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 6800 rpm für 10 min abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 15 ml Lysispuffer resuspendiert. Durch vierminütiges Sonicieren bei 50 Watt auf Eis wurden die Zellen aufgeschlossen und das Lysat mit Triton-X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1 % (V/V) versetzt. Dieser Ansatz wurde für 30 min *end-over-end*

bei 4°C inkubiert. Feste Zellbestandteile wurden mit Hilfe einer Zentrifugation für 10 min bei 11000 x g (Beckman Zentrifuge J2-HS, Beckman Instruments, München) bei 4°C vom Zytosol getrennt. Der Überstand enthielt das lösliche GST- bzw. GST-RBD-Protein. Damit das Lysat bei -80°C gelagert werden konnte, wurde Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 10 % (V/V) hinzugefügt. Das Lysat wurde aliquotiert und bei -80°C maximal 4 Wochen gelagert.

Die Bindungsfähigkeit von GST bzw. GST-RBD an Glutathion-Sepharose™ 4B *Beads* wurde überprüft, indem jeweils 50 µl, 100 µl und 200 µl des *E. coli*-Lysats mit 25 µl Glutathion-Sepharose™ 4B *Beads* bei Raumtemperatur für 30 min *end-over-end* inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und nach der Denaturierung für 5 min bei 95°C in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Durch Vergleich der Bandenstärken konnte die für die nachfolgenden Ras-GTP-Bindungsassays zu verwendende Menge an GST-RBD ermittelt werden.

Lysispuffer:

1 x PBS (siehe 4.8.1) mit 0,5 mM DTT;  
0,1 µM Aprotinin; 1 µM Leupeptin;  
1 µM Pepstatin A

## 5.3 Zellbiologische Methoden

### 5.3.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Alle Arbeiten mit eukaryontischen Zellen wurden steril in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Die Zelllinien wurden in DMEM mit 1 % (V/V) Glutamin (200 mM), 1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin (10000 IU, 10 mg/ml) und 10 % (V/V) FCS bei 37°C, 10 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Medienwechsel bis die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreicht hatten, dann wurden sie auf neue Kulturschalen verteilt.

### 5.3.2 Passagieren von Zellen mittels Trypsin-EDTA-Lösung

Adhärente, epitheliale Zellen bilden sowohl Zell-Substrat- als auch Zell-Zell-Kontakte aus. Diese Verbindungen können enzymatisch durch Trypsin gelöst werden, so dass die Zellen anschließend auf neue Kulturschalen verteilt werden können.

Die Zellen wurden einmal mit 5-10 ml CMF-PBS (37°C) gewaschen und anschließend mit 1-2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (37°C) für 1-5 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Nachdem die Zellen sich vom Boden der Kulturschale abgelöst hatten (Beobachtung unter dem Mikroskop), wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von mindestens einem Volumenteil serumhaltigen Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden anschließend vom Boden gespült und in ein steriles Zentrifugenröhrchen übergeführt. Die Zentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur für 3 min bei 200 x g. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in einem geeigneten Volumen serumhaltigem Kulturmedium resuspendiert und auf neue Kulturschalen verteilt.

Trypsin-EDTA-Lösung:	0,5 g Trypsin/l
	0,2 g EDTA/l
	1 x PBS
	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

### 5.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Damit die Zellzahl bestimmt werden konnte, wurden die Zellen wie in 5.3.2. beschrieben vom Boden der Kulturschale abgelöst und nach Zentrifugation in serumhaltigem Kulturmedium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 10 µl in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die Anzahl der Zellen in einem großen Quadrat mit einem Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup> berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} \times 10^4 = \text{Zellen/ml Medium}$$

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden mindestens zwei Quadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

### 5.3.4 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen

Das Einfrieren eukaryontischer Zellen - zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff - erfolgte in serumhaltigem Kulturmedium mit 20 % (V/V) FCS und 5 % (V/V) DMSO. Beim Wiederauftauen der Zellen musste das DMSO aufgrund seiner zytotoxischen Wirkung schnell entfernt werden. Dazu wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in einem Polypropylenröhrchen mit 9 ml serumhaltigen Kulturmedium verdünnt und bei 200 x g für 2 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 3 ml serumhaltigen Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in Zellkulturschalen (Ø 60 oder 100 mm) ausgesät.

### 5.3.5 Transiente Transfektion mit DMRIE-C-Reagenz

Eine transiente Transfektion ist dadurch gekennzeichnet, dass die aufgenommene Plasmid-DNA nicht ins eukaryontische Genom integriert wird, sondern als Plasmid gesondert im Zellkern vorliegt und dort exprimiert wird.

Das Transfektionsreagenz DMRIE-C (Invitrogen, Leek, Holland) enthält das Lipid 1,2-Dimyristyloxopropyl-3-dimethyl-hydroxy-ethyl-ammoniumbromid sowie Cholesterin in wässriger Lösung. Das Lipid bildet mit der DNA einen Komplex, welcher durch die Zellmembran ins Zellinnere und dann in den Zellkern gelangt.

Für eine Transfektion wurden  $3 \times 10^6$  Zellen in einer 10 cm Kulturschale ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Pro Transfektion wurden zwei Ansätze vorbereitet, im ersten Ansatz wurden 50 µl DMRIE-C Reagenz mit 450 µl DMEM ohne Zusätze gemischt, im zweiten Ansatz wurden 8 µg DNA und 500 µl DMEM ohne Zusätze gemischt. Die Ansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach vereinigt und für weitere 30 min inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen und mit 4 ml DMEM überschichtet, danach wurde der Transfektionsansatz zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 4 bis 5 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit CMF-PBS gut gewaschen und mit 10 ml serumhaltigen Kulturmedium überschichtet. Nach ca. 24 Stunden wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch DMEM ohne Zusätze ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für 4 h in einen Ruhezustand versetzt. Anschließend konnten die Zellen geerntet oder Stimulationsexperimente durchgeführt werden.

## 5.4 Proteinbiochemische Methoden

### 5.4.1 Herstellung von Zelllysaten

#### 5.4.1.1 Ras-RIPA-Extrakte zur Bestimmung der Ras-Aktivität

Für Stimulationsexperimente wurden die Zellen über Nacht für 16-20 h in DMEM-Medium ohne Zusätze inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen in DMEM mit 30 ng/ml EGF für 5 min inkubiert. Die Stimulation wurde durch zweimaliges Waschen mit 5 ml eiskaltem CMF-PBS gestoppt. Das CMF-PBS wurde vollständig von den Zellen abgesaugt und danach 500 µl Ras-RIPA-Puffer hinzugefügt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgeschabt und in ein kaltes Eppendorf-Gefäß übergeführt. Durch mehrmaliges Aufziehen in einer Spritze mit Kanüle (Nr. 18; 0,5 mm x 25 mm; Becton/Dickinson) wurde das Zelllysate homogenisiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 14000 x g abgetrennt und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß übergeführt. Anschließend erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung (s. 5.4.2.).

Ras-RIPA-Puffer :

50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl;  
0,1 % (m/V) SDS; 0,5 % (m/V) Natrium-  
desoxycholat; 1 % (V/V) Triton X-100; 0,1  
µM Aprotinin; 0,1 µM Leupeptin;  
1 mM PMSF

### 5.4.1.2 RIPA-Extrakte zur Bestimmung der ERK2-Aktivität

Die Stimulation der Zellen sowie die Herstellung der Zelllysate erfolgte wie in 5.4.1.1. beschrieben. Allerdings wurden dem RIPA-Puffer diesmal die Phosphatase-Inhibitoren (Natriumpyrophosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat, Natriumorthovanadat) zugesetzt.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl;  
0,1 % (m/V) SDS; 0,5 % (m/V)  
Natriumdesoxycholat; 1 % (V/V) Triton X-  
100; 10 mM Natriumpyrophosphat;  
25 mM  $\beta$ -Glycerophosphat;  
2 mM Natriumorthovanadat;  
2,1  $\mu$ g/ml Aprotinin; 1  $\mu$ M Leupeptin

### 5.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der colorimetrischen BCA-Methode (*bicinchoninic acid*) nach Smith *et. al.*, 1985.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass  $\text{Cu}^{2+}$  konzentrationsabhängig zu  $\text{Cu}^+$  reduziert wird, welches mit Bicinchoninsäure einen Komplex bildet, der bei 562 nm spektroskopisch nachweisbar ist. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 30  $\mu$ l, 40  $\mu$ l und 50  $\mu$ l einer Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) (2 mg/ml, Sigma, Taufkirchen) eingesetzt. Von der zu bestimmenden Proteinlösung wurden 10  $\mu$ l eingesetzt. Sowohl für die Eichwerte als auch für die Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

BCA-Reagenz: 10 ml BCA-Protein Assay Reagent A  
(Pierce, Sankt Augustin)  
200  $\mu$ l BCA-Protein Assay Reagent B  
( $\text{CuSO}_4$  Lösung) (Sigma, Taufkirchen)

Alle Proben wurden mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Endvolumen von 50  $\mu$ l aufgefüllt und anschließend je 1 ml BCA Reagenz hinzugefügt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37°C wurde die

Extinktion bei 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde über lineare Regression ermittelt.

### 5.4.3 Ras-GTP-Bindungsassay

Zur spezifischen Präzipitation von Ras-GTP wurde das Fusionsprotein GST-RBD verwendet, welches aus Glutathion-S-Transferase und der Ras-Bindungsdomäne RBD besteht.

Zur Präzipitation von Ras-GTP wurden 50 µl Glutathion-Sepharose™ 4B zweimal mit 500 µl Ras-RIPA-Puffer gewaschen und dabei zur Sedimentation der Glutathion-Sepharose™ 4B jeweils für 1 min bei 2700 x g bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden 150-200 µl GST-RBD-enthaltendes *E. coli*-Lysat (s. 5.2.3.) hinzugefügt und für 30 min bei RT und *end-over-end* Rotation inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden 50 µl Glutathion-Sepharose™ 4B mit 150–200µl GST-enthaltenden *E. coli*-Lysat versetzt, um eine unspezifische Bindung des Ras-GTP an GST zu überprüfen.

Nachdem ungebundenes GST-RBD durch dreimaliges Waschen mit je 300 µl Ras-RIPA-Puffer entfernt worden war, wurden jeweils 0,5-2 mg/ml Ras-RIPA-Zellysat hinzugefügt und für 2 h bei 4°C und *end-over-end* Rotation inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit je 300 µl Ras-RIPA-Puffer wurde das Präzipitat mit einer Hamilton Spritze trockengesaugt und mit 20 µl Probenpuffer versetzt. Die Detektion von Ras-GTP erfolgte durch Auftrennung der Proteinproben in einem 12,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel, die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im Immunoblot mit anti-pan-Ras und anti-Maus-HRP Antikörper und darauf folgender ECL-Entwicklung (s. 5.5.6.) detektiert.

---

Ras-RIPA-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,1 % (m/V) SDS; 0,5 % (m/V) Natrium-desoxycholat; 1 % (V/V) Triton X-100; 0,1 $\mu$ M Aprotinin; 0,1 $\mu$ M Leupeptin; 1 mM PMSF
SDS-Probenpuffer:	200 mM Tris/HCl, pH 8,8; 5 mM EDTA; 1 M Sucrose; 0,1 % (m/V) Bromphenolblau; 1 mM DTT; 2 % (m/V) SDS

#### 5.4.4 ERK-2-Phosphorylierungsassay

Mit Hilfe eines *in vitro*-Phosphorylierungsassays wurde die Aktivität immunpräzipitierter MAP Kinase ERK-2 bzw. HA-ERK-2 bestimmt.

##### 5.4.4.1 Immunpräzipitation:

Zur Immunpräzipitation der nach Transfektion (siehe 5.3.5.) transient in PANC-1 Zellen exprimierten HA-ERK-2 wurden 1  $\mu$ g des Anti-HA 12CA5 Antikörpers mit 30  $\mu$ l Protein-G-Agarose in 500  $\mu$ l RIPA-Puffer aufgenommen und für 30 min bei 4°C und *end-over-end* Rotation inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in 300  $\mu$ l RIPA-Puffer und anschließender Zentrifugation (1 min bei 2700 x g) entfernt. Je nach Transfektionseffizienz wurden anschließend 0,5-2 mg des RIPA-Lysats von PANC-1 Zellen in 500  $\mu$ l RIPA-Puffer zugefügt und für 2 h bei 4°C und *end-over-end* Rotation inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Das Präzipitat wurde einmal mit 300  $\mu$ l RIPA und zweimal mit Kinase-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 1 min, 4°C, 2700 x g). Anschließend wurden die Protein-G-Agarose-beads mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt und in 30  $\mu$ l Kinase-Puffer aufgenommen. Zur Kontrolle der Immunpräzipitation wurden jeweils 10  $\mu$ l des Ansatzes in einem 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert (s.a. 5.4.5.ff). ERK-2 wurde im Immunoblot mittels anti-ERK-2-Antikörper und anti-Kaninchen-Antikörper und anschließender alkalische

Phosphatase-Entwicklung detektiert. Die verbleibende Menge des Präzipitationsansatzes wurde für die Kinase-Reaktion verwendet.

#### Kinase-Reaktion:

Die Kinase-Reaktion wurde durch Zugabe von 5,2 µl des radioaktiven Reaktionsmixes gestartet. Die Ansätze wurden für 10 min bei 37°C inkubiert und dabei das ERK-Substrat MPB(*myelin basic protein*)-S5-Peptid von aktivierter ERK-2 phosphoryliert und dadurch radioaktiv markiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend auf p81-Phosphozellulose-Papier aufgetropft und getrocknet. Ungebundene Aktivität wurde durch dreimaliges Waschen (5 min, 30 min, 5 min) in 250 ml 180 mM Orthophosphorsäure entfernt. Nachdem die Filter kurz in Aceton gespült wurden, wurden sie in Szintillationsröhrchen überführt und die Aktivität im  $\beta$ -Counter als *counts per minute* gemessen.

RIPA-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,1 % (m/V) SDS; 0,5 % (m/V) Natriumdesoxycholat; 1 % (V/V) Triton X- 100; 10 mM Natriumpyrophosphat; 25 mM $\beta$ -Glycerophosphat; 2 mM Natrium- orthovanadat; 2,1 mg/ml Aprotinin; 1 µM Leupeptin
Kinase-Puffer:	15 mM Tris/HCl, pH 7,2; 15 mM MgCl <sub>2</sub> ; 100 mM DTT
Reaktionsmix:	2 µl ATP (20 µM); 0,2 µl [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP (10µCi); 3 µl MBP-S5-Peptid (10 mg/ml in 100 mM Tris/HCl, pH 7,4)

Peptidsequenz MBP-S5: Ala-Pro-Arg-Thr-Pro-Gly-Gly-Arg-Arg

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

Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung von Proteinen gemäß ihrem Molekulargewicht. Durch die Zugabe von SDS und durch das Kochen der Proteinproben bei 95°C werden die Ladungen der Proteine neutralisiert und die Konformation zerstört. Die Proteine erhalten durch SDS eine negative Nettoladung und wandern somit in einem elektrischen Feld zur Anode. Das Gel setzt sich aus zwei Gelstrukturen zusammen, dem eigentlichen Trenngel, in welchem die Proteine aufgetrennt werden und dem darüber liegenden Sammelgel, welches die Geltaschen zur Auftragung der Proteinproben enthält und zur Konzentrierung der Proteine an der Grenze zum Trenngel dient.

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasscheiben gegossen und anschließend zum Abschluss von Sauerstoff mit H<sub>2</sub>O-gesättigten 1-Butanol überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde das 1-Butanol entfernt, das Sammelgel darüber gegossen und mit einem 10 oder 14 Taschenkamm versehen. Das Pipettierschema für zwei kleine Gele der Größe 8 x 5 x 0,1 cm und für ein großes Gel der Größe 13 x 15 x 1,5 cm ist in Tabelle 7 wiedergegeben. Es wurden sowohl 10%ige als auch 12,5%ige Gele verwendet.

**Tabelle 6: Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen**

Lösungen	10 % (ml)	12,5 % (ml)	Sammelgel (ml)
30 % (m/V) Acrylamid	2,7	3,37	0,38
2 % (m/V) Bisacrylamid	1,08	1,35	0,15
3 M Tris/HCl, pH 8.8	1	1	
1 M Tris/HCl, pH 6,8			0,38
10 % (m/V) SDS	0,08	0,08	0,03
H <sub>2</sub> O	3,2	2,16	1,3
60 % (m/V) Saccharose			0,75
10 % (m/V) APS	40 µl	40 µl	30 µl
TEMED	4 µl	4 µl	5 µl

Den Proteinproben wurde mindestens 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer (5x konz.) zugefügt und die Proteine für 10 min bei 95°C denaturiert. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Geltaschen gründlich mit Tris-Glycin-Puffer gespült. Damit die Proteine gemäß ihrer Größe zugeordnet werden konnten, wurde zusätzlich zu den Proben eine Spur mit 10 µl Molekulargewichtsmarker beladen. Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V und je nach Acrylamidgehalt für 1-1,5 h.

Tris-Glycin-Puffer (1 x konz.):                    2 M Glycin; 0,25 M Tris/HCl, pH 8,5;  
0,5 % (m/V) SDS

SDS-Probenpuffer (5 x konz.):                    200 mM Tris/HCl, pH 8,8; 5 mM EDTA;  
1 M Saccharose;  
0,1 % (m/V) Bromphenolblau; 1 mM DTT;  
2 % (m/V) SDS

#### **5.4.6 Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Polyarylamid-Gelen**

Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel entweder über mehrere Stunden bei RT oder für 30-60 min bei 60°C in Coomassie-Blau-Färbelösung gefärbt. Zum Entfernen des gefärbten Hintergrundes wurde das Gel anschließend solange in Entfärbelösung eingelegt, bis der Hintergrund nicht mehr sichtbar und die Proteinbanden gut dargestellt waren. Die Entfärbung wurde ebenfalls über mehrere Stunden bei Raumtemperatur oder bei 60°C im Wasserbad durchgeführt.

Färbelösung:    0,03 % (m/V) *Coomassie Brilliant Blue R*  
250; 25 % (V/V) Isopropanol; 10 % (V/V)  
Eisessig

Entfärbelösung:                                      12,5 % (V/V) Isopropanol; 10 % (V/V)  
Eisessig

### 5.4.7 Immunoblot

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden beim Immunoblot in einem elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA85, 0,45  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schuell, Dassel) überführt und immobilisiert. Anschließend konnten einzelne Proteine mittels entsprechender Antikörper nachgewiesen werden.

#### **Tankblot:**

Nach der Gelelektrophorese wurden sowohl das Gel als auch die Nitrozellulose für kurze Zeit in Transferpuffer eingelegt. Anschließend wurden das Gel und die Nitrozellulose luftblasenfrei zwischen jeweils zwei Lagen ebenfalls in Transferpuffer getränkte Whatman Filter Papiere gelegt und mit Hilfe von zwei Plastikhalterungen in die Tankblot-Kammer (Renner GmbH, Dannstadt) gehängt. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 125 mA für 12 h. Die negativ geladenen Proteine wanderten dabei durch das Gel in Richtung Anode auf die Nitrocellulosemembran und wurden dort immobilisiert.

Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 8,3; 1,5 % (m/V)  
Glycin, 0,1 % (m/V) SDS; 20 % Methanol

#### **Semi-dry-blotting**

Bei diesem Blotverfahren floss der Strom in der Horizontalen zwischen zwei Graphitelektroden. Gel und Nitrocellulosemembran wurden ebenfalls wie beim Tankblot in Transferpuffer eingelegt und anschließend zwischen vier Lagen Whatman-Filterpapier (0,37 mm Dicke, Schleicher&Schuell, Dassel) gelegt, etwaige Luftblasen wurden zur Verbesserung des Proteintransfers und des Stromflusses entfernt. Der Transfer benötigte 1-2 h bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm<sup>2</sup>.

Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 8,3; 1,5 % (m/V)  
Glycin, 0,1 % (m/V) SDS; 20 % Methanol



### **Nachweis mittels HRP-gekoppelter Antikörper**

Nach Inkubation mit sekundären HRP (*horse radish peroxidase*) -gekoppelten Antikörper erfolgten zwei Waschschrirte in 0,5 % (m/V) Milchpulver in CMF-PBS, danach in CMF-PBS ohne Zusätze. Die Aktivierung der *horse radish-peroxidase* (HRP) erfolgte durch Inkubation in einem 1:1 Gemisch der ECL-Lösungen 1 und 2 (Pierce, Sankt Augustin) für ca. 5 min. Danach wurde auf die mit Frischhaltefolie abgedeckte Nitrozellulosemembran ein Röntgenfilm in der Dunkelkammer je nach Signalstärke für 1-30 min aufgelegt und anschließend entwickelt.

## **5.5 Statistik und verwendete Computerprogramme**

### **5.5.1 Statistik**

In allen Versuchen wurden die Werte durch Mehrfachbestimmungen ermittelt ( $n \geq 2$ ).

Aus den Mehrfachbestimmungen wurde der *standard error of the mean* (SEM) wie folgt ermittelt:

$$\mathbf{SEM} = \frac{\mathbf{SD}}{\sqrt{\mathbf{n}}}$$

SD = Standardabweichung; n = Anzahl der Bestimmungen

Die Standardabweichung (SD) quantifiziert die Variabilität. Sie wurde wie folgt berechnet:

$$\mathbf{SD} = \sqrt{\frac{\sum (\mathbf{y}_i - \mathbf{y}_{\text{mean}})^2}{\mathbf{n} - 1}}$$

$y_i$  entspricht einem Einzelwert,  $y_{\text{mean}}$  ist der Mittelwert aus allen  $y_i$ .

## **5.5.2 Verwendete Computerprogramme**

### **5.5.2.1 Densitometrische Auswertungen von *gescannten* Immunoblots**

Die Bandenintensitäten wurden zur Analyse der Expression der unterschiedlichen Proteine mit Hilfe des *ImageQuant* Programms der Firma Amersham, Freiburg ausgewertet.

### **5.5.2.2 Errechnung der Standardabweichung**

Die Errechnung der Standardabweichung und des *Standard of the mean* erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism® Version 2.01 der Firma GraphPad Software, San Diego, Californien, USA.

### **5.5.2.3 Bearbeitung der Abbildungen**

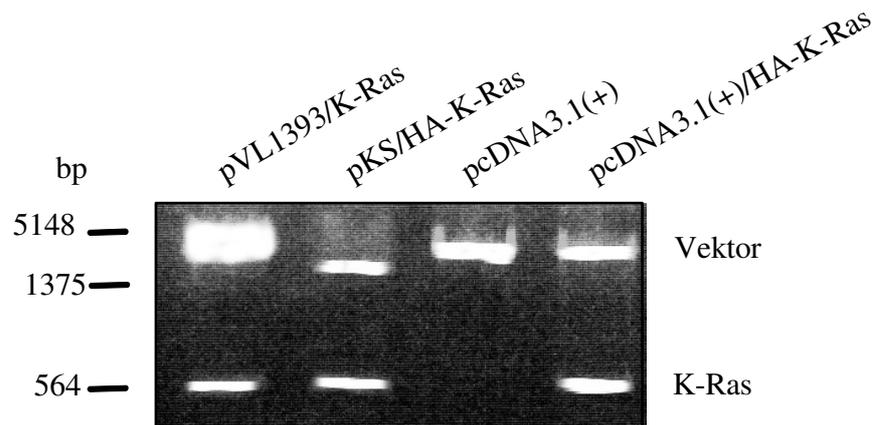
Die Bearbeitung und Darstellung der Abbildungen erfolgte mit Hilfe von Micrografx Designer 7.0 und Micrografx Picturr Publisher der Firma Micrografx Inc., München.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Klonierungen

#### 6.1.1 Klonierung der cDNA von K-Ras in pcDNA3.1/HA

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die cDNA von humanem K-Ras4B am 5'-Ende mit der Erkennungssequenz für einen HA-Antikörper zu versehen und in einen eukaryontischen Expressionsvektor zu klonieren. Anschließend sollten Zellen der humanen Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 mit diesem Plasmid transient transfiziert werden und die Expression und Funktionalität der transient exprimierten Proteine überprüft werden. Zunächst wurde die cDNA-Sequenz für K-Ras4B, im weiteren mit K-Ras bezeichnet, mittels der Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI* aus pVL1393/K-Ras herausgeschnitten und anschließend in den *pBlueskript* Vektor pKS/HA ligiert, welcher ebenfalls mit oben genannten Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Die Insertion der K-Ras cDNA in den Vektor wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das HA-K-Ras Fragment nach *HindIII/BamHI*-Restriktionsverdau aus pKS/HA-K-Ras isoliert und in den mit *HindIII/BamHI* hydrolysierten eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) ligiert. Die Abbildung 2 zeigt die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen hydrolysierten Plasmid-DNAs nach Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel.

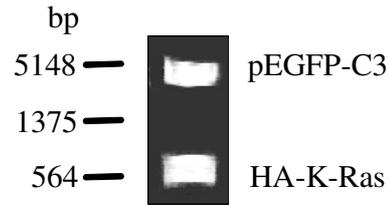


**Abbildung 2: Restriktionsanalyse von pcDNA3.1(+)/HA-K-Ras.** Zur Generierung des Expressionsvektors pcDNA3.1(+)/HA-K-Ras wurde die cDNA für K-Ras aus pVL1393/K-Ras mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI* herausgeschnitten (Spur 1). Anschließend wurde das K-Ras-Fragment in den Vektor pKS/HA kloniert, mittels der Restriktionsenzyme *HindIII* und *BamHI* aus diesem Vektor herausgeschnitten (Spur 2) und in pcDNA3.1(+)/*HindIII/BamHI* kloniert (Spur 3). Zur Überprüfung der pcDNA3.1(+)/HA-K-Ras-Klonierung wurde das Plasmid mittels *HindIII* und *BamHI* gespalten (Spur 4). Für jede Hydrolyse wurde 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt, die DNA anschließend in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und in Ethidiumbromid angefärbt. Als Größenstandard diente der DNA-Marker Lambda DNA/*EcoRI+HindIII*.

### 6.1.2 Klonierung von HA-K-Ras in pEGFP-C3

Da sich im Verlauf der Transfektionen von PANC-1 Zellen herausstellte, dass nach transienter Expression des pcDNA3.1(+)/HA-K-Ras Plasmids nur eine geringe Expression des HA-K-Ras-Proteins in den Zellen nachweisbar war, wurde die Klonierung eines zweiten Expressionssplasmids vorgenommen. Hierbei handelte es sich um einen Vektor, der für das fluoreszierende Protein EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) kodiert und die Expression eines EGFP-HA-K-Ras-Fusionsproteins ermöglicht. Bei der Klonierung von pEGFP-C3/HA-K-Ras wurde das HA-K-Ras-Fragment nach Hydrolyse mit *PstI* und *BamHI* aus pcDNA3.1(+)/HA-K-Ras isoliert und in pEGFP-C3/*PstI/BamHI* eingefügt. Die Insertion der HA-K-Ras cDNA wurde mittels Sequenzierung überprüft.

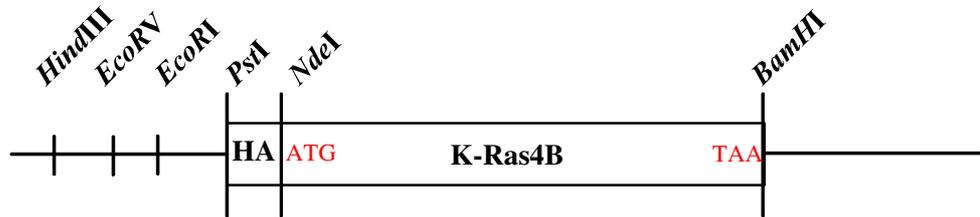
Die Abbildung 3 stellt das HA-K-Ras Fragment und den Vektor pEGFP-C3 nach Hydrolyse mit *PstI* und *BamHI* in einem 1%igen Agarosegel dar.



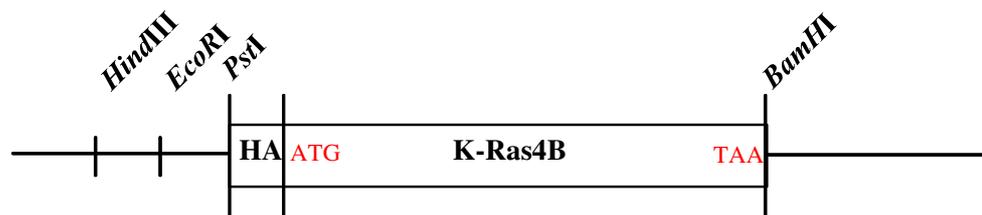
**Abbildung 3: Restriktionsanalyse von pEGFP-C3/HA-K-Ras** Zur Klonierung von pEGFP-C3/HA-K-Ras wurde die HA-K-Ras cDNA nach *PstI*-*BamHI*-Spaltung von pcDNA3.1(+)/HA-K-Ras die HA-K-Ras cDNA isoliert und in pEGFP-C3/*PstI*/*BamHI* eingefügt. Zur Überprüfung der Klonierung wurden 1 µg der pEGFP-C3/HA-K-Ras Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und die DNA in Ethidiumbromid angefärbt. Als Größenstandard diente der DNA-Marker Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII*. Es stellen sich die charakteristischen Banden von 5148 bp für pEGFP-C3 und 564 bp für HA-K-Ras dar.

Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung der beiden Klonierungen.

**pcDNA3.1(+)/HA-K-Ras**



**pEGFP-C3/HA-K-Ras**



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1(+)/HA-K-Ras und pEGFP-C3/HA-K-Ras.** Die cDNA für HA-K-Ras wurde als *HindIII*/*BamHI*-Fragment in pcDNA3.1(+) und als *PstI*/*BamHI* in pEGFP-C3 ligiert. Die genaue Beschreibung findet sich im Text. Die Lokalisation des HA-Epitops, des Start- und des Stopkodons sowie einiger Restriktionsenzyme ist angegeben.

Um die Eigenschaften von EGFP-HA-K-Ras mit anderen Ras-Isoformen und Mutanten zu vergleichen, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit folgende in Tabelle 8 aufgeführten Ras-Expressionsplasmide verwendet.

**Tabelle 7: Plasmide, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.**

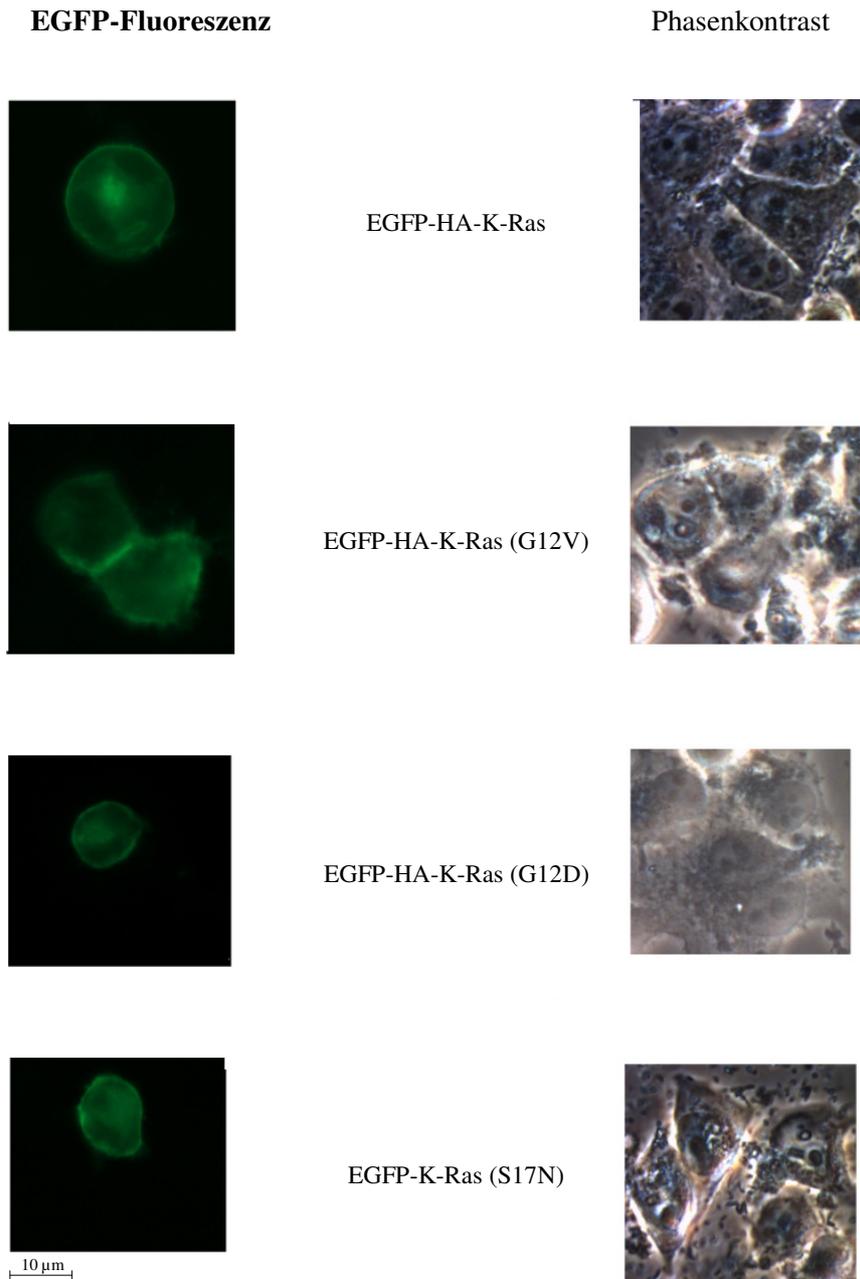
pVL1393/K-Ras	pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12V)
pKS/HA	pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12D)
pKS/HA-K-Ras	pEGFP-C2/K-Ras (S17N)
pcDNA3.1(+)	pEGFP-C3/HA-H-Ras (S17N)
pcDNA3.1(+)/HA-K-Ras	pEGFP-C3/HA-N-Ras (G12)
pEGFP-C3	pEGFP-C3/HA-N-Ras (G12V)
pEGFP-C3/HA-K-Ras	

## 6.2 Transiente Transfektion von PANC-1 Zellen

### 6.2.1 Lokalisation von transient exprimierten EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen in PANC-1 Zellen

Nachdem die cDNAs für die EGFP-HA-K-Ras-Fusionsproteine wie im vorherigen Kapitel beschrieben, kloniert worden waren, wurde die Expression und anschließend die Funktionalität dieser und weiterer K-Ras Fusionsproteine überprüft. Hierzu wurden die Plasmide transient in PANC-1 Pankreaskarzinomzellen transfiziert. Es wurden  $5 \times 10^4$  PANC-1 Zellen pro Loch einer 6-Lochplatte ausgesät und jeweils mit 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$  und 2  $\mu\text{g}$  pEGFP-C3/HA-K-Ras, pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12V), pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12D) und pEGFP-C2/K-Ras (S17N) transient transfiziert. Die Zellen wurden 4 bis 5 Stunden im Transfektionsreagenz-Ansatz inkubiert und dann in serumhaltigem Kulturmedium weiter inkubiert. Nach einer Expressionszeit von 24 Stunden in serumhaltigem Kulturmedium wurden die Zellen in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Die Abbildung 5 zeigt die fixierten Zellen in der Fluoreszenzdarstellung und im Phasenkontrast.

Nach Anregung der Zellen bei 488 nm mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops fluoreszierten die PANC-1 Zellen, welche die EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine exprimierten grün, nicht exprimierende Zellen waren unter diesen Bedingungen nicht sichtbar. Die Plasmamembran der EGFP-HA-Ras-Fusionsprotein-exprimierenden PANC-1 Zellen leuchtete heller als das Zytoplasma, was auf eine membranäre Lokalisation der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine hindeutete. Die membranäre Lokalisation dieser Fusionsproteine wurde in der Arbeitsgruppe in weiterführenden Versuchen bestätigt (U. Dreißigacker, Dissertation Universität Ulm).



**Abbildung 5: Fluoreszenz- und Phasenkontrastdarstellung von PANC-1 Zellen nach transienter Expression von EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen.** Es wurden  $5 \times 10^4$  PANC-1 Zellen pro Loch einer 6-Lochplatte ausgesät und mit  $2 \mu\text{g}$  pEGFP-C3/HA-K-Ras, pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12V), pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12D) und pEGFP-C2/K-Ras (S17N) transient transfiziert. Der Transfektions-Ansatz wurde nach 4 Stunden von den Zellen entfernt und die Zellen in serumhaltigem Kulturmedium inkubiert. Nach einer Expressionszeit von 24 Stunden wurden die Zellen in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Die linken Abbildungen zeigen die Zellen in Fluoreszenzdarstellung, die rechten Abbildungen stellen die Zellen im Phasenkontrast dar. Die Fluoreszenz der Plasmamembran der PANC-1 Zellen demonstriert die vorwiegende Lokalisation der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine an der Plasmamembran. Die Phasenkontrastaufnahmen stellen alle Zellen im Bildausschnitt dar. Maßstab  $10 \mu\text{m}$ .

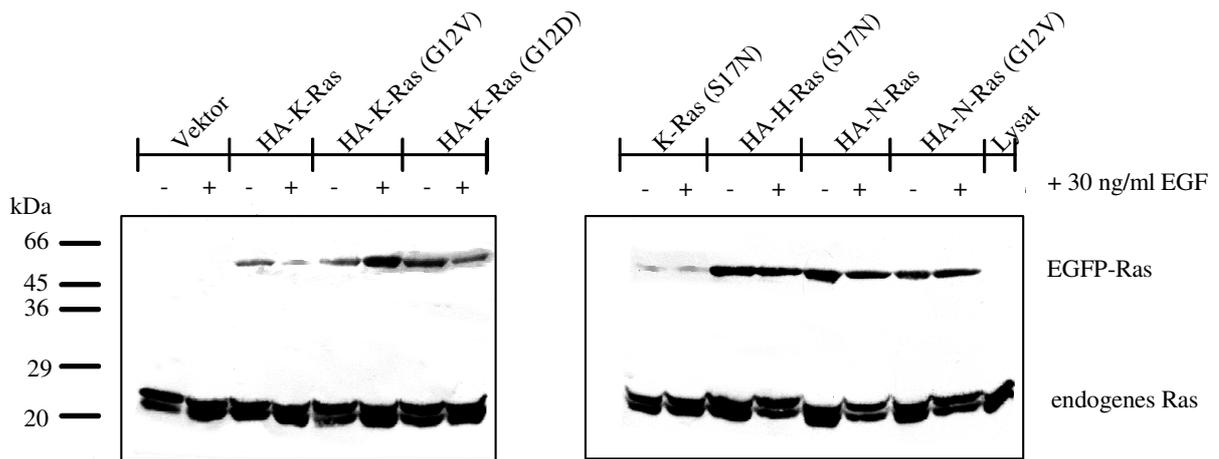
---

## 6.2.2 Nachweis der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine in Zelllysaten

Im nächsten Schritt wurde die Expression und Funktionalität der verwendeten EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine analysiert. Hierzu wurden transiente Transfektionen von PANC-1 Zellen durchgeführt und die Ras-Expression mittels Immunoblot-Verfahren dargestellt.

Zur Überprüfung der transienten Expression wurden pEGFP-C3, pEGFP-C3/HA-K-Ras, pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12V), pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12D), pEGFP-C2/K-Ras (S17N), pEGFP-C3/HA-H-Ras (S17N), pEGFP-C3/HA-N-Ras und pEGFP-C3/HA-N-Ras (G12V) mittels liposomenvermittelter Transfektion in zwei parallelen Versuchsansätzen transient in PANC-1 Zellen eingebracht. Nach einer Expressionszeit von 24 Stunden wurden die Zellen durch Inkubation in DMEM ohne Zusätze für 4 Stunden in einen Ruhezustand versetzt. Anschließend wurden die Zellen aus einem Versuchsansatz in RIPA-Puffer lysiert, die Zellen des zweiten Ansatzes wurden vor der Zellyse für 5 min mit 30 ng/ml EGF behandelt. Danach wurden 50 µg Gesamtprotein der Zelllysate in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mittels eines anti-Pan-Ras (OP40) Antikörpers und anschließender ECL-Entwicklung nachgewiesen.

Abbildung 6 stellt die Expression der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine und der endogenen Ras-Proteine nach einer exemplarischen transienten Expression dar.



**Abbildung 6: Nachweis der transienten Expression der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine in PANC-1 Zellen.** PANC-1 Zellen wurden mit 8 µg pEGFP-C3, pEGFP-C3/HA-K-Ras, pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12V), pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12D), pEGFP-C2/K-Ras (S17N), pEGFP-C3/HA-H-Ras (S17N), pEGFP-C3/HA-N-Ras und pEGFP-C3/HA-N-Ras (G12V) in zwei parallelen Versuchsansätzen transient transfiziert. Nach einer 24stündigen Inkubation in DMEM mit 10 % FCS wurden die Zellen für 4 h in DMEM ohne Zusätze in einen Ruhezustand versetzt. Ein Versuchsansatz wurde direkt nach dem Aushungern lysiert, der zweite Ansatz wurde vor der Zelllyse für 5min mit 30 ng/ml EGF behandelt. Anschließend wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Ras wurde im Immunoblot mit anti-Pan-Ras (OP40) und anti-Maus HRP Antikörper sowie anschließender ECL-Entwicklung detektiert. Die Position der Markerbanden ist gekennzeichnet.

Die Abbildung zeigt, dass PANC-1 Zellen die heterologen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine unterschiedlich stark exprimieren. Am stärksten wurde HA-H-Ras (S17N) exprimiert, gefolgt von HA-N-Ras. Die konstitutiv aktiven Mutanten HA-K-Ras (G12V) und HA-K-Ras (G12D) wurden stärker von PANC-1 Zellen produziert als die konstitutiv aktive Mutante HA-N-Ras (G12V). Die dominant negative Mutante K-Ras (S17N) zeigte die schwächste Expression in PANC-1 Zellen nach transienter Transfektion. Ferner zeigen die Ergebnisse, dass die Behandlung der PANC-1 Zellen mit 30 ng/ml EGF keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der heterologen und endogenen Ras-Proteine hatte. Die endogenen Ras-Proteine wurden bei Transfektion mit den EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen gleichmäßig exprimiert und zeigten keine Unterschiede.

Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften konnten die mit EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen transfizierten PANC-1 Zellen nach Anregung bei 488 nm unter dem

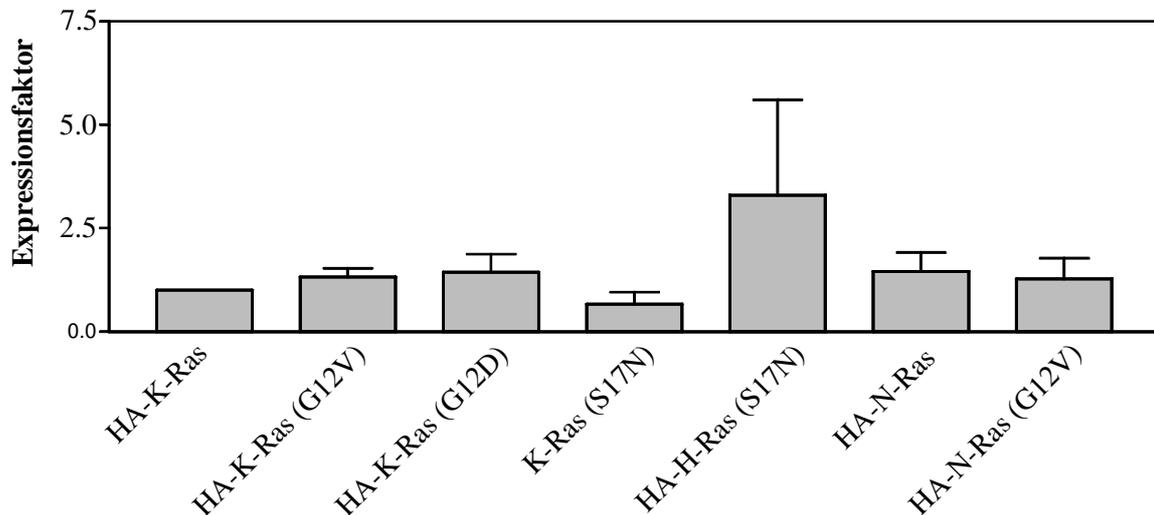
Fluoreszenzmikroskop analysiert werden, so dass die Transfektionseffizienz bestimmt werden konnte. Hierzu wurde die Anzahl der Zellen, welche das EGFP-HA-Ras-Fusionsprotein exprimierten, zur Anzahl der nicht exprimierenden und somit nicht fluoreszierenden Zellen zum Quotienten gesetzt. Die daraus resultierende Transfektionseffizienz wurde in Prozent angegeben. Durch Variation der Expressionszeit konnte gezeigt werden, dass die höchste Ausbeute an EGFP-HA-Ras-Fusionsprotein-exprimierenden Zellen bei einer Expressionszeit von 24 Stunden erzielt werden konnte, die Transfektionseffizienz entsprach 15-20 % (Daten nicht dargestellt).

### 6.2.3 Expressionsanalyse

Zur Quantifizierung der Expression der verschiedenen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine wurde eine densitometrische Messung der Bandenintensitäten durchgeführt, welche der Expression der unterschiedlichen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine entsprachen. Hierzu wurden entsprechenden Immunoblots die Expression von 4 unabhängigen transienten Transfektionen verwendet. Die jeweiligen Bandenintensitäten, welche der Expression der unterschiedlichen Proteine entsprachen, mit Hilfe des *ImageQuant*-Programms densitometrisch vermessen. Die Intensität der Bande, welche der Expression von EGFP-HA-K-Ras entsprach, wurde als Referenz verwendet. Die Intensitäten der übrigen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine wurden bestimmt, der Referenz zum Quotienten gesetzt und somit konnten die jeweiligen Expressionsfaktoren für die einzelnen Versuche bestimmt werden. Anschließend wurden aus den erhaltenen Werten die Mittelwerte und Standardabweichungen ( $\pm$  SD) der unterschiedlichen Expressionsfaktoren ermittelt und graphisch als Balkendiagramm (s. Abb. 7) dargestellt. Am stärksten wurde EGFP-HA-H-Ras (S17N) mit einem Expressionsfaktor von 3,30 ( $\pm$  3,25) in PANC-1 Zellen transient exprimiert, EGFP-HA-N-Ras erhielt den Expressionsfaktor 1,45( $\pm$  0,92), für EGFP-HA-K-Ras (G12D) betragen die Werte 1,43 ( $\pm$  0,76), für EGFP-HA-K-Ras (G12V) 1,32 ( $\pm$  0,40), für EGFP-HA-N-Ras (G12V) 1,27 ( $\pm$  0,99) und für EGFP-K-Ras (S17N) betrug der Expressionsfaktor 0,66 ( $\pm$  0,50). Damit konnte folgende Reihenfolge für die Expression der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine erstellt werden:

transiente Expression von H-Ras (S17N) > N-Ras > K-Ras (G12D) > K-Ras (G12V) > N-Ras (G12V) > K-Ras > K-Ras (S17N).

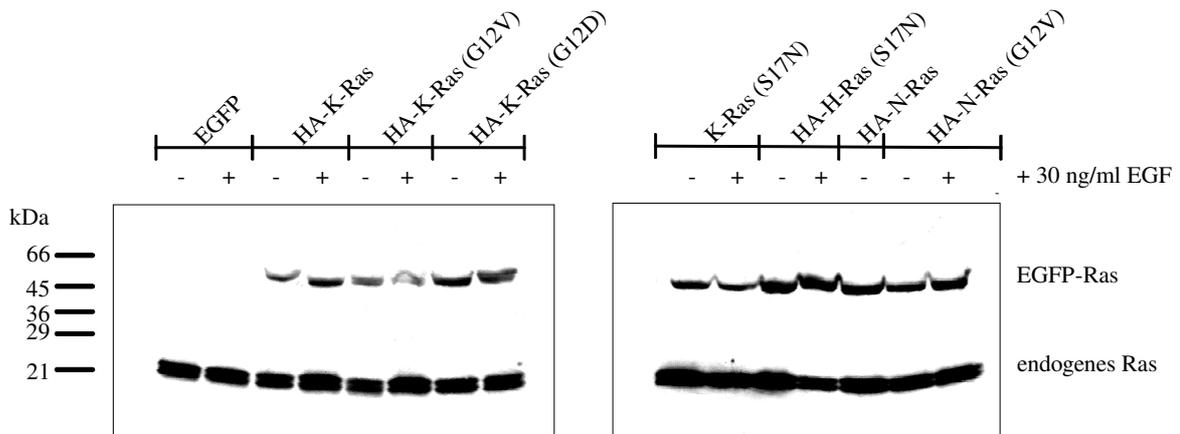
Die Abbildung 7 demonstriert die Analyse der Expression der EGFP-HA-Ras-Proteine von 4 transienten Expressionen.



**Abbildung 7: Quantifizierung der transienten Expression der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine in ruhenden PANC-1 Zellen.** Die Bandenintensitäten der entsprechenden Fusionsproteine wurden densitometrisch vermessen. Als Referenz (Expressionsfaktor = 1) wurde die Intensität der Bande, welche der Expression von EGFP-HA-K-Ras entsprach, verwendet. Die übrigen Intensitäten wurden der Referenz zum Quotienten gesetzt und damit die entsprechenden Expressionsfaktoren für die jeweiligen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine bestimmt. Aus 4 Versuchsreihen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen ( $\pm$  SD) ermittelt.

Die zuvor dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine in unterschiedlichen Mengen in PANC-1 Zellen exprimiert wurden. Diese Unterschiede können durch die leicht unterschiedlichen Transfektionseffizienzen (15-20 %) oder verschiedene zelluläre Regulationsmechanismen der Expression oder der Proteinstabilität erklärt werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher analysiert. Damit quantitative Vergleiche in den anschließenden Ras-GTP-Bindungsassays gezogen werden konnten, wurden die Bandenintensitäten der Isoformen nach Darstellung der Proteine im Immunoblot densitometrisch und visuell miteinander verglichen und die Expressionsverhältnisse der EGFP-Ras-Proteine bestimmt. Anschließend wurden die auf einen einheitlichen Ras-Gehalt angeglichenen Proteinlysate erneut in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Proteine im

Immunoblot dargestellt. Waren die Bandenintensitäten der EGFP-Ras-Isoformen gleich, so konnten daraus die Gesamt-Proteinmengen abgeleitet werden, die im nachfolgenden Ras-GTP-Bindungsassay eingesetzt wurden. Abbildung 8 zeigt die Proteine nach der Angleichung der EGFP-HA-Ras-Menge.

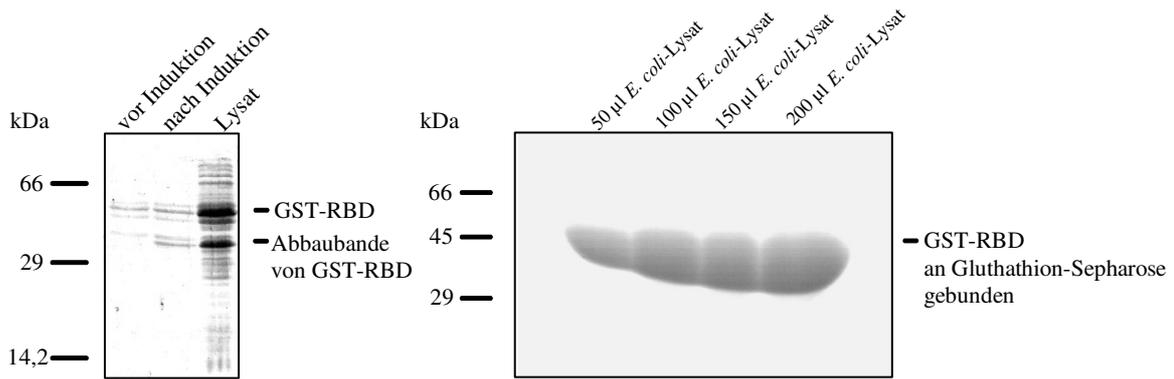


**Abbildung 8: Expression der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine nach Angleichen der Proteinmengen am EGFP-HA-Ras-Gehalt.** Um quantitative Vergleiche im Ras-GTP-Bindungsassay ziehen zu können, wurde die Proteinmenge der transient transfizierten PANC-1 Zellen, welche in Ras-RIPA-Puffer lysiert wurden, auf einen einheitlichen EGFP-HA-Ras-Gehalt angeglichen. Nach densitometrischem Angleich der EGFP-HA-Proteinmengen wurden die entsprechenden Gesamtproteinmengen in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und Ras im Immunoblot mit anti-Pan-Ras (OP40) und anti-Maus HRP und darauffolgender ECL-Entwicklung detektiert. Somit konnte überprüft werden, ob alle aufgetragenen Proben die gleiche Menge EGFP-HA-Ras-Protein aufwiesen.

## 6.2.4 Nachweis der EGFP-HA-Ras-Aktivität in transient transfizierten PANC-1 Zellen

### 6.2.4.1 Expression und Aufreinigung von GST-RBD

Zum Nachweis der Funktionalität der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine wurden Ras-GTP-Bindungsassays durchgeführt. Grundlage dieser Experimente ist, dass GTP-gebundenes und damit aktiviertes Ras eine etwa 100fach höhere Affinität zur Ras-Bindungsdomäne seines Effektors Raf hat als die GDP-gebundene Form. Um aktiviertes GTP-gebundenes Ras aus einem Zellysate zu isolieren, wurde ein Fusionsprotein aus GST (Glutathion-S-Transferase) und der *Ras binding domain* (RBD) von c-Raf-1 rekombinant in *E. coli* exprimiert. Dieses GST-RBD-Fusionsprotein wurde an Glutathion-Sepharose gekoppelt und anschließend mit einem PANC-1 Zellysate inkubiert, um GTP-gebundenes, aktives Ras zu isolieren. GST-RBD wurde in den *E. coli* Stämmen DH5 $\alpha$  oder BL21(DE3) exprimiert und anschließend durch Bindung an Glutathion-Sepharose aus dem Lysat aufgereinigt. Vergleichende Analysen der Expression des Fusionsproteins in diesen beiden *E. coli*-Stämmen zeigen, dass in BL21(DE3) eine höhere Konzentration des GST-RBDs erreicht werden konnte als in DH5 $\alpha$ -Kulturen. Darüber hinaus zeigte sich, dass die stärkste Expression bei einer Inkubation von 2 Stunden nach Induktion mit 0,1 mM IPTG bei 30°C erzielt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung der Expression von GST-RBD und seiner Bindung an Glutathion-Sepharose wurden jeweils 50  $\mu$ l Glutathion-Sepharose mit unterschiedlichen Mengen GST-RBD-exprimierenden *E. coli*-Lysate inkubiert und das Präzipitat anschließend nach mehrmaligen Waschen in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Durch Vergleich der Bandenstärken erfolgte eine semiquantitative Mengenbestimmung für den Einsatz im Ras-GTP-Bindungsassay. In einem Ras-GTP-Präzipitationsassay wurden etwa 30  $\mu$ g GST-RBD eingesetzt. In Abbildung 9 ist die GST-RBD-Expression in einem *E. coli*-Lysate in einem SDS-Polyacrylamid-Gel und Glutathion-Sepharose-präzipitiertes GST-RBD nach dem Transfer auf Nitrozellulose und Ponceau-S-Färbung dargestellt.



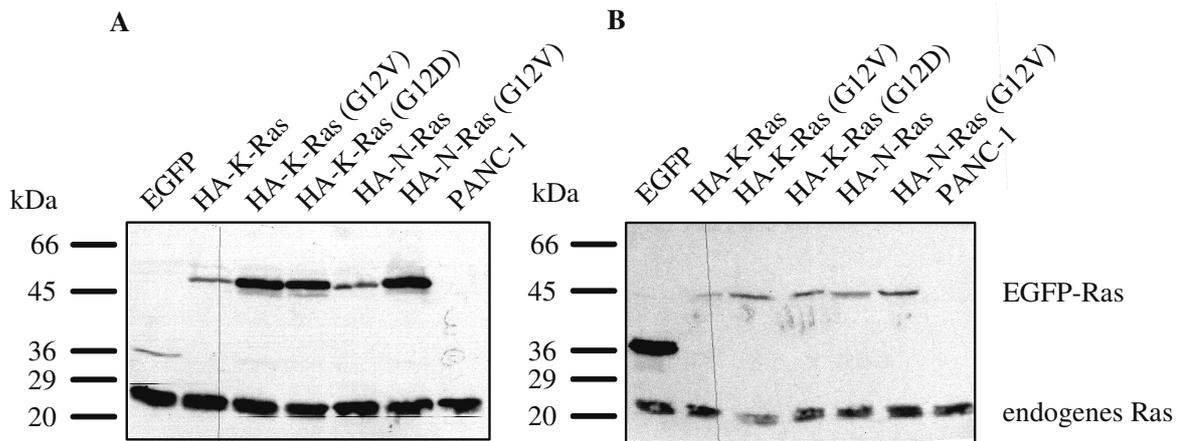
**Abbildung 9: SDS-Polyacrylamid-Gel der Expression und Präzipitation von GST-RBD.** GST-RBD-Fusionsproteine wurden in dem *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) exprimiert. Zur Analyse der Expression wurden vor Induktion der Expression mit 0,1 mM IPTG sowie nach 2stündiger Expression jeweils 1 ml Bakterienkultur entnommen, die Bakterien sedimentiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und die Proteine anschließend in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt. Die linke Abbildung zeigt ein exemplarisches Gel. Die Expression von GST und GST-RBD ist anhand der zusätzlichen Proteinbanden deutlich zu erkennen. Die rechte Abbildung zeigt exemplarisch die Bindung von GST-RBD an Gluthathion-Sepharose. Hierzu wurden jeweils 50 µl Gluthathion-Sepharose mit 50 µl, 100 µl, 150 µl und 200 µl GST-RBD-haltigen *E. coli*-Lysat inkubiert und anschließend im 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und die Membran mit Ponceau-Rot gefärbt. Die anschließenden Versuche wurden bei Verwendung mit der dargestellten GST-RBD-Präparation mit 150 µl *E. coli*-Lysat durchgeführt. Die Position der Markerbanden ist gekennzeichnet.

### 6.2.4.2 Bestimmung der Ras-Aktivität in ruhenden Zellen

Nachdem belegt werden konnte, dass die EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine in PANC-1 Zellen transient exprimiert wurden, wurde die Aktivität dieser Proteine überprüft. Hierzu wurde der Ras-GTP-Bindungsassay durchgeführt. Der spezifischen Präzipitation von Ras-GTP liegt zugrunde, dass GTP-gebundenes und damit aktives Ras mit einer 100fach höheren Bindungsaffinität an die Effektor-domäne RBD von c-Raf-1 bindet als GDP-gebundenes, inaktives Ras. Um den Ras-GTP-Gehalt der PANC-1 Zellen zu überprüfen und um damit einen Hinweis auf die Aktivität der unterschiedlichen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine zu gewinnen, wurden PANC-1 Zellen jeweils mit pEGFP-C3/HA-K-Ras, pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12V), pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12D), pEGFP-C2/K-Ras (S17N), pEGFP-C3/HA-N-Ras, pEGFP-C3/HA-N-Ras (G12V), pEGFP-C3/HA-H-Ras (S17N) sowie pEGFP-C3 transient transfiziert. Nach 24 Stunden Expressionszeit in serumhaltigem Kulturmedium wurden die Zellen für 4 Stunden durch Inkubation in DMEM ohne Zusätze in einen Ruhezustand versetzt. Anschließend wurden RIPA-Lysate hergestellt und die Expression der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine in 50 µg Gesamtprotein im Immunoblot mittels anti-Pan-Ras (OP40) Antikörpers detektiert. Da PANC-1 Zellen die EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine nach transienter Transfektion unterschiedlich exprimierten, mussten die Proteinmengen vor der Durchführung des Ras-GTP-Bindungsassays so aneinander angeglichen werden, dass gleiche Mengen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine im Ras-GTP-Bindungsassays eingesetzt wurden (s.a. 6.2.3.).

Für den Ras-GTP-Bindungsassay wurden 0,5 bis 1,5 mg des Gesamtproteins verwendet. Aktive, GTP-gebundene EGFP-HA-Ras-Proteine wurden durch Inkubation mit GST-RBD, welches zuvor an Glutathion-Sepharose gebunden wurde, aus den RIPA-Zelllysaten isoliert. Die Präzipitate wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und das durch Bindung an GST-RBD präzipitierte Ras-GTP im Immunoblot nachgewiesen. Als Kontrolle wurden Zelllysate von Zellen verwendet, die zum einen nur mit dem leeren Vektor und zum anderen nicht transfiziert worden waren. Zur Prüfung, dass gleiche EGFP-HA-Ras-Proteinmengen im Assay verwendet wurden, wurde ein Aliquot (jeweils ein Zehntel der im Ras-GTP-Bindungsassay verwendeten Proteinmenge) in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und Ras im Immunoblot detektiert.

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse eines repräsentativen Ras-GTP-Bindungsassays dargestellt.



**Abbildung 10: Nachweis der Aktivität der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine im Ras-GTP-Bindungsassay.**  $3 \times 10^6$  PANC-1 Zellen wurden mit jeweils  $8 \mu\text{g}$  pEGFP-C3, pEGFP-C3/HA-K-Ras, pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12V), pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12D), pEGFP-C3/HA-N-Ras und pEGFP-C3/HA-N-Ras (G12V) transient transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 Stunden im serumhaltigen Kulturmedium wurden die Zellen für 4 h in DMEM ohne Zusätze inkubiert und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. Pro Ansatz wurden  $30 \mu\text{g}$  GST-RBD an  $50 \mu\text{l}$  Glutathion-Sepharose gebunden und mit  $0,5\text{-}1,5 \text{ mg}$  PANC-1 Gesamtprotein inkubiert. Die Proben wurden anschließend in einem  $12,5\%$ igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine im Immunoblot mit anti-Pan-Ras (OP40) und anti-Maus HRP Antikörper, bzw. anti-GFP und anti-Kaninchen HRP Antikörper, sowie darauffolgender ECL-Entwicklung detektiert. Als Kontrolle wurden  $1 \text{ mg}$  eines Lysats von nicht transfizierten PANC-1 Zellen (PANC-1) und von Vektor-transfizierten PANC-1 Zellen (EGFP) verwendet. Dargestellt ist in (A) ein exemplarischer Bindungsassay. In (B) ist der dazugehörige Immunoblot abgebildet, auf welchem jeweils ein Zehntel der im Ras-GTP-Bindungsassay verwendeten Lysate aufgetrennt ist. Die EGFP-HA-Ras-Proteine und die endogenen Ras-Proteine wurden im Immunoblot mit oben genannten Antikörpern detektiert.

Im Ras-GTP-Bindungsassay konnte dargestellt werden, dass der Ras-GTP-Gehalt in PANC-1 Zellen, welche die konstitutiv aktiven EGFP-HA-Ras-Mutanten K-Ras (G12V), -K-Ras (G12D) und -N-Ras (G12V) exprimieren, höher ist als der Ras-GTP-Gehalt der wildtypischen EGFP-HA-Ras-Fusionsprotein-exprimierenden PANC-1 Zellen. Somit weisen die konstitutiv aktiven EGFP-HA-Ras-Mutanten K-Ras (G12V), -K-Ras (G12D) und -N-Ras (G12V) einen höheren Aktivitätszustand auf als die wildtypischen Formen. Außerdem zeigt die Abbildung, dass die Aktivität von K-Ras (G12D) vergleichbar mit der Aktivität von K-Ras (G12V) ist. Die Aktivität der konstitutiv aktiven Form N-Ras (G12V) ist höher als die der wildtypischen Form von N-Ras und höher als die Aktivität der konstitutiv aktiven Mutanten K-Ras (G12V) und K-Ras (G12D). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die dominant negativen Mutanten der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine K-Ras (S17N) und H-Ras (S17N) nicht an GST-RBD binden und somit nicht in GTP-gebundener Form in der Zelle vorliegen (siehe Abbildung 10). Im Kontroll-Immunoblot, in welchem ein Aliquot der im Assay eingesetzten Proteine aufgetragen wurde, konnte gezeigt werden, dass der unterschiedliche GTP-Gehalt in den verschiedenen PANC-1 Zellen nicht auf unterschiedlichen Proteinmengen beruhte, da die immunreaktiven Banden in Höhe 48 kDa, die den EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen entsprachen, gleich intensiv gefärbt waren.

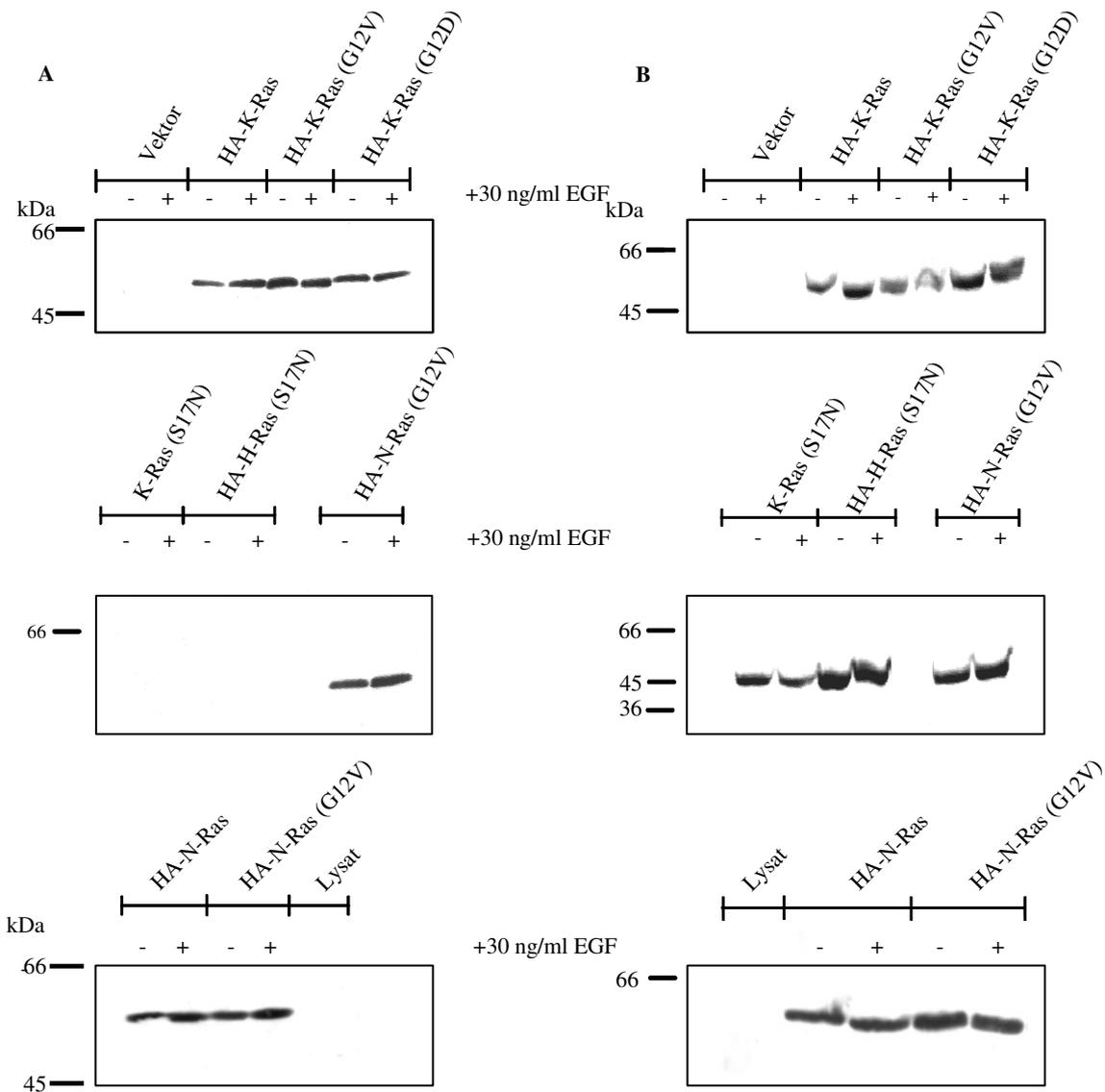
Die Ergebnisse der Ras-GTP-Bindungsassays zeigen, dass sich die wildtypischen und mutierten EGFP-HA-Ras-Proteine in ihrer Aktivität entsprechend ihrer Mutationen verhalten.

### 6.2.4.3 Bestimmung der Ras-Aktivität nach Stimulation der Zellen mit Wachstumsfaktoren

Nachdem die Aktivität der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine in ruhenden PANC-1 Zellen nach transienter Transfektion untersucht und nachgewiesen worden war, wurde die Aktivierbarkeit der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine in PANC-1 Zellen durch Wachstumsfaktoren bestimmt. Hierzu wurden die Zellen transient mit pEGFP-C3, pEGFP-C3/HA-K-Ras, pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12V), pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12D), pEGFP-C2/K-Ras (S17N), pEGFP-C3/HA-H-Ras (S17N), pEGFP-C3/HA-N-Ras und pEGFP-C3/HA-N-Ras (G12V) in zwei parallelen Versuchsreihen transfiziert und für 24 Stunden in serumhaltigem Kulturmedium inkubiert. Nach vierstündigem Aushungern in DMEM ohne Zusätze wurden die Ansätze einer Versuchsreihe für 5 Minuten mit 30 ng/ml EGF behandelt, die Ansätze der anderen Versuchsreihe blieben unbehandelt. Anschließend wurden RIPA-Zelllysate hergestellt und jeweils 50 µg Gesamtprotein in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Expression der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine wurde mit Hilfe des anti-Pan-Ras (OP40) Antikörpers im Immunoblot dargestellt.

Nach Angleichung der EGFP-HA-Ras-Proteinmengen in den unterschiedlichen Ansätzen auf einen einheitlichen EGFP-HA-Ras-Gehalt wurden Ras-GTP-Bindungsassays durchgeführt. Hierbei wurde GTP-gebundenes, aktiviertes Ras mit Hilfe von GST-RBD aus den Zelllysaten isoliert. Die Proteine wurden anschließend in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Ras-Proteine im Immunoblot mit einem anti-Pan-Ras (OP40)- und anti-Maus-Antikörper, sowie darauffolgender ECL-Entwicklung detektiert. Um zu kontrollieren, ob pro Probe die gleiche Ras-Proteinmenge eingesetzt worden war, wurde ein Zehntel der im Assay eingesetzt Proteinmenge in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Ras-Proteine ebenfalls mit anti-Pan-Ras (OP40)- und anti-Maus-Antikörpern im Immunoblot nachgewiesen.

Die Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Ras-GTP-Bindungsassays und die dazugehörigen Lysat-Kontrollen.



**Abbildung 11: Nachweise von Ras-GTP nach Behandlung transient transfizierter PANC-1 Zellen mit EGF.**  $3 \times 10^6$  PANC-1 Zellen wurden mit den unterschiedlichen EGFP-HA-Ras-Expressionsplasmiden in zwei parallelen Versuchsreihen transient transfiziert. Nach 24stündiger Inkubation in serumhaltigem Kulturmedium wurden die Zellen für 4 Stunden in serumfreien DMEM inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz einer Versuchsreihe direkt lysiert, der Ansatz der zweiten Versuchsreihe wurde für 5 min mit 30 ng/ml EGF behandelt und danach lysiert. GTP-gebundenes Ras wurde mit Hilfe von GST-RBD aus den Zelllysaten isoliert und anschließend im Immunoblot mit Hilfe von anti-Pan-Ras (OP40)- und anti-Maus Antikörpern und darauffolgender ECL-Detektion dargestellt. Spalte A zeigt den Ras-GTP-Gehalt der verschiedenen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine. Spalte B stellt die Immunoblots dar, die jeweils ein Zehntel der im Ras-GTP-Bindungsassay verwendeten Proteinmenge enthalten. Die Position der Markerbanden ist gekennzeichnet.

Durch die Behandlung der Zellen mit 30 ng/ml EGF konnte die Bindung der wildtypischen Proteine EGFP-HA-K-Ras und EGFP-HA-N-Ras an GST-RBD und damit die Aktivität der Proteine gesteigert werden. Die Bandenintensität der konstitutiv aktiven Formen EGFP-HA-K-Ras (G12V), EGFP-HA-K-Ras (G12D) und EGFP-HA-N-Ras (G12V) dagegen blieb unverändert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Aktivität der konstitutiv aktiven Mutanten EGFP-HA-K-Ras (G12V), -K-Ras (G12D) und N-Ras (G12V) nicht durch den Wachstumsfaktor EGF gesteigert werden kann. Die dominant negativen Formen EGFP-HA-H-Ras (S17N) und EGFP-K-Ras (S17N) interagierten nicht mit GST-RBD, eine Behandlung mit 30 ng/ml EGF bewirkte keine Änderung des Aktivitätszustands. Im Kontrollgel, in welchem ein Zehntel der im Ras-GTP-Bindungsassay verwendeten EGFP-HA-Ras-Protein-Menge aufgetragen wurde und die EGFP-HA-Ras-Proteine mittels entsprechender Antikörper im Immunoblot dargestellt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass die Unterschiede der Bindungsaffinität der EGFP-HA-Ras-Proteine an RBD verschiedenen Aktivitätszuständen zugrunde lagen und nicht durch unterschiedliche Proteinmengen verursacht wurden.

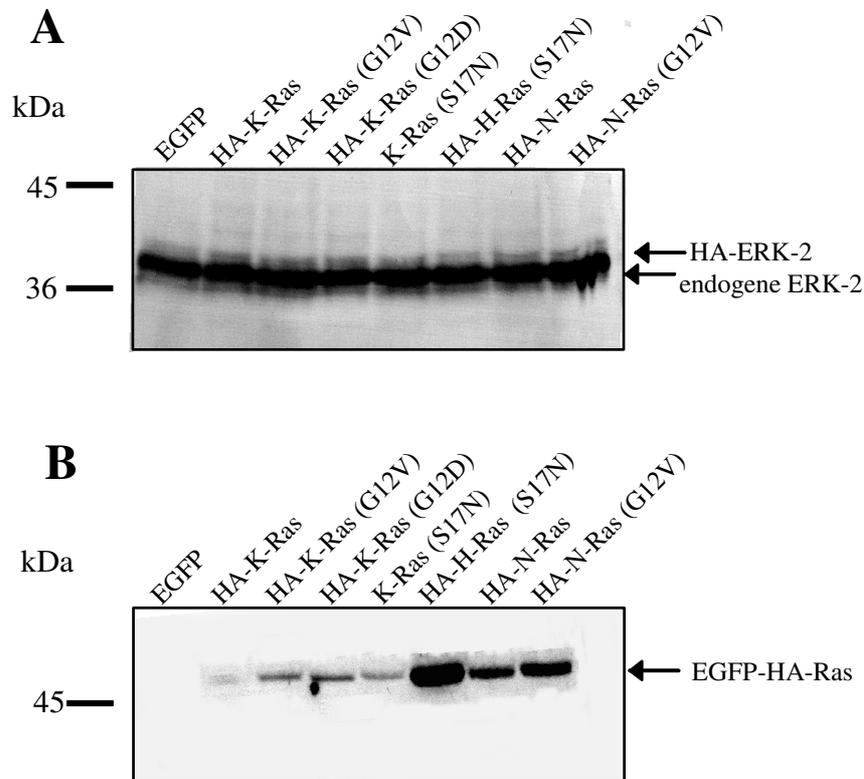
Zusammenfassend konnte durch diese Versuche gezeigt werden, dass die transient exprimierten EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine in PANC-1 Zellen aktiv waren. Im Ras-GTP-Bindungsassay konnten mutations- und isoformabhängige Bindungen an rekombinantes GST-RBD festgestellt werden. Die verschiedenen Bindungen entsprachen unterschiedlichen Aktivitätszuständen. Der Anteil GTP-gebundener EGFP-HA-Ras-Proteine und damit die Aktivität der wildtypischen Formen von EGFP-HA-K-Ras und -N-Ras konnte im Gegensatz zu den konstitutiv aktiven Mutanten K-Ras (G12V) und K-Ras (G12D) und N-Ras (G12V) durch die Behandlung ruhender PANC-1 Zellen mit 30 ng/ml EGF gesteigert werden. Dominant negative EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine interagieren nicht mit GST-RBD und liegen somit nicht im GTP-gebundenen Zustand vor.

## **6.3 Einfluss von EGFP-Ras auf die Aktivität von ERK-2**

### **6.3.1 Nachweis der Expression von EGFP-HA-Ras-Isoformen und HA-ERK-2 in RIPA-Lysaten**

Um den Einfluss einer transienten Expression von wildtypischen und mutierten EGFP-HA-K-Ras und EGFP-HA-N-Ras auf die Aktivität der MAP Kinase ERK-2 zu überprüfen, wurden pEGFP-C3, pEGFP-C3/HA-K-Ras, pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12V), pEGFP-C3/HA-K-Ras (G12D), pEGFP-C2/K-Ras (S17N), pEGFP-C3/HA-N-Ras sowie pEGFP-C3/HA-N-Ras (G12V) jeweils gemeinsam mit pcDNA3/HA-ERK-2 in PANC-1 Zellen kotransfiziert und die Proteine für 24 Stunden exprimiert (siehe auch 6.2.1.).

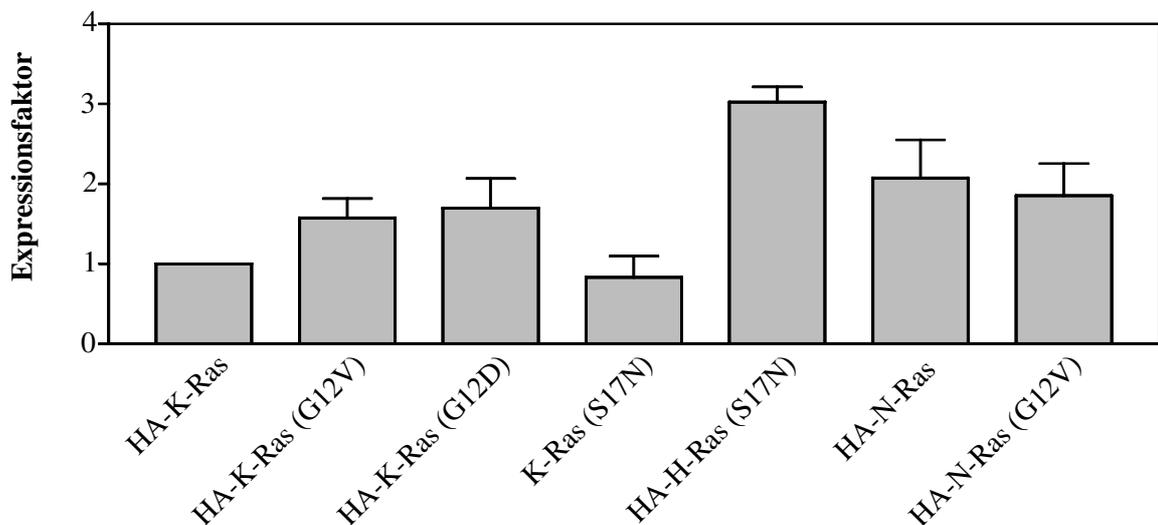
Zunächst wurde die Expression der HA-Ras-Konstrukte und der MAP Kinase HA-ERK-2 in den Zelllysaten mittels Immunoblot analysiert. Dazu wurden 50 µg des entsprechenden Zelllysats in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Proteinexpression mit anti-Pan-Ras (OP40) bzw. anti-ERK-2 Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. Abbildung 12 zeigt die Expression der koexprimierten Proteine.



**Abbildung 12: Nachweis von HA-ERK-2 und EGFP-HA-Ras-Isoformen nach transienter Expression im Immunoblot.**  $3 \times 10^6$  PANC-1 Zellen wurden jeweils mit  $8 \mu\text{g}$  pcDNA3.1(+)/HA-ERK-2 und  $8 \mu\text{g}$  der unterschiedlichen EGFP-HA-Ras-Expressionsplasmide kotransfiziert. Nach 24stündiger Inkubation in serumhaltigem Kulturmedium wurden die Zellen durch Inkubation in DMEM ohne Zusätze für 4 h in einen Ruhezustand versetzt. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen. Jeweils  $50 \mu\text{g}$  Gesamtprotein wurden in einem 10%igen (HA-ERK-2) bzw. 12,5%igen (EGFP-HA-Ras) SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die entsprechenden Proteine im Immunoblot detektiert. In (A) wurden HA-ERK-2 (schmale Bande) und endogene ERK-2 (dicke Bande) im Immunoblot mit anti-ERK-2 und anti-Kaninchen alkalische Phosphatase Antikörpern detektiert. Abbildung B zeigt die EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine, die im Immunoblot mit anti-Pan-Ras (OP40) und anti-Maus HRP sowie ECL-Entwicklung nachgewiesen wurden. Die Position der Markerbanden ist gekennzeichnet.

Entsprechend der Expressionsanalyse der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine bei Monotransfektion wurden die Expressionsfaktoren der Proteine bei Kotransfektion mittels densitometrischer Auswertung bestimmt. Die Intensität der Bande, welcher der Expression von EGFP-HA-K-Ras entsprach, wurde als Referenz verwendet (Expressionsfaktor = 1). Die Intensitäten der übrigen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine wurden der Referenz zum Quotienten gesetzt und somit die jeweiligen Expressionsfaktoren für die einzelnen Transfektionen bestimmt. Aus 4 transienten Transfektionen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen ( $\pm$  SD) der jeweiligen Expression der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine bestimmt und graphisch in einem Balkendiagramm (siehe. Abb. 13) dargestellt.

Abbildung 13 demonstriert die Expressionsfaktoren der HA-Ras-Isoformen nach Auswertung von 4 transienten Kotransfektionen.



**Abbildung 13: Analyse der Expression der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine bei Kotransfektion mit HA-ERK-2 in PANC-1 Zellen.** Zur Analyse der Expressionsfaktoren der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine bei Kotransfektion mit HA-ERK-2 wurden die Bandenstärken der unterschiedlichen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine densitometrisch mittels des *ImageQuant*-Programms bestimmt. Der Wert für EGFP-HA-K-Ras wurde für jeden Versuch als Referenz verwendet und gleich 1 gesetzt. Die densitometrischen Werte der anderen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine wurden der Referenz zum Quotienten gesetzt und damit die Expressionsfaktoren für die einzelnen Proteine bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SD) aus 4 unabhängigen transienten Transfektionen.

Die Analyse zeigt, dass EGFP-HA-H-Ras (S17N) mit einem Expressionsfaktor von 3,0 ( $\pm 0,37$ ) in PANC-1 Zellen am stärksten exprimiert wurde, gefolgt von EGFP-HA-N-Ras mit einem Faktor von 2,0 ( $\pm 0,95$ ), EGFP-HA-N-Ras (G12V) 1,8 ( $\pm 0,81$ ), EGFP-HA-K-Ras (G12D) 1,7 ( $\pm 0,73$ ), EGFP-HA-K-Ras (G12V) 1,6 ( $\pm 0,48$ ). Am schlechtesten wurde EGFP-K-Ras (S17N) mit einem Expressionsfaktor von 0,8 ( $\pm 0,37$ ) in PANC-1 Zellen transient exprimiert. Zusammenfassend konnte bei der Analyse der transienten Expression der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine bei Kotransfektion mit HA-ERK-2 in PANC-1 Zellen folgende Reihenfolge aufgestellt werden:

Expression von HA-H-Ras (S17N) > HA-N-Ras > HA-N-Ras (G12V) >

HA-K-Ras (G12D) > HA-K-Ras (G12V) > HA-K-Ras > K-Ras (S17N).

Somit werden bei Koexpression mit HA-ERK-2 H-Ras-Proteine in der dominant negativen Form und N-Ras-Proteine in der wildtypischen und konstitutiv aktiven Form stärker transient in PANC-1 Zellen exprimiert als die wildtypischen und konstitutiv aktiven Formen des K-Ras-Proteins.

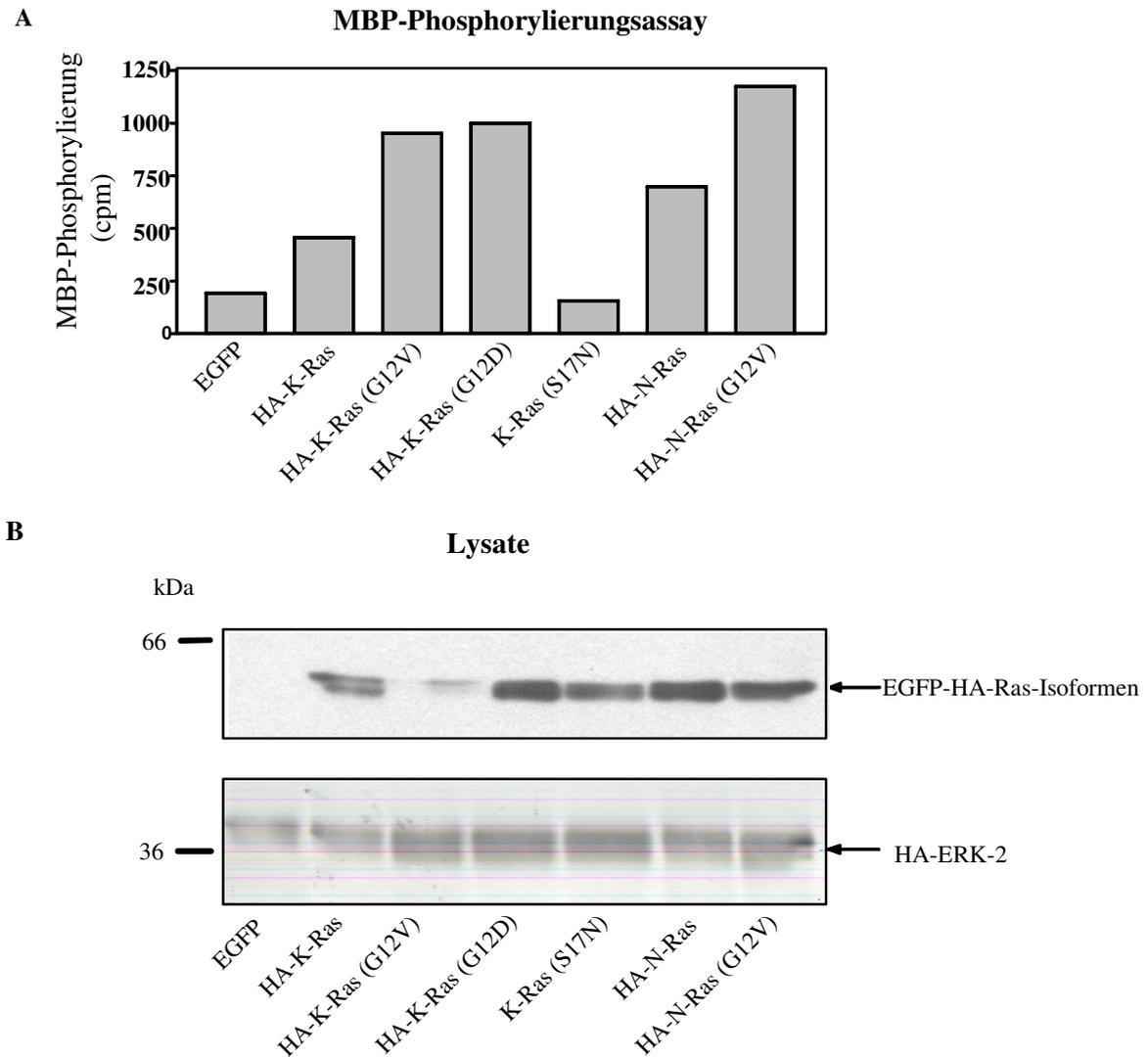
Die Analyse der transienten Expression der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine bei Kotransfektion mit HA-ERK-2 in PANC-1 Zellen ergab vergleichbare relative Werte zu den entsprechenden Monotransfektionen, aber eine abweichende Reihenfolge denn N-Ras (G12V) wurde in der Kotransfektion stärker exprimiert als in der Monotransfektion. Eine Analyse der HA-ERK-2 Expression bei Kotransfektion mit den EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen war aufgrund der geringen Expression nur bedingt auswertbar, es konnte aber kein deutlicher Einfluss der EGFP-HA-Fusionsproteine auf die Expression der HA-ERK-2 bei Kotransfektion festgestellt werden.

### 6.3.2 Einfluss von EGFP-HA-Ras auf die Aktivität von HA-ERK-2 in ruhenden Zellen

Nachdem die Expression der EGFP-HA-Ras-Isoformen und HA-ERK-2 überprüft worden war, wurde der Einfluss der EGFP-HA-Ras-Proteine auf die ERK-2 Aktivität durch Messung der radioaktiven *in vitro* Phosphorylierung eines Peptids aus dem *myelin basic protein* (MBP) untersucht.

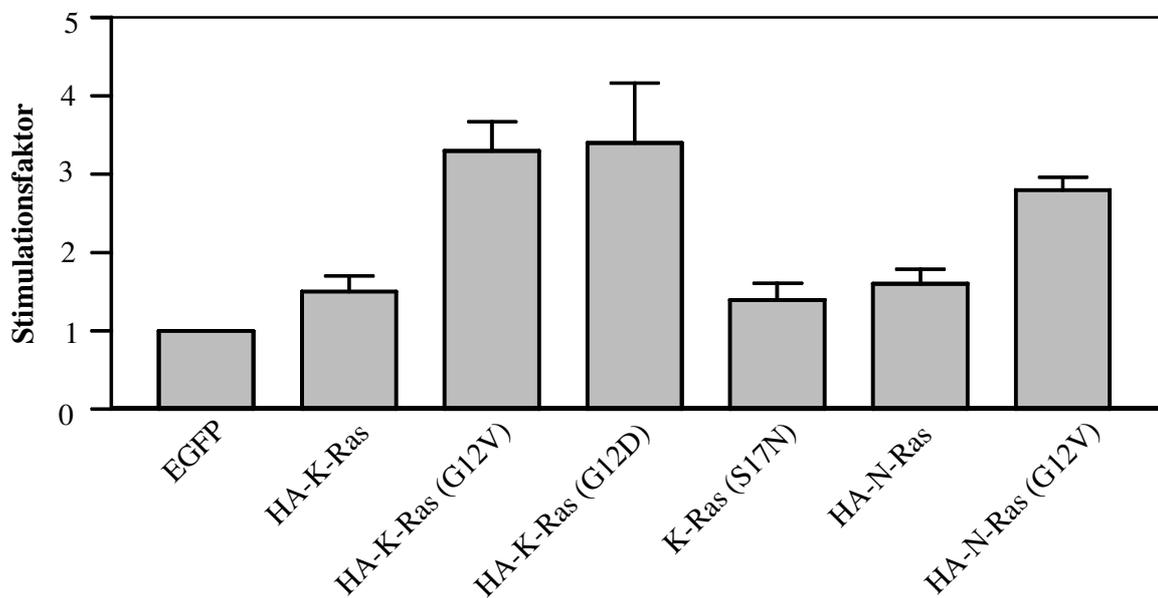
Da die Expression der HA-ERK-2-Proteine in allen Transfektionsansätzen einheitlich war, wurde für diese Versuche die gleiche Proteinmenge von allen Zelllysaten verwendet. Zur Bestimmung der HA-ERK-2-Aktivität wurde dieses Protein mit Hilfe von anti-HA-Antikörpern aus den RIPA-Proteinlysaten immunpräzipitiert. Um zu überprüfen, ob in jeder Probe die gleiche Menge HA-ERK-2 immunpräzipitiert worden war, wurde jeweils 1/3 des Präzipitats vor der Kinasereaktion entnommen und die HA-markierte Kinase im Immunoblot mit einem ERK-2 Antikörper nachgewiesen. Die verbleibenden 2/3 des Präzipitats wurden zur Bestimmung der HA-ERK-2-Aktivität verwendet. Als Maß für die Aktivität der MAP Kinase ERK-2 wurde die radioaktive Phosphorylierung des MBP-Peptids in *counts per minute* (cpm) gemessen. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments sind in Abbildung 14 abgebildet.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass eine Kotransfektion der konstitutiv aktiven Mutanten EGFP-HA-K-Ras (G12V) und K-Ras (G12D) mit HA-ERK-2 die Aktivität der HA-ERK-2 in PANC-1 Zellen um den Faktor 5,0 im Vergleich zu EGFP-exprimierenden PANC-1 Zellen steigern konnte. Eine Kotransfektion mit der konstitutiv aktiven Mutante EGFP-HA-N-Ras (G12V) steigerte die HA-ERK-2-Aktivität um den Faktor 6,1. Bei Kotransfektion mit der wildtypischen Form EGFP-HA-N-Ras wurde die HA-ERK-2-Aktivität um den Faktor 3,6 angehoben, bei einer Kotransfektion mit der wildtypischen Form EGFP-HA-K-Ras wurde die Aktivität um den Faktor 2,4 erhöht. Die Kotransfektion mit der dominant negativen Mutante EGFP-K-Ras (S17N) führte zu einer leicht geringeren Phosphorylierung des MBP-Peptids als in den EGFP-exprimierenden Kontroll-PANC-1 Zellen. Der Faktor betrug 0,9. Zur Kontrolle der eingesetzten EGFP-HA-Ras- und HA-ERK-2-Mengen wurden jeweils ein Drittel des HA-ERK-2-Präzipitats sowie 50 µg Gesamtprotein. Die in Abbildung 14 dargestellten Immunoblots zeigen, dass zwar die präzipitierten HA-ERK-2 Proteinmengen pro Probe nahezu gleich waren, die EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine in den einzelnen Proben jedoch unterschiedlich exprimiert wurden.



**Abbildung 14: Einfluss von EGFP-HA-Ras-Isoformen auf die HA-ERK-2 Aktivität in transient transfizierten PANC-1 Zellen.**  $3 \times 10^6$  PANC-1 Zellen wurden transient mit je  $8 \mu\text{g}$  pcDNA3.1 (+)/HA-ERK-2 und  $8 \mu\text{g}$  der entsprechenden pEGFP-HA-Ras-Expressionsplasmide transfiziert. Nach einer Inkubation von 24 h in serumhaltigem Kulturmedium wurden die Zellen für weitere 4 h durch Inkubation in DMEM ohne Zusätze in einen Ruhezustand versetzt und anschließend lysiert. (A) HA-ERK-2 wurde mit Hilfe von anti-HA-Antikörpern aus RIPA-Zellysaten ( $1,7 \text{ mg}$  Gesamtprotein pro Probe) immunpräzipitiert und die Aktivität der HA-ERK-2 im *in-vitro*-Phosphorylierungsassay mit MBP-Peptid und  $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$  bestimmt. Die Darstellung der HA-ERK-2 Aktivität erfolgte als *counts per minute* (cpm) nach Messung der emittierten  $\beta$ -Strahlung im  $\beta$ -Counter. (B) Zum Nachweis der EGFP-HA-Ras-Expression wurden  $50 \mu\text{g}$  Gesamtprotein in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine im Immunoblot mit anti-Pan-Ras (OP40) und anti-Maus HRP und ECL-Entwicklung nachgewiesen. Zur Kontrolle der im *in vitro*-Phosphorylierungsassay eingesetzten HA-ERK-2 Menge wurde ein Drittel des Immunpräzipitationsansatzes in einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend HA-ERK-2 mit anti-ERK-2 und anti-Kaninchen Alkalische Phosphatase im Immunoblot dargestellt.

Zur quantitativen Analyse des Einflusses einer Kotransfektion von EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen mit HA-ERK-2 auf die Aktivität von HA-ERK-2 in PANC-1 Zellen, wurden die Stimulationsfaktoren der durchgeführten Aktivitätsassays berechnet. Hierzu wurde die MBP-Phosphorylierung als *count per minute* jeder Probe pro Versuch zum Quotienten des Wertes der MBP-Phosphorylierung von EGFP-exprimierenden PANC-1 Zellen gesetzt und damit der Stimulationsfaktor für jede Probe bestimmt. Aus mindestens 3 Aktivitätsassays wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen ( $\pm$  SD) ermittelt und graphisch als Balkendiagramm (siehe Abbildung 15) dargestellt.



**Abbildung 15: Analyse der Stimulationsfaktoren zur Ermittlung des Einflusses von EGFP-HA-Ras-Isoformen auf die HA-ERK-2-Aktivität in PANC-1 Zellen nach transientser Transfektion.** Zur Analyse der Stimulationsfaktoren wurden die MBP-Phosphorylierungen [gemessen als *count per minute* (cpm)] der jeweiligen EGFP-HA-Ras-Isoformen zum Quotienten der MBP-Phosphorylierung von EGFP-exprimierenden PANC-1 Zellen gesetzt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen ( $\pm$  SD) wurden aus mindestens 3 durchgeführten Phosphorylierungsexperimenten ermittelt und als Balkendiagramm graphisch dargestellt.

Die quantitative Auswertung aller durchgeführten MBP-Phosphorylierungsassays ergab, dass eine Kotransfektion der PANC-1 Zellen mit der konstitutiv aktiven Mutante EGFP-HA-K-Ras (G12D) und HA-ERK-2 eine Steigerung der HA-ERK-2-Aktivität um den Faktor 3,4 ( $\pm 0,76$ ) im Vergleich zu EGFP-exprimierenden PANC-1 Zellen erbrachte. Bei einer Kotransfektion der Zellen mit EGFP-HA-K-Ras (G12V) und HA-ERK-2 wurde die Aktivität der HA-ERK-2 um nahezu den gleichen Faktor 3,3 ( $\pm 0,37$ ) wie durch HA-K-Ras (G12D) gesteigert. Die zweitstärkste Steigerung der HA-ERK-2-Aktivierung erfolgte bei Kotransfektion mit der konstitutiv aktiven Mutanten EGFP-HA-N-Ras (G12V), die HA-ERK-2-Aktivität wurde um den Faktor 2,8 ( $\pm 0,16$ ) gesteigert. Eine Kotransfektion mit den wildtypischen Formen EGFP-HA-K-Ras und -N-Ras verursachte eine vergleichbar starke Aktivierungssteigerung um den Faktor 1,5 ( $\pm 0,2$ ) für wildtypisches K-Ras und 1,6 ( $\pm 0,19$ ) für wildtypisches N-Ras. Bei Kotransfektion mit der dominant negativen Mutante EGFP-K-Ras (S17N) wurde eine HA-ERK-2-Aktivierung um das 1,4fache ( $\pm 0,21$ ) im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Zellen erreicht. Entsprechend der inaktivierenden Mutation wäre eine Erniedrigung der Aktivität oder keine Änderung der Aktivität zu erwarten. Zusätzlich müssen die Aktivierungen der HA-ERK-2 im Hinblick auf die unterschiedlichen Expressionen der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine betrachtet werden. Obwohl EGFP-HA-N-Ras und EGFP-HA-N-Ras (G12V) bei Kotransfektion mit HA-ERK-2 am stärksten in PANC-1 Zellen exprimiert wurden, wurde die stärkste Aktivierung der HA-ERK-2 bei Kotransfektion mit den konstitutiv aktiven Mutanten EGFP-HA-K-Ras (G12V) und -K-Ras (G12D) erreicht, welche geringer exprimiert wurden als die N-Ras Formen. Die wildtypische Form von K-Ras stimulierte die HA-ERK-2-Aktivität vergleichbar gleich stark wie der Wildtyp von N-Ras bei jedoch geringerer Expression von K-Ras im Vergleich zu N-Ras.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass wildtypische, konstitutiv aktive und dominant negative EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine aktiv in PANC-1 Pankreaskarzinomzellen exprimiert werden. Die Expressionsstärke der einzelnen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine ist abhängig von der Isoform und der Mutation. Die Aktivität der transient exprimierten Ras-Proteine ist dabei abhängig von der Mutation. In Bezug auf die Aktivierung der koexprimierten MAP Kinase HA-ERK-2 konnte festgestellt werden, dass diese Kinase in PANC-1 Zellen, die bereits endogen konstitutiv aktives K-Ras (G12D) exprimieren, durch die transiente Expression von konstitutiv aktivem und wildtypischen EGFP-HA-K-Ras und -N-Ras aktiviert wird. EGFP-HA-K-Ras Proteine aktivieren ERK-2 dabei stärker als EGFP-HA-N-Ras Proteine.

## 7 Diskussion

Derzeit steht das Pankreaskarzinom an 4. Stelle der tumorbedingten Todesursachen der USA (Jemal *et al.*, 2002) und seine Inzidenz hat eine steigende Tendenz (DiMagno *et al.*, 1999; Bardeesy und DePinho, 2002). Diese Tumorentität ist gekennzeichnet durch reduzierte diagnostische Möglichkeiten und wenige Therapieoptionen, welche damit auch die schlechte Prognose bestimmen. Aus diesem Grund besteht ein großes Interesse an der Untersuchung der molekulargenetischen Veränderungen des Pankreaskarzinoms, damit sowohl die diagnostischen, als auch therapeutischen Möglichkeiten und in diesem Sinne die Prognose verbessert werden können.

Eine der häufigsten molekulargenetischen Veränderungen im Pankreaskarzinom ist die Mutation im *K-ras*-Gen (Almoguera *et al.*, 1998; Hruban *et al.*, 2000). *Ras*-Gene kodieren für 4 Ras-Proteine, N-Ras, H-Ras und K-Ras4A und K-Ras4B, die ubiquitär exprimiert werden. Die besondere Bedeutung der Ras-Proteine liegt in ihrer Funktion als Schlüsselproteine in der Signaltransduktion von intrazellulären Funktionen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose (Marshall, 1995; Clark und Hynes, 1996; Howe und Juliano, 1998; Gille und Downward, 1999). Deregulation der genannten Funktionen sind wesentliche Ereignisse der Karzinogenese (zusammengefasst in Evan und Vousden, 2001). Im Bezug auf das Pankreaskarzinom können in bis zu 90 % aller Fälle aktivierende Mutationen im *K-ras* Gen nachgewiesen werden (Longnecker und Terhune, 1998; Hilgers *et al.*, 1999). Vor diesem Hintergrund und der Tatsache, dass bereits 30 % aller frühen Pankreasläsionen eine *K-ras*-Mutation aufweisen (Terhune *et al.*, 1998; Hilger und Kern, 1999; Apple *et al.*, 1999; Hruban *et al.*, 2000), wurde bereits versucht, die *K-ras*-Mutation als diagnostischen Marker (Okada *et al.*, 1998) oder als therapeutischen Ansatzpunkt zu verwenden (zusammengefasst in Adjei, 2001).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde die Expression von Ras-Isoformen in der humanen Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 und ihr Verhalten bezüglich der Signalweiterleitung auf Effektorproteine untersucht. Hierzu wurden die unterschiedlichen Ras-Isoformen, im besonderen K- und N-Ras, im Bezug auf ihre Funktionalität und ihre Signaltransduktionseigenschaften nach ektopischer Expression in Pankreaskarzinomzellen untersucht. Diese Versuche wurden in der Zelllinie PANC-1 durchgeführt. PANC-1 Zellen entstammen einem humanen duktalem Pankreaskarzinom und enthalten eine monoallelische *K-ras* Mutation [*K-Ras* (G12D)] (Madden und Sarras, 1988; Giehl *et al.*, 2000).

## 7.1 Expression und Funktionalität von EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen in PANC-1 Zellen

Zur transienten Expression der Ras-Isoformen H-Ras, K-Ras4B und N-Ras in PANC-1 Zellen und zur Darstellung eventueller Unterschiede wurden zunächst Expressionsplasmide der unterschiedlichen Ras-Isoformen generiert. Im Anschluss daran wurde die Funktionalität der Proteine untersucht.

Die Herstellung von EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen brachte mehrere Vorteile mit sich. Zum einen konnten die EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine aufgrund ihres höheren Molekulargewichtes von 48 kDa gut von den endogenen Ras-Proteinen mit einem Molekulargewicht von 21 kDa unterschieden werden. Zum anderen erlangten die Fusionsproteine durch die Fusion mit dem *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) fluoreszierende Eigenschaften, wodurch die Expression der Fusionsproteine in lebenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Anregung bei 488 nm beobachtet werden konnte. Darüber hinaus ergab sich so die Möglichkeit der Beobachtung der intrazellulären Verteilung der Proteine (Soderqvist *et al.*, 1997; Nakagawa *et al.*, 2001). Den größten Nutzen brachte jedoch die höhere Transfektionseffizienz und Proteinausbeute im Vergleich zu Versuchen mit pcDNA-Konstrukten, die die Verwendung wesentlich größerer Proteinmengen für die anschließenden biochemischen Versuche zuließ. Eine mögliche Ursache dieser erhöhten Proteinexpression der pEGFP-C3-Konstrukte könnte in den unterschiedlichen Promoter- und *Enhancer*-Strukturen der Expressionsplasmide liegen. Während die pEGFP-C3-Plasmide über eine Kosak-Sequenz direkt vor dem EGFP-Startkodon verfügen und damit eine verbesserte Translation verbunden mit einer erhöhten Expression der Proteine gewährleistet wird, ist in den pcDNA3.1(+)-Konstrukten keine Kosak-Sequenz enthalten.

Die transiente Transfektion der PANC-1 Zellen mit den entsprechenden EGFP-HA-Ras-Expressionsplasmiden führte zu folgenden Ergebnissen: mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops, bedingt durch fluoreszierende Eigenschaften des EGFP-Proteins, ließen sich die EGFP-HA-Ras-Fusionsprotein-exprimierenden PANC-1 Zellen nach Anregung bei 488 nm darstellen. Die Expression der entsprechenden Fusionsproteine konnte in Immunoblots bestätigt werden. Die densitometrische Auswertung der Expression dieser Proteine nach Immunoblotanalyse ergab folgende Reihenfolge in der Expressionsstärke der Proteine:

H-Ras (S17N) > N-Ras (G12) > K-Ras (G12D) > K-Ras (G12V) > N-Ras (G12V) > K-Ras (G12) > K-Ras (S17N) bei Monotransfektion bzw.

H-Ras (S17N) > N-Ras (G12) > N-Ras (G12V) > K-Ras (G12D) > K-Ras (G12V) > K-Ras (G12) > K-Ras (S17N) bei Kotransfektion mit HA-ERK-2.

Obwohl die gleiche Menge DNA und die gleiche Anzahl an Zellen für die Versuche verwendet worden war, konnte somit eine unterschiedliche Expression der Ras-Proteine nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieser unterschiedlichen Expression ist unklar. Es stellt sich die Frage, ob die Unterschiede isoformspezifische Funktionen der Proteine widerspiegeln und diese daher in unterschiedlichen Mengen in den Zellen produziert werden. Direkte Vergleiche der Expression der Ras-Isoformen in einer Zelllinie wurden bisher noch nicht beschrieben und somit können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht mit anderen Versuchsergebnissen verglichen werden. Vorhergehende Expressionsexperimente unserer Arbeitsgruppe demonstrierten bereits eine höhere Expression des dominant negativen Proteins H-Ras (S17N) nach transienter Transfektion von PANC-1 Zellen im Vergleich zu konstitutiv aktiven K- und N-Ras (B.Skripczynski, Dissertation Universität Ulm), ohne dass eine eindeutige Erklärung hierfür gegeben werden konnte. Es wird jedoch angenommen, dass die unterschiedliche Expression der Ras-Proteine mit isoformspezifischen Funktionen zusammenhängt. Unter diesem Aspekt finden sich in der Literatur zahlreiche Ergebnisse, welche die Hypothese einer isoformspezifischen Funktion von Ras-Proteinen unterstützen. Wird das Vorkommen der veränderten Ras-Proteine in den unterschiedlichen Tumorentitäten genauer betrachtet, so stellt sich eine besondere Verteilung der Ras-Mutationen dar. Mutationen im *K-ras* Gen lassen sich vor allem in soliden Tumoren, insbesondere des Pankreas, des Kolon und der Lungen nachweisen (Bos, 1989). Währenddessen sind *H-ras*-Mutationen selten in Karzinomen zu finden. Sie sind vor allem im Gallenblasen-Karzinom zu beobachten (Adjei, 2001). Mutationen des *N-ras* Gens sind typisch für Hämatoblastosen, maligne Melanome oder Neuroblastome (Bos, 1989). Da Mutationen im *K-ras* Gen am häufigsten auftreten, wird eine besondere Empfindlichkeit dieses Gens gegenüber Mutationen diskutiert, welche wiederum die Entstehung von Tumoren erleichtern. Darüber hinaus wird eine besondere Bedeutung von K-Ras bei der Entwicklung und Erhaltung von Karzinomen erörtert. Zu dieser Erkenntnis tragen zum einen die Untersuchungen von Johnson und Mitarbeitern bei, die zeigen, dass bei transgenen Mäusen mit onkogenen K-Ras-Proteinen

vermehrt Tumore, insbesondere Lungentumore auftreten (Johnson *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte in transgenen Mausmodellen, welche onkogene K-Ras-Proteine in sich tragen, eine Entwicklung von letalen myeloproliferativen Störungen in diesen Mäusen dargestellt werden. Dies führte zu der Erkenntnis, dass onkogenes K-Ras die Entstehung von Leukämien der myeloischen Reihe in Mäusen erleichtern kann (Braun *et al.*, 2004).

Eine isoformspezifische Funktion der Ras-Proteine lässt sich auch aus den Untersuchungen von *knockout* Mäusen ableiten. K-Ras defiziente Mäuse verstarben am 12. bis 14. embryonalen Tag aufgrund von Herzversagen bei schwerer myokardialer Schädigung. Als Ursache hierfür wurde eine verminderte Proliferation der Myokardiozyten nachgewiesen, die in einer Atrophie der Ventrikelwand und damit einer reduzierten Ejektionsfraktion im Sinne eines Herzversagens resultierte. Zudem wurde bei K-Ras defizienten Mäusen eine vermehrte Rate der Apoptose von Motoneuronen des Rückenmarks dokumentiert. Auch waren Schädigungen in der fetalen Leber und damit Störungen in der Entwicklung des fetalen hämatopoetischen Systems nachweisbar. Als eine weitere mögliche Todesursache wird eine Anämie diskutiert, da die totgeborenen Embryos typische Zeichen einer Anämie aufwiesen (Koera *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1997). Im Gegenzug hierzu konnte eine fehlerfreie embryonale Entwicklung und Geburt von N-Ras und H-Ras-defizienten Mäusen beobachtet werden. Diese genetisch veränderten Mäuse wiesen außerdem eine regelrechte Fortpflanzung auf (Umanoff *et al.*, 1995). Als Erklärung werden überlappenden Funktionen der Ras-Proteine diskutiert, so dass die fehlende Funktion von N- oder H-Ras-Proteinen durch die vorhandenen Ras-Proteine kompensiert werden kann. Nur K-*ras* scheint für essentielle Funktionen während der Entwicklung zu kodieren. Untersuchungen von Mäusen mit fehlender N-Ras Funktion und heterozygoter K-*ras*-Deletion zeigten außerdem, dass beide Ras-Isoformen genetisch miteinander interagieren. Ein Grossteil der Tiere verstarb bereits zwischen dem 10. und 12. embryonalen Entwicklungstag. Nur wenige Tiere wurden lebend geboren, diese wurden allerdings vom Muttertier verstoßen und verstarben wenige Tage nach der Geburt. Histologische Untersuchungen der veränderten Tiere ergaben schwere anämische Zustände und verlangsamte embryonale Entwicklung im Vergleich zu normalen Tieren und zu N-Ras defizienten Tieren (Johnson *et al.*, 1997). Diese Untersuchungen bekräftigen die Annahme, dass K-*ras* für einzigartige essentielle Funktionen kodiert, die nicht durch H- und N-*ras* kompensiert werden können. Im Gegenzug dazu vermag jedoch K-Ras das Fehlen von H- und N-Ras-Proteinen

auszugleichen (Johnson *et al.*, 1997). Somit konnte ein deutlicher Hinweis auf isoformspezifische Funktionen dargestellt werden.

Weitere Anhaltspunkte auf funktionelle Unterschiede werden in Untersuchungen bezüglich der Lokalisation der Ras-Isoformen gegeben. Im Rahmen von Untersuchung zur Membranassoziation der einzelnen Ras-Isoformen konnte eine unterschiedliche Verteilung der Ras-Proteine in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Simons und Toomre, 2000). Hierbei handelt es sich um verschiedene Mikrodomänen der Membran mit unterschiedlicher Lipid- und/oder Proteinkomposition. Während sich K-Ras4B hauptsächlich in *non-raft* Domänen befindet (Apolloni *et al.*, 2000; Chen und Resh, 2001; Prior *et al.*, 2001; Niv *et al.*, 2002), ist H-Ras sowohl in *non-raft* als auch in *raft* Domänen der Plasmamembran verteilt. N-Ras-Proteine wurden sowohl in Kollokalisation mit H-Ras in der Plasmamembran als auch in *Caveolae* gefunden. *Caveolae* sind in der Plasmamembran invaginierte und durch Caveolin aggregierte *lipid rafts*. Zudem konnte N-Ras in zellulären Ausläufern und Filopodien identifiziert werden (Rebollo *et al.*, 1999). Aus diesen unterschiedlichen Mikrodomänen heraus können die Ras-Isoformen mit verschiedenen Effektorproteinen interagieren, verschiedene Signale in die Zelle weiterleiten und somit unterschiedliche Funktionen ausüben (Hancock, 2003). Es zeigte sich allerdings, dass die funktionellen Unterschiede der Ras-Isoformen je nach Zellsystem bzw. Tumor divergieren. Während eine besondere Bedeutung der K-Ras Mutation in der Entstehung humaner Tumorentitäten im Besonderen des Pankreas- und Magenkarzioms (Brembeck *et al.*, 2003) dargestellt wurde, konnte nachgewiesen werden, dass onkogenes H-Ras in Ratten die Entwicklung von Mamma-Karzinom stärker induzierte als onkogenes K-Ras. Damit stellt sich ein höheres Tumor-induzierendes Potential von H-Ras als von K-Ras in Ratten-Brustdrüsen heraus (Kim *et al.*, 2002), wobei die Erklärung nicht in der unterschiedlichen Expression der Proteine, sondern in den Proteinen, im genaueren in der Aminosäuresequenz der Proteine liegt. Ähnliche Ergebnisse liefern Transformationsstudien von Maher und Mitarbeitern. In diesen Studien wurden die transformierenden Eigenschaften von H-, N- und K-Ras in verschiedenen Zellsystemen untersucht (Maher *et al.*, 1995). Während onkogenes H-Ras (G12V) in murinen Rat-2 und NIH3T3 Fibroblasten eine 4mal stärkere Transformation dieser Zellen verursachte als onkogenes N- und K-Ras (G12V), hatte onkogenes N-Ras (G12V) in der humanen hämatopoetischen Zelllinie TF-1 ein mindestens dreifach höheres Transformationspotential als onkogenes K- und H-Ras. Diese Untersuchungen bestätigen die Abhängigkeit der

biologischen Funktion der Ras-Isoformen von Zelltypus, Organismus und Spezies. Sowohl Kim als auch Maher betonten jedoch, dass die Spezifität der Ras-Isoformen nicht der unterschiedlichen Expression der Proteine in der jeweiligen Zelllinie zugrunde liegt, sondern im Protein selbst (Maher *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2002).

Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen transformierenden Eigenschaften liegt in der Tatsache, dass die Aktivierung der Ras-Proteine durch GEFs isoformspezifische Unterschiede aufweist. Es zeigte sich in einer Vielzahl von Experimenten, dass verschiedene GEFs putative Präferenzen bezüglich der Aktivierung der Ras-Isoformen aufweisen: RasGRF1 aktiviert vornehmlich H-Ras, nicht jedoch N-Ras oder K-Ras4B (Jones und Jackson, 1998). Letztere werden dagegen von RasGRF2 selektiv aktiviert (Gotoh *et al.*, 2001). Ebenso zeigen SOS1 und SOS2 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* unterschiedliche Vorzüge in der Ras-Aktivierung: SOS1 aktiviert alle vier Ras-Isoformen, während SOS2 selektiv H-Ras stimuliert (Liu *et al.*, 1993; Ohba *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse der unterschiedlichen Expression der Ras-Proteine in PANC-1 Zellen könnten ebenfalls auf eine isoformspezifische Funktion der Ras-Proteine in PANC-1 Zellen hinweisen.

Die Darstellung der unterschiedlichen Expression der Ras-Proteine in transient transfizierten PANC-1 Zellen liefert jedoch keine Aussage über die Funktionstüchtigkeit der Proteine. Daher erfolgten zur Überprüfung der Funktionalität der Ras-Proteine Ras-GTP-Bindungsversuche. Diese Experimente beruhen auf der Tatsache, dass GTP-gebundenes Ras eine 100fach höhere Affinität zu der *Ras Binding Domain* (RBD) von c-Raf aufweist als GDP-gebundenes Ras (Herrmann *et al.*, 1995). De Rooij und Bos unternahmen analog den Arbeiten von Hermann und Mitarbeitern Experimente mit A14 Zellen, welche mit onkogenen und damit GTP-gebunden H-RasL61 und dominant negativen GDP-gebundenen H-Ras (S17N) transfiziert wurden. Mit Hilfe eines GST-RBD-Fusionsproteins konnte das GTP-gebundene aktive H-RasL61 präzipitiert werden, nicht jedoch das inaktive GDP-gebundene H-Ras (S17N). Auch die Stimulationsversuche mit Insulin und GDNF in A14 Zellen bestätigten die Nachweisbarkeit selbst geringer Aktivitätssteigerungen von Ras durch GST-RBD-Präzipitation. Dieses System konnte somit als Nachweismöglichkeit aktiver, GTP-gebundener Ras-Proteine etabliert werden (de Rooij und Bos, 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das GST-RBD-Fusionsprotein exprimiert und Ras-GTP aus Zellextrakten präzipitiert und im Immunoblot

nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten, dass die transient exprimierte EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine in den Zellen aktiv vorlagen und *in vitro* Bindungen mit rekombinantem GST-RBD eingingen. Die Auswertung der Ras-GTP-Bindungsexperimente ergab, dass der Gehalt der GTP-gebundenen Proteine je nach Mutation im Ras-Protein unterschiedlich war. Die konstitutiv aktiven Mutanten K-Ras (G12V), K-Ras (G12D) und N-Ras (G12V) wurden in einer größeren Menge in GTP-gebundener Form aus den Zelllysaten präzipitiert als die wildtypischen Formen. Dieses Verhalten der Proteine entspricht den aktivierenden Mutationen. Punktmutationen in der Ras-GTP-Bindungsstelle, zum Beispiel in Kodon 12 oder 13, führen zu einer erhöhten Affinität von Ras zu GTP und zu einer erniedrigten Affinität zu GDP (Trahey und McCormick, 1987; Bos, 1988; Clark und Der, 1993). Zusätzlich bewirkt die Mutation im Kodon 12 eine reduzierte intrinsische GTPase-Aktivität der Proteine (Downward, 1992), was mit einer verminderten Hydrolyse von GTP zu GDP am Ras-Protein und damit mit einer längeren Aktivität dieses Proteins verbunden ist. Als Folge liegt das Protein länger im GTP-gebundenen und somit im aktiven Zustand in der Zelle vor. Konsekutiv erfolgt eine dauerhafte Stimulation der nachfolgenden Effektoren und ihrer spezifischen Wirkung in der Zelle (Barbacid, 1987; Bos, 1997). Die durchgeführten Ras-GTP-Bindungsversuche zeigten darüber hinaus, dass die dominant negativen Formen H-Ras (S17N) und K-Ras (S17N) vorwiegend im GDP-gebundenen Zustand in der Zelle vorliegen. Im Ras-GTP-Bindungsexperiment konnte keine Bindung mit GST-RBD nachgewiesen werden. Durch den mutationsbedingten Austausch von Serin gegen Asparagin in Position 17 erhalten die dominant negativen Ras-Proteine eine höhere Affinität zu GEFs, die aber nicht zum Nukleotidaustausch führt. Zudem können sie nicht mit den nachgeschalteten Effektoren interagieren, sondern gehen „unproduktive“, inaktive Komplexe ein (Feig, 1999).

Verschiedene Experimente mit den dominant negativen Ras-Proteinen zeigten, dass diese zum Nachweis der Funktion der Ras-Proteine eingesetzt werden können, da die dominant negativen Mutanten mit den aktiven Ras-Proteinen um die Bindung mit GEFs konkurrieren und aufgrund ihrer höheren Affinität zu GEFs die Aktivierung wildtypischer Ras-Proteine inhibieren können. Auch hier konnte eine isoformspezifische Prävalenz demonstriert werden. In Versuchen mit den dominant negativen Mutanten H-Ras (S17N) konnten alle drei Ras-Isoformen inhibiert werden. Bei Kotransfektion mit K-Ras (S17N) wurden lediglich die Wildtypen der K- und H-Ras-Proteine beeinflusst, während N-Ras (S17N) nur die Wirkung der Funktion des wildtypischen N-Ras aufheben konnte (Matallanas *et al.*,

2003). Eine Erklärung hierfür liegt in der Lokalisation der Proteine in der Plasmamembran. H-Ras-Proteine sind in allen Mikrodomänen der Plasmamembran lokalisiert und können somit mit einer Vielzahl an GEFs und anderen Proteinen interagieren und diese inaktivieren (Matallanas *et al.*, 2003).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Stimulierbarkeit des GDP-GTP-Austausches der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine zeigten, dass lediglich die Aktivität der wildtypischen Formen von K-Ras und N-Ras durch die Applikation von EGF oder FCS gesteigert werden konnte. Die konstitutiv aktiven Formen K-Ras (G12V), K-Ras (G12D) und N-Ras (G12V) sowie die dominant negativen Formen K-Ras (S17N) und H-Ras (S17N) zeigten keine Aktivitätsänderungen. Diese Ergebnisse stimmen mit den aktivierenden bzw. inaktivierenden Mutationen und den daraus resultierenden Affinitäten zu GTP bzw. GDP und der veränderten intrinsischen GAP-Aktivität überein. Bedingt durch die aktivierende G12V-Mutation befinden sich diese Ras-Proteine bereits in einem maximal aktivierten Zustand, so dass auch durch extrazelluläre Liganden keine weitere Steigerung der Aktivität erfolgt. Reziprok verhält es sich mit den dominant negativen S17N-Proteinen. Durch ihre verminderte Affinität zu GEF und die erhöhte Affinität zu GDP kann ihre Aktivität auch durch Zugabe von extrazellulären Liganden wie EGF oder FCS nicht gesteigert werden. Auch hier werden die dargestellten Ergebnisse durch Daten in der Literatur bestätigt. Niv und Mitarbeiter untersuchten die stabile Expression von GFP-K-Ras (G12V) in Rat-1 Fibroblasten und die transiente Expression dieses Proteins in COS-7 Epithelzellen. Mittels Ras-GTP-Bindungsexperimenten wurde der vermehrte Gehalt an GTP-gebundenen Ras in den Zellen nachgewiesen. Zusätzlich bestätigte sich die Aktivität dieser Fusionsproteine durch deren transformierende Eigenschaften, die zu einem substratunabhängigen Wachstum von Rat-1 Zellen in Soft-Agar führte. Ferner bildeten sich in Nacktmäusen nach Implantation der GFP-K-Ras exprimierenden Rat-1 Zellen deutlich mehr subkutane Tumore aus als in den Kontrolltieren. Durch die Behandlung der EGFP-Ras (G12V) transformierten COS-7 Zellen mit Wachstumsfaktoren konnte keine Aktivitätssteigerung der konstitutiv aktiven Mutanten, wohl aber eine Aktivitätssteigerung der wildtypischen Formen erreicht werden, ohne dass es zu Veränderung des Gehalts an Ras-Proteinen in den Zellen kam (Niv *et al.*, 1999; Niv *et al.*, 2002). Die Ergebnisse von Niv und Mitarbeitern und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Verwendung von EGFP-Ras-Fusionsproteinen zur Untersuchung der Expression und Funktionalität von EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen geeignet ist.

## 7.2 Einfluss von Ras auf ERK-2 in ruhenden Zellen

Nachdem die Expression und die Funktionalität der ektopen EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine in PANC-1 Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde die Funktionalität der EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Signalweiterleitung auf den Raf-MEK-ERK-Signalweg analysiert. Die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade ist eine der am besten charakterisierten Kaskaden (Chong *et al.*, 2003). Mutationen in diesem Signaltransduktionsweg sind mit transformierenden Eigenschaften und unkontrolliertem Zellwachstum verbunden (Barbacid, 1987; Bos, 1995) und Ras-Proteine besitzen vor allem in ihren konstitutiv aktiven Formen onkogene Wirkungen (Seger und Krebs, 1995). Eine aberrante Raf-MEK-ERK-Signalweiterleitung wurde in Verbindung mit einigen Tumoren gebracht. So konnten aktivierte *B-raf* Allele in Kolonkarzinomzellen aber auch in Melanomzellen nachgewiesen werden (Davies *et al.*, 2002). Zudem zeigte sich, dass die Aktivierung des Raf-MEK-ERK-Signalweges ausreichend ist, um eine Transformation von NIH3T3 Maus Fibroblasten zu bewirken (Khosravi-Far *et al.*, 1998). Und auch der Nachweis von metastatischem Wachstum von Ras-transformierten NIH3T3 Zellen nach Injektion in die Schwanzvenen von Mäusen (Webb *et al.*, 1998) betont die Bedeutung der Raf-MEK-ERK-Signaltransduktionskaskade in der Karzinogenese, aber auch Progression und Erhaltung von Tumoren.

Um den Einfluss der Ras-Proteine auf die ERK-2-Aktivität zu überprüfen, wurden transiente Kotransfektionen mit EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen und der MAP Kinase HA-ERK-2 durchgeführt. Hierzu wurden radioaktive *in vitro* Phosphorylierungsexperimente mit [<sup>32</sup>P]ATP und MBP-Peptiden als Substrat durchgeführt. Bei der Untersuchung der Expression der ektopen Proteine zeigte sich, dass die HA-ERK-2 Proteine gleichmäßig in PANC-1 Zellen exprimiert wurden. Die verschiedenen Ras-Isoformen wurden vergleichbar der Monotransfektion in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Die dominant negative Mutante EGFP-H-Ras (S17N) stellte sich als das Protein mit der stärksten Expression dar. Die Isoformen N-Ras (G12) und N-Ras (G12V) wurden stärker von den Zellen produziert als K-Ras (G12D), K-Ras (G12V) und der Wildtyp von K-Ras. Die dominant negative Mutante K-Ras (S17N) wurde am geringsten in PANC-1 Zellen nach Kotransfektion exprimiert.

Im Bezug auf die Untersuchung der MBP-Phosphorylierung der HA-ERK-2 konnten mehrere Ergebnisse erzielt werden. Zum einen stellte sich heraus, dass eine Aktivitätssteigerung der HA-ERK-2-Proteine durch Kotransfektion mit HA-Ras-Fusionsproteinen auftrat. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die konstitutiv aktiven

Ras-Proteine eine stärkere Aktivierung der HA-ERK-2-Proteine verursachten als die wildtypischen Formen. Bei genauerer Analyse manifestierten sich isoformspezifische Unterschiede bezüglich der Aktivierungssteigerung. Die konstitutiv aktiven Mutanten K-Ras (G12D) und K-Ras (G12V) wiesen eine stärkere Aktivierung der HA-ERK-2 auf als N-Ras (G12V). Letzteres wiederum hatte ein höheres Aktivierungspotential als die wildtypischen K-Ras- und N-Ras-Proteine, welche eine vergleichbar gleich starke HA-ERK-2 Aktivierung verursachten. Eine Kotransfektion der PANC-1 Zellen mit den dominant negativen Mutanten H-Ras (S17N) und K-Ras (S17N) bewirkte sogar eine Reduktion der HA-ERK-2 Aktivität. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass ERK-2 in PANC-1 Zellen trotz vorhandener K-Ras (G12D) Mutation nicht maximal aktiv vorliegt, sondern durch die ektopische Koexpression von Ras-Proteinen stimuliert werden kann. Aufgrund der konstitutiv aktiven K-Ras (G12D) Mutation in PANC-1 Zellen würde man eine chronische Stimulation der ERK-Proteine und damit eine dauerhaft erhöhte Aktivität erwarten. Dies ist allerdings nicht der Fall. In weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte bestätigt werden, dass die ERK-2-Aktivität in PANC-1 Zellen nicht konstitutiv erhöht ist, sondern durch die Expression von konstitutiv aktiven Ras-Proteinen und auch durch die Behandlung mit Wachstumsfaktoren gesteigert werden konnte (B.Skripczynski, Dissertation Universität Ulm; Giehl *et al.*, 2000). Auch Berger und Mitarbeiter konnten in ihren Untersuchungen mit Pankreaskarzinomzellen, welche konstitutiv aktive K-Ras-Proteine enthielten, im Vergleich zu Zellen ohne konstitutiv aktiven K-Ras-Proteinen keine konstitutiv aktiven ERK-Proteine nachweisen (Berger, *et al.*, 2002). Buard und Mitarbeiter publizierten vergleichbare Ergebnisse für Kolon-Karzinom-Zellen mit einer Überexpression von K-Ras-Proteinen und einem daraus resultierenden erhöhten Ras-GTP-Gehalt. Auch hier konnte die Aktivität der ERK-Proteine durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren gesteigert werden (Buard *et al.*, 1996). Die bedeutende Rolle der ERK-Aktivierung in der Regulation der Proliferation von Zellen ist bereits seit langem bekannt (Khosravi-Far *et al.*, 1998), doch scheint es intrazelluläre Regulationsmechanismen zu geben, welche eine dauerhafte Stimulation der ERK-Proteine und somit eine dauerhafte Fehlregulation ERK-abhängiger Signaltransduktionsprozesse verhindern. Ein möglicher Regulationsmechanismus ist die Induktion von MAP-Kinase-Phosphatasen (MKPs), welche die ERK inaktivieren (Reffas und Schlegel, 2000). Die Expression der MKPs kann durch Serum induziert werden. Über einen negativen *feedback*-Mechanismus wird die Aktivität von ERK durch Dephosphorylierung reduziert (Cobb, 1999). Es gibt Hinweise dafür, dass bereits während der onkogenen Transformation die

Expression von MKPs induziert wird. Diese hemmen die ERK-Aktivität und verhindern damit eine dauerhafte Stimulation ERK-regulierter Signalwege (Yip-Schneider *et al.*, 2001). Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte transiente Expression von Ras-Proteinen in PANC-1 Zellen kommt es kurzzeitig zu einer starken Überexpression der ektopen Proteine und Aktivierung der ERK-2 Proteine, die vermutlich nicht oder nur in einem geringen Masse durch *feedback*-Mechanismen beeinflusst wird. Matallanas und Mitarbeiter zeigten, dass die Inhibition der wildtypischen Ras Proteine, welche durch die Kotransfektion mit dominant negativen Ras-Mutanten verursacht wurde, durch eine Überexpression der wildtypischen Ras-Proteine wieder aufgehoben werden konnte (Matallanas *et al.*, 2003). So scheint es, dass die Überexpression der ektopen Ras-Proteine bei transienter Transfektion von PANC-1 Zellen, wie sie in der vorliegenden Promotionsarbeit durchgeführt wurde, die Expression bzw. die Wirkung der MKPs inhibieren und damit eine Aktivitätssteigerung der ERK-2 Proteine verursachen kann. Zur Bestätigung der Hypothese wäre ein Nachweis der Expression der MKPs in PANC-1 Zellen, welche EGFP und EGFP-Ras-Fusionsproteine exprimieren, und in parenteralen PANC-1 Zellen notwendig gewesen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass konstitutiv aktive Ras(G12V)-Proteine eine höhere Aktivierungssteigerung der HA-ERK-2-Proteine bewirken als die wildtypischen Ras-Proteine. Die Erklärung hierfür liegt in der aktivierenden Mutation in der GTP-Bindungsstelle dieser Proteine und der daraus resultierenden erhöhten Bindungsaffinität der Proteine an GTP, welche dadurch länger im GTP-gebundenen Zustand verbleiben und somit vermehrt mit Effektorproteinen, z.B. c-Raf-1 interagieren können. Interessant ist darüber hinaus, dass bei Betrachtung der Aktivitätssteigerung der HA-ERK-2 unter Ras-isoformspezifischen Aspekten ein spezifisches Muster erkennbar ist. K-Ras (G12D) und K-Ras (G12V) bewirken eine höhere HA-ERK-2 Aktivierung als N-Ras (G12V). Die Wildtypen K-Ras und N-Ras unterscheiden sich nicht in ihrer Aktivitätssteigerung. Onkogenes, konstitutiv aktives EGFP-K-Ras führt bei transienter ektoper Expression in PANC-1 Zellen zu einer stärkeren ERK-2-Aktivierung als konstitutiv aktives EGFP-N-Ras.

Voice und Mitarbeiter untersuchten die Funktionsunterschiede der Isoformen hinsichtlich der Aktivierung von c-Raf-1 *in vivo* (Voice *et al.*, 1999). In transient kotransfizierten COS-1 Zellen mit Wildtyp Raf-1 und konstitutiv aktiven H-Ras (G12V), N-Ras (G12V), K-Ras4A (G12V) und K-Ras4B (G12V) stellte sich K-Ras4B (G12V) als stärkerer Aktivator

von c-Raf-1 als N-Ras (G12V) und H-Ras (G12V) dar. Ergebnisse von Yan und Mitarbeitern zeigen darüber hinaus, dass die Aktivierung der PI3K in COS-1 Zellen ebenfalls durch Ras reguliert wird. Dabei zeigte sich, dass H-Ras ein stärkerer PI3K-Aktivator ist als K-Ras. Letzteres aktiviert jedoch c-Raf-1 potenter als H-Ras (Yan *et al.*, 1998). Auch Li und Mitarbeiter wiesen isoformspezifische Unterschiede bezüglich der ERK-Aktivierung nach (Li *et al.*, 2004). In NIH3T3 und RIE-1 Zellen erfolgte eine höhere ERK-Aktivierung durch konstitutiv aktives N- und K-Ras (G12V) als durch H-Ras (G12V). Neben der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur Beeinflussung der Aktivität von ERK-2 durch transiente Überexpression von konstitutiv aktiven Ras-Proteinen zeigten weitere Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe, dass wildtypisches N-Ras die Wachstumsfaktor-induzierte Proliferation von PANC-1 Zellen über die Aktivierung von ERK vermittelt (Giehl *et al.*, 2000; Stähle *et al.*, 2003). Darüber hinaus führt die stabile Expression von EGFP-K-Ras (G12V) in PANC-1 Zellen nicht zu einer erhöhten Aktivierung von ERK-2, sowie c-Raf-1 und MEK-1/2 (M. Müller, Dissertation Universität Ulm). In weiteren Versuchen zeigte sich, dass wildtypisches N-Ras die Wachstumsfaktor-induzierte ERK-2 Aktivierung vermittelt (Giehl *et al.*, 2000). Auch die Arbeit von Sorrentino und Mitarbeitern wies einen Zusammenhang zwischen N-Ras und erhöhter ERK-2 Aktivität in verschiedenen Tumorzellen nach (Sorrentino *et al.*, 2001). Durch die Verwendung von Antisense-Oligodeoxyribonukleotiden (AS-ODN) konnte die Expression von N-Ras reduziert werden, die mit einer verminderten ERK-2 Aktivität und einer reduzierten Proliferationsrate verbunden war. Demnach scheint N-Ras über die Aktivierung von ERK-2 einen Einfluss auf die Zellproliferation auszuüben. Auch Wolfman und Wolfman konnten diesen Sachverhalt nachweisen. Sie arbeiteten mit N-Ras *knockout* Fibroblasten und den korrespondierenden N-Ras-überexprimierenden Fibroblasten. Die N-Ras defizienten Fibroblasten gingen nach Zellschädigung vermehrt in die Apoptose über, während die N-Ras überexprimierenden Zellen trotz Zellschädigung länger überlebten als die Kontrollzellen (Wolfman und Wolfman, 2000). Hier wird die Bedeutung von N-Ras in Bezug auf das Überleben der Zellen und somit eine starke Aktivierung von ERK-2 durch N-Ras hervorgehoben. Diese Befunde stehen jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Promotionsarbeit, in welcher eine stärkere Aktivierung der ERK-2 durch die konstitutiv aktiven Formen von K-Ras dargestellt werden konnte. Allerdings müssen in diesem Fall die zugrundeliegenden Methoden betrachtet werden, die zu diesen Ergebnissen führten. Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden transiente Transfektionsstudien durchgeführt. Die Ergebnisse oben genannter

Arbeitsgruppen wurden durch stabile Transfektionen erreicht. Die erzielten Effekte nach transienter Transfektion spiegeln die Situation innerhalb kurzer Zeit nach Transfektion (24 bis 48 Stunden nach Transfektion) wider. Im Gegenteil dazu wird das Fremd-Gen bei der stabilen Transfektion in das Genom integriert, bei der Zellteilung weitergegeben und somit das entsprechende Protein über einen längeren Zeitraum exprimiert. Die Zelle hat folglich die Möglichkeit, auf die neuen Begebenheiten in Form von Anpassungsmechanismen zu reagieren, z.B. mit der bereits weiter oben angeführten Expression von MKPs. Zudem wurden von W. Köhler negative *feedback*-Mechanismen auf der Ebene von c-Raf-1 beschrieben (Kolch, 2000). Durch eine chronische Aktivierung von c-Raf-1 kommt es zur selbstinduzierten Inhibition von c-Raf-1 mit daraus resultierender Reduktion der ERK-2 Aktivierung. Hier scheint eine autoinhibitorische Domäne von c-Raf-1 für die inhibierenden Effekte hauptverantwortlich zu sein (Tran und Frost, 2003). Diese autoinhibitorische Domäne blockiert die katalytische Einheit von c-Raf-1 und verhindert damit die Phosphorylierung von MEK und ERK Proteinen. Yeung und Mitarbeiter charakterisierten die Expression von weiteren inhibitorisch wirkenden Proteinen (Yeung *et al.*, 2000). Die sogenannten Raf-Kinase-Inhibitor Proteine (RKIPs) greifen in den c-Raf-1-MEK-Komplex ein, lösen ihn auf und inhibieren folglich die Weiterleitung des Signals an ERK. Diese und weitere Anpassungsmechanismen können die fehlende Steigerung der ERK-2 Aktivität trotz des dauerhaften Vorhandenseins von konstitutiv aktiven Ras-Proteinen erklären. Die Entstehung von Anpassungsmechanismen könnte auch erklären, weshalb ein Tumor auf eine bestimmte antitumorale Therapie zunächst gut anspricht, im Verlauf der Therapie jedoch resistent wird.

Die gegensätzlichen Ergebnisse aus transienten und stabilen Transfektionen zeigen, dass bei der transienten Transfektion lediglich die prinzipielle Funktion eines Proteins nachgewiesen werden kann. Beim Vorgang der transienten Transfektion werden die Akutreaktionen der Zelle auf die erzeugten Veränderungen dargestellt.

Grundsätzlich zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die transiente Expression von EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen in der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 zu einer Aktivitätssteigerung der HA-ERK-2 Proteine führen, obwohl diese Zellen bereits ein konstitutiv aktives K-Ras (G12D)-Protein exprimieren. Das Ausmaß der Aktivitätssteigerung hängt von der Ras-Isoform bzw. von der vorhandenen Mutation des entsprechenden Proteins ab.

## 8 Zusammenfassung

Ras-Proteine spielen eine wesentliche Rolle in einer Vielzahl von zellulären Prozessen, zum Beispiel der Regulation der Proliferation, der Migration, der Apoptose oder der onkogenen Transformation. Obwohl die Isoformen H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B in über 85 % eine identische Aminosäuresequenz aufweisen, finden sich zahlreiche Hinweise auf isoform-spezifische Funktionen. Und so konnte für das Auftreten onkogener Mutationen in Ras-Proteinen eine Korrelation zwischen der Ras-Isoform und dem tumorös veränderten Gewebe dargestellt werden. Am häufigsten treten Ras-Mutationen in Adenokarzinomen des Pankreas auf. In über 90 % aller Pankreaskarzinome werden aktivierende Mutationen im *K-ras*-Gen nachgewiesen. Zur Charakterisierung eines möglichen unterschiedlichen Verhaltens einzelner Ras-Isoformen und Mutanten hinsichtlich ihrer Expression und Signalweiterleitung auf die *mitogen-activated protein kinase* ERK-2 in PANC-1 Pankreaskarzinomzellen, wurden transiente Transfektionsstudien und vergleichende Proteinaktivitätsstudien durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Expressionsplasmide für wildtypische, konstitutiv aktive und dominant negative EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine generiert und die kodierten Proteine transient in PANC-1 Zellen exprimiert. Vergleichende Expressionsanalysen zeigten, dass die einzelnen Ras-Isoformen und Mutanten in unterschiedlicher Stärke in PANC-1 Zellen exprimiert wurden. Für die Monotransfektion zeigte sich folgende Reihenfolge: H-Ras (S17N) > N-Ras (G12) > K-Ras (G12D) > K-Ras (G12V) > N-Ras (G12V) > K-Ras (G12) > K-Ras (S17N).

Für die Kotransfektion mit HA-ERK-2 konnte folgende Reihenfolge erarbeitet werden: H-Ras (S17N) > N-Ras (G12) > N-Ras (G12V) > K-Ras (G12D) > K-Ras (G12V) > K-Ras (G12) > K-Ras (S17N).

Mittels Ras-Aktivitätsstudien konnte gezeigt werden, dass die transient exprimierten EGFP-HA-Ras-Fusionsproteine aktiv in den Zellen vorlagen. Die konstitutiv aktiven Formen K-Ras (G12D), K-Ras (G12V) und N-Ras (G12V) wiesen eine höhere Aktivität auf als die wildtypischen K-Ras (G12) und N-Ras (G12) Proteine. In Stimulationsversuchen konnten die wildtypischen Ras-Proteine durch Applikation von EGF und FCS in ihrer Aktivität gesteigert werden, nicht jedoch die konstitutiv aktiven Proteine. Die Untersuchungen zum Einfluss der EGFP-HA-Ras-Isoformen auf die Aktivität der transient exprimierten *mitogen-activated protein kinase* HA-ERK-2 zeigten zum einen, dass die HA-ERK-2 Aktivität trotz der endogenen Expression von konstitutiv aktiven K-Ras (G12D) nach Kotransfektion mit wildtypischen und konstitutiv aktiven

---

EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen gesteigert wurde. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass die konstitutiv aktiven Proteine K-Ras (G12D) und K-Ras (G12V) in PANC-1 Zellen eine höhere Aktivitätssteigerung der HA-ERK-2 bewirken als N-Ras (G12V). Die wildtypischen Proteine K-Ras (G12) und N-Ras (G12V) unterschieden sich in Bezug auf die Aktivitätssteigerung der HA-ERK-2 nicht. Die dominant negativen Formen H-Ras (S17N) und K-Ras (S17N) hatten keinen stimulierenden Einfluss auf die Aktivität der kotransfizierte HA-ERK-2. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen somit, dass die transiente Expression von EGFP-HA-Ras-Fusionsproteinen in PANC-1 Pankreaskarzinomzellen zu einer Aktivierung der MAP Kinase ERK-2 führte, obwohl diese Zellen bereits endogen konstitutiv aktives K-Ras (G12D) exprimieren. Das Ausmaß der Aktivierung ist dabei abhängig von der verwendeten Ras-Isoform und der Mutation im Protein.

## 9 Literaturverzeichnis

Abarzua P, LoSardo JE, Gubler ML, Neri A: Microinjection of monoclonal antibody Pab421 into human SW480 colorectal carcinoma cells restores the transkription activation function to mutant p53. *Cancer Res* 55: 3490-3494 (1995)

Adjei AA: Blocking oncogenic ras signalling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93: 1062-1074 (2001)

Ahuja HG, Foti A, Bar-Eli M, Cline MJ: The pattern of mutational involvement of RAS genes in human hematologic malignancies determined by DNA amplification and direct sequencing. *Blood* 75: 1684-1690 (1990)

Allgayer H, Heiss MM, Höfler H: Neue Prognosefaktoren bei gastrointestinalen Karzinomen. *Manual Gastrointestinale Tumoren*: 25-33 (2001)

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M: Most human carcinoma of the exocrine pancreas contain mutant c-k-ras genes. *Cell* 53: 549-554 (1998)

Al-Mulla Fahd, Milner-White EJ, Going JJ, Birne GD: Structural differences between Valine-12 and Aspartate-12 Ras Proteins may modify carcinoma aggression. *J Pathol* 187: 433-438

Apolloni A, Prior IA, Lindsay M, Parton RG, Hancock JF: H-Ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Moll Cell Biol* 20: 2475 (2000)

Apple SK, Hecht JR, Lewin DR: Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53 and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multisteps carcinogenesis. *Hum Pathol* 30: 123-129 (1999)

Barbacid M: Ras genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827 (1987)

Bardeesy N, DePinho RA: Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2: 897-909 (2002)

Bar-Sagi D, Hall A: Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 103: 227-238 (2000)

Beauchamp RD, Lyons RM, Yang EY, Coffey Jr. J, Moses HL: Expression of and response to growth regulatory peptides by two human pancreatic carcinoma cell lines. *Pancreas* 4: 369-380 (1990)

Bergo MO, Leung GK, Ambroziak P, Otto JC, Casey PJ, Young SG: Targeted inactivation of the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase gene causes mislocalization of K-Ras in mammalian cells. *J Biol Chem* 275: 17605-17610 (2000)

Bernards A: GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and drosophila. *Biochim Biophys Acta* 1603: 47-82 (2003)

Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, Real FX, Perucho M: Comparative Analysis of mutations in the *p53* and *K-ras* Genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 58: 185-191 (1994)

Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, Kuriyan J: The structural bias of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394: 337-343 (1998)

Bos JL, Fearon EA, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B: Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327: 293-297 (1987)

Bos JL: Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49: 4682-4689 (1989)

Bos JL: Ras-like GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1333: M19-31 (1997)

Bos JL: The *ras* gene family an human carcinogenesis. *Mutation Research* 195: 255-271(1988)

Boyartchuk VL, Ashby MN, Rine J: Modulation of Ras and a factor function of by carboxyl-terminal proteolysis. *Science* 275: 1796-1800 (1997)

Braun BS, Tuveson DA, Kong N, Le DT, Kogan SC, Rozmus J, Le Beau MM, Jacks TE, Shannon KM: Somatic activation of oncogenic K-ras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 597-602 (2004)

Brembeck FH, Schreiber FS, Deramandt TB, Linden C, Rhoades B, Swain G, Grippo P, Stoffers DA, Silberg DG, Rustgi AK: The Mutant K-ras Oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice. *Cancer Res* 63: 2005-2009 (2003)

Brtva TR, Drugan JK, Ghosh S, Terrell RS, Campbell-Burk S, Bell RM, Der CJ: Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *J Biol Chem* 270: 9809-9812 (1995)

Bruder JT, Heidecker G, Rapp UR: Serum-, TPA- and Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. *Genes Dev* 4: 545-556 (1992)

Buard A, Zipfel PA, Frey RS, Mulder KM: Maintenance of growth factor signalling through Ras in human colon carcinoma cells containing K-ras mutations. *Int J Cancer* 67: 539-546 (1996)

Buday L, Downward J: Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73: 611-620 (1993)

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ: Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17: 1395-1413 (1998)

Camps M, Nichols A, Arkinstall S: Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J* 14: 6-16 (1999)

Caponigro F, Casale M, Bryce J: Farnesyl transferase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 943-954 (2003)

Carbone A, Gusella GL, Radzioch D, Varesio L: Human Harvey-ras is biochemically different from Kirsten- or N-ras. *Oncogene* 6: 731-737 (1991)

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC: Green-fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805 (1994)

Chen X, Resh MD: Activation of mitogen-activated protein kinase by membrane-targeted Raf chimeras is independent of raft localization. *J Biol Chem* 276: 34617-34623 (2001)

Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, Shen Q, O'Hagan R, Pantginis J, Zhou H, Horner JW, Cordon-Cardo C, Yancopoulos G, DePinho RA: Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400: 468-472 (1999)

Chong H, Vikis HG, Guan KL: Mechanism of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 15: 463-469 (2003)

Choy E, Chiu VK, Siletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D, Ivanov IE, Philips MR: Endomembrane trafficking of Ras: the CAAX motif target proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98: 69-80 (1999)

Clark EA, Hynes RO: Ras activation is necessary for integrin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and cytosolic phospholipase A2 but not for cytoskeletal organization. *J Biol Chem* 271: 14814-14818 (1996)

Clark GJ, Der CJ: Oncogenic activation of ras proteins. In: Dickey BF und Birnbaumer L (Hrsg) *GTPases in Biology*, Springer Verlag: 259-288 (1993)

Clark GJ, Drugan JK, Rossman KL, Carpenter JW, Rogers-Graham K, Fu H, Der CJ, Campbell SL: 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine rich domain. *J Biol Chem* 272: 20990-20993 (1997)

Cobb MH: MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 71: 479-500 (1999)

Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW: Chemical structure of the hexapeptide chromophore of *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32: 1212-1218 (1993)

Cormack BP, Valdivia R, Falkow S: FACS-optimized mutants of the green-fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38 (1996)

Dai Q, Choy E, Chiu V, Romano J, Slivka SR, Seitz SA, Michaelis S, Philips MR: Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273: 15030-15034 (1998)

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954 (2002)

Davis DF, Ward WW, Cutler MW: Posttranslational chromophore formation in recombinant GFP from *E. coli* requires oxygen. *Proceedings of the 8<sup>th</sup> international symposium on bioluminescence and chemiluminescence* (1995)

Davis RJ: The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268: 14553-14556 (1993)

De Rooij J, Bos JL: Minimal Ras-binding domain of Raf-1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* 14: 623-624 (1997)

Denhardt DT: Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J* 318: 729-747 (1996)

Dhillon AS, Meikle S, Yazici Z, Eulitz M, Kolch W: Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J* 21: 64-71 (2002)

Di Marco E, Pierce JH, Aaronson SA, Di Fiore PP: Mechanisms by which EGF receptor and TGF alpha contribute to malignant transformation. *Nat Immun Cell Growth Regul* 9: 209-21 (1990)

DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA: AGA technical review on the epidemiology, diagnosis and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 117: 1464-1484 (1999)

Downward J: Control of ras activation. *Cancer Surv* 27: 87-100 (1996)

Downward J: Regulatory mechanisms for ras proteins. *Bioessays* 14: 177-184 (1992)

Ebert M, Yokoyama M, Kobrin MS: Induction and expression of amphiregulin in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 54: 3959 (1994)

Ebert M, Yokoyama M, Friess H, Buchler MW, Korc M: Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 54: 5775-5778 (1994)

Ehrhardt A, Ehrhardt G, Guo X, Schrader JW: Ras and relatives -job sharing and networking keep an old family together. *Exp Hematol* 30: 1089-1106 (2002)

El Kamar F, Grossbard ML, Kozuch PS: Metastatic pancreatic cancer: emerging strategies in chemotherapy and palliative care. *The oncologist* 8: 18-34 (2003)

Ellis CA, Clark G: The importance of being K-Ras. *Cell Signal* 12: 425-434 (2000)

Evan G, Vousden KH: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348 (2001)

Feig LA: Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of ras-family GTPases. *Nat Cell Biol* 1: E25-27 (1999)

Feig LA, Cooper GM: Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol Cell Biol* 8: 3235-3243 (1988)

Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL: Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 269: 2550-2561 (1994)

Flach J, Bossie M, Vogel J, Corbett A, Jinks T, Willins DA, Silver PA: A yeast RNA-binding protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Cell Biol* 14: 8399-8407 (1994)

Frazier ML, Longnecker DS: Cell lines of the human and rodent exocrine pancreas. *The Pancreas Biology, Pathobiology, and Disease*, Second edition, Raven Press (1993)

Friess H, Kleeff J, Korc M, Buchler MW: Molecular aspects of pancreatic cancer and future perspectives. *Dig Surg* 16: 281-90 (1999)

Fujita J, Yoshida O, Yuasa Y, Rhim JS, Hatanaka M, Aaronson SA: H-Ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours. *Nature* 309: 464-466 (1984)

Ghaneh P, Kawesha A, Evans JD, Neoptolemos JP: Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9: 1-11 (2002)

Gideon P, John J, Frech M, Lautwein A, Clark R, Scheffler JE, Wittinghofer A: Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the c-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol* 12: 2050-2056 (1992)

Giehl K, Skripczynski B, Mansard A, Menke A, Gierschik P: Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated *K-ras*: implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene* 19: 2930-2942 (2000)

Gille H, Downward J: Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J Biol Chem* 274: 22033-22040 (1999)

- Gorunova L, Hoglund M, Andren-Sandberg AS: Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 81-99 (1998)
- Gotoh T, Tian X, Feig LA: Prenylation of target GTPases contributes to signaling specificity of ras-guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* 276: 38029-38035 (2001)
- Graf LH, Urlaub G, Chasin LA: Transformation of the gene for hypoxanthine, phosphoribosyltransferase. *Somat Cell Genet* 5: 1031-1044 (1979)
- Graves LM, Bornfeldt KE, Krebs EG: Historical perspectives and new insights involving the MAP kinase cascades. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31: 49-62 (1997)
- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M: Cancer statistics 2001. *CA Cancer J Clin* 51: 15-36 (2001)
- Grippo PJ, Nowlin PS, Demeure MJ, Longnecker DS, Sandgren EP: Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant K-Ras in transgenic mice. *Cancer Res* 63: 2016-2019 (2003)
- Gudjonsson B: Cancer of the pancreas. 50 years of surgery. *Cancer* 60: 2284-2303 (1987)
- Hamilton M, Wolfman A: Ha-ras and N-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo. *Oncogene* 16: 1417-1428 (1998)
- Han J, Luby-Phelps K, Das B, Shu X, Xia Y, Mosteller RD, Krishna UM, Falck JR, White MA, Broek D: Role of substrates and products of PI3-Kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 279: 558-560 (1998)
- Hancock JF, Paterson H, Marshall CJ: A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63:133-139 (1990)

Hancock JF: Ras Proteins: Different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 373-384 (2003)

Harada T, Okita K, Shiraishi K: Interglandular cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization in pancreatic cancer. *Cancer Res* 62: 835 (2002)

Heim R, Prasher DC, Tsien RY: Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green-fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12501-12504 (1994)

Heim R, Cubitt AB, Tsien RY: Improved green fluorescence. *Nature* 373:663-664 (1995)

Hekman M, Hamm H, Villar AV, Bader B, Kuhlmann J, Nickel J, Rapp UR: Associations of B- and C-Raf with cholesterol, phosphatidylserine and lipid second messengers; preferential binding of Raf to artificial lipid rafts. *J Biol Chem* 277: 24090-24102 (2002)

Herrmann C, Martin GA, Wittinghofer A: Quantitative analysis of the complex between p21Ras and the Ras-binding domain of the human Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem* 270: 2901-2905 (1995)

Howe AK, Juliano RL: Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of integrin-mediated activation of the Raf/MEK/mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 273: 27268-27274 (1998)

Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J: Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 25: 579-586 (2001)

Hruban RH, van Mansfeld ADM, Offerhaus GJA, van Weering DHJ, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL: K-Ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. *Am J Pathol* 143: 545-554 (1993)

Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL: K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 143: 545-554 (1993)

Hruban R, Wilentz R, Kern S: Genetic Progression in the Pancreatic Ducts. *Am J Pathol* 156:1821-1825 (2000)

Hrycyna CA, Sapperstein SK, Clarke S, Michaelis S: The *Saccharomyces cerevisiae* STE14 gene encodes a methyltransferase that mediates C-terminal methylation of a-factor and Ras proteins. *EMBO J* 10: 1699-1709 (1991)

Idia M, Towatari M, Nakao A, Iida H, Kiyoi H, Nakano Y, Tanimoto M, Saito H, Naoe T: Lack of constitutive activation of MAP kinase pathway in human acute myeloid leukemia cells with N-Ras mutation. *Leukemia* 13: 585-589 (1999)

Innocenti M, Tenca P, Frittoli E, Faretta M, Tocchetti A, Di fiore PP, Scita G: Mechanism through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac. *J Cell Biol* 156: 125-136 (2002)

Inoue S, Tezel E, Nakao A: Molecular diagnosis of pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 48: 933-938 (2001)

Inouye S, Tsuji FI: *Aequorea* green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescent characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters* 341: 277-280 (1994)

Jackson PE, Cooper DP, O'Connor PJ, Povey AC: The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumours: tumour development in female SWR mice does not require a k-ras mutational event. *Carcinogenesis* 3: 509-513 (1999)

James G, Goldstein JL, Brown MS: Resistance of K-RasBV12 proteins to farnesyltransferase inhibitors in Rat1 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4454-4458 (1996)

- Jaumot M, Hancock JF: Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 20: 3949-3958 (2001)
- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M: Cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 52: 23-47 (2002)
- Jin TG, Satoh T, Liao Y: Role of the CDC25 homology domain of phospholipase C epsilon in amplification of Rap1-dependent signaling. *J Biol Chem* 276: 30301 (2001)
- Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, Jacks T: Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 410: 1111-1116 (2001)
- Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, Bronson RT, Umanoff H, Edelmann W, Kucherlapati R, Jacks T: K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* 11: 2468-2481 (1997)
- Jones MK, Jackson JH: Ras-GRF activates Ha-Ras, but not N-Ras or K-Ras 4b, protein *in vivo*. *J Biol Chem* 273: 1782-1787 (1998)
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K: Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 615-675 (2001)
- Kerkhoff E, Rapp UR: The Ras-Raf relationship: an unfinished puzzle. *Adv Enzyme Regul* 41: 261-267 (2001)
- Khosravi-Far R, Campbell S, Rossman KL, Der CJ: Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv Cancer Res* 72: 57-107 (1998)
- Kim E, Ambroziac P, Otto JC, Taylor B, Ashby M, Shannon K, Casey PJ, Young SG: Disruption of the mouse Rcw1 gene results in defective Ras processing and mislocalization of Ras in cells. *J Biol Chem* 274: 8383-8390 (1999)

Kim K, Lindstrom MJ, Gould MN: Regions of H- and K-Ras provide organ specificity/potency in mammary cancer induction. *Cancer Res* 62:1241-1245 (2002)

Klöppe G, Heitz PU: Pancreatic, non endocrine-tumours. *Pancreatic pathology*, New York: Churchill Livingstone 79-113 (1984)

Kobrin MS, Funatomi H, Friess H: Induction and expression of heparin-binding EGF-like growth factor in human pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1705 (1994)

Koera K, Nakamura K, Nakao K, Miyoshi J, Toyoshima K, Hatta T, Otani H, Aiba A, Katsuki M: K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 15: 1151-1159 (1997)

Kolch W: Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351: 289-305 (2000)

Korc M, Chandrasekar B, Yamanaka Y: Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Clin Invest* 90: 1352 (1992)

Kubicek M, Pacher M, Abraham D, Podar K, Elitz M, Baccarini M: Dephosphorylation of Ser-259 regulates Raf-1 membrane association. *J Biol Chem* 277: 7913-7919 (2002)

Lavoie JN, Rivard N, L'Allemain G, Pouyssegur J: A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry. *Prog Cell Cycle Res* 2: 49-58 (1996)

Leblanc V, Delumeau I, Tocqué B: Ras-GTPase activating protein inhibition specifically induces apoptosis of tumour cells. *Oncogene* 18: 4884-4889 (1999)

Leevers SJ, Paterson HF, Marshall CJ: Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369: 411-414 (1994)

Lenzen C, Cool RH, Prinz H, Kuhlmann J, Wittinghofer A: Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. *Biochemistry* 37: 7420-7430 (1998)

Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331 (1997)

Lewis WH, Srinivasan PR, Stokes N, Siminovitch L: Parameters governing the transfer of the gene for thymidine kinase and dihydrofolate reductase into mouse cells using metaphase chromosomes or DNA. *Somatic Cell Genet* 6: 333-348 (1980)

Li G, Zhang XC: GTP hydrolysis mechanism of Ras-like GTPases. *J Mol Biol* 340: 921-932 (2004)

Liao J, Wolfman JC, Wolfman A: K-Ras regulates the steady-state expression of matrix metalloproteinase 2 in fibroblasts. *J Biol Chem* 278: 31871-31878 (2003)

Lieber M, Mazetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G: Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* 15: 741-747 (1975)

Liu BX, Wei W, Broek D: The catalytic domain of the mouse *sos1* gene product activates Ras proteins in vivo and in vitro. *Oncogene* 8: 3081-3084 (1993)

Lohr M, Müller P, Zauner I, Schmidt C, Trautmann B, Thévenod F, Capellá G, Farré A, Liebe S, Jesnowski R: Immortalized bovine pancreatic duct cells become tumorigenic after transfection with mutant k-ras. *Virchows Arch* 438: 581-590 (2001)

Longnecker DS, Terhune PG: What is the true rate of K-ras mutation in carcinoma of the pancreas? *Pancreas* 17: 323-324 (1998)

Lowy DR, Willumsen BM: Function and regulation of Ras. *Annu Rev Biochem* 62: 851-891 (1993)

- Madden ME, Sarras Jr MP: Morphological and biochemical characterization of a human pancreatic ductal cell line (PANC-1). *Pancreas* 5: 512-528 (1988)
- Maher J, Baker DA, Manning M, Dibb NJ, Roberts IAG: Evidence for cell-specific differences in transformation by N-, H- and K-Ras. *Oncogene* 11:1639-1647 (1995)
- Marczell A, Glaser K, Karner J, Mischinger HJ, Schratte-Sehn A, Tatzert G: Pancreatic and periampullary cancer, *ACO-Manual (Austrian Society of Surgical Oncology)* zu finden unter: [www.aco.at/manual/pankreas/stat.html](http://www.aco.at/manual/pankreas/stat.html) (1998)
- Marshall CJ: Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179-185 (1995)
- Marshall CJ: Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol* 8: 197-204 (1996)
- Marshall MS: Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 9: 1311-1318 (1995)
- Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R: Serine und Tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J* 18: 2137-2148 (1999)
- Matallanas D, Arozarena I, Berciano MT, Aaronson DS, Pellicer A, Lafarga M, Crespo P: Differences on the inhibitory specificities of H-Ras, K-Ras and N-Ras (N17) dominant negative mutants are related to their membrane microlocalization. *J Biol Chem* 278: 4572-4581 (2003)
- Matozaki T, Nakanishi H, Takai Y: Small G-Protein networks. Their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal* 12: 515-524 (2000)
- McBride OW, Swan DC, Tronick SR, Gol R, Klimanis D, Moore DE, Aaronson SA: Regional chromosomal localization of N-ras-1, K-ras-1, K-ras-2 and myb oncogenes in human cells. *Nucleic Acids Res* 11 (23): 8221-8236 (1983)
- McCormick F: Going for the GAP. *Curr Biol* 24: 673-674 (1998)

- 
- McGrath JP, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD: Comparative biochemical properties of normal and activated human *ras* p21 protein. *Nature* 310: 644-649 (1984)
- McKenna S, Eatock M: The medical management of pancreatic cancer: a review. *The Oncologist* 8: 149-160 (2003)
- McPherson RA, Harding A, Roy S, Lane A, Hancock JF: Interactions of c-Raf-1 with phosphatidylserine and 14-3-3. *Oncogene* 18: 3863-3869 (1999)
- Michiels F, Habets GG, Stam JC, van der Kammen RA, Collard JG: A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* 375: 338-340 (1995)
- Moghal N, Sternberg PW: Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol* 11: 190-196 (1999)
- Morrison DK, Cutler RE: The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 174-179 (1997)
- Müller MS: Charakterisierung K-Ras-abhängiger Proteinkinasekaskaden in der humanen Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1. *Med Dissertation Universität Ulm*, 2004
- Nakagawa M, Fukata M, Yamage M, Itho N, Kaibuchi K: Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J Cell Sci* 114: 1829-1838 (2001)
- Nakao A, Harada A, Nonami T, Kaneko T, Takagi H: Clinical significance of carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer. *Pancreas* 12: 357-61 (1996)
- Nielsen KH, Gredsted L, Broach JR, Willumsen BM: Sensitivity of wild type and mutant *ras* alleles to Ras specific exchange factors: Identification of factor specific requirements. *Oncogene* 20: 2091-2100 (2001)

- Nigro S, Geido E, Infusini E, Orecchia R, Giaretti W: Transfection of human mutated *K-ras* in mouse NIH/3T3 cells is associated with increased cloning efficiency and DNA-aneuploidization. *Int J Cancer* 67: 871-875 (1996)
- Nimnual AS, Yatsula BA, Bar-Sagi D: Coupling of Ras and Rac Guanosine triphosphatases through the Ras exchanger SOS. *Science* 279: 560-563 (1998)
- Niv H, Gutmann O, Kloog Y, Henis YI: Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells. *J Cell Biol* 157: 865-872 (2002)
- Niv H, Gutman O, Henis YI, Kloog Y: Membrane interactions of a constitutively active GFP-Ki-Ras4B and their role in signaling. *J Biol Chem* 274: 1606-1613 (1999)
- Ohba Y, Michizuki N, Yamashita S: Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2 and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* 275: 20020-20026 (2000)
- Okada S, Yoshimori M, Kakizoe T: Pancreatic cancer: medical aspects. *Pancreas* 3: 349-354 (1998)
- Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ: Crystal structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Science* 273: 1392-1395 (1996)
- Otto JC, Kim E, Young SG, Casey PJ: Cloning and characterization of a mammalian prenyl protein specific protease. *J Biol Chem* 274: 8379-8382 (1999)
- Oxford G, Theodorescu D: Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility. *Cancer Lett* 189: 117-128 (2003)
- Pagès G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Méloche S, Pouyssegur J: Mitogen activated protein kinases p42 MAPK and p44 MAPK are required for fibroblast cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8319-8323 (1993)

Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 47: 5-27 (1997)

Parrini MC, Giglione C, Parmeggiani A: Co-ordination and specificity of the action of GTPase-activating proteins and GDP/GTP-exchange factors on Ras. *Biochem Soc Trans* 25: 997-1001 (1997)

Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y: Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* 20: 7486-93 (2001)

Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P: Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 64: 755-763 (2002)

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ: Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233 (1992)

Prendergast FG: Biophysics of the green fluorescent protein. *Methods Cell Biol* 58: 1-18 (1999)

Prior IA, Hancock JF: Compartmentalization of Ras Proteins. *J Cell Sci* 114: 1603-1608 (2001)

Prior IA, Harding A, Yan J, Sluimer J, Parton RG, Hancock JF: GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nature Cell Biol* 3: 368-375 (2001)

Rapp UR, Heidecker G, Huleihel M, Cleveland JL, Choi WC, Pawson T, Ihle JN, Anderson WB: raf family serine/threonine protein kinases in mitogen signal transduction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53: 173-184 (1988)

Rebollo A, Perez-Sala D, Martinez AC: Bcl-2 differentially targets K-, N- and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells. Implications in prevention of apoptosis. *Oncogene* 35: 4930-4939 (1999)

Reffas S, Schlegel W: Compartment specific regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by ERK-dependent and non-ERK-dependent inductions of MAPK phosphatase MKP-3 and MKP-1 in differentiating PI9 cells. *Biochem J* 352: 701-708 (2000)

Reiss Y, Goldstein JL, Seabra MC, Casey PJ, Brown MS: Inhibition of purified p21ras farnesyl: protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell* 62: 81-88 (1990)

Reuther GW, Lambert QT, Rebhun JF: RasGRP4 is a novel ras activator isolated from acute myeloid leukaemia. *J Biol Chem* 277: 30508-30514 (2002)

Rizzo MA, Shome K, Watkins SC, Romero G: The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J Biol Chem* 275: 23911-23918 (2000)

Rodriguez-Viciana P, Sabatier C, McCormick F: Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol* 24: 4943-4954 (2004)

Rodriguez-Viciana P, Marte BM, Warne PH, Downward J: Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351: 225-31 (1996)

Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J: Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370: 527-32 (1994)

Rowinsky EK, Windle LL, Von Hoff DD: Ras Protein Farnesyltransferase: a strategic target for anticancer therapeutic development. *J Clin Oncol* 17: 3631-3652 (1999)

Roy MO, Leventis R, Silviu JR: Mutational and biochemical analysis of plasma membrane targeting mediated by the farnesylated polybasic carboxy terminus of K-ras4B. *Biochemistry* 39: 8298-8307 (2000)

- Roy S, Luetterforst R, Harding A: Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1: 98-105 (1999)
- Ruddle FH: Gene transfer in eukaryotes. In: Celis JE, Graesmann A, Loyter A (Hrsg): *Transfer of cell constituents into eukaryotic cells*. Plenum New York: 295-309 (1979)
- Ruddle FH: Somatic cell genetics; past, present and future. In: Arrighi FE, Rao PN, Stubblefield E (Hrsg): *genes, chromosomes and neoplasia*. Raven Press, New York, 7-17 (1980)
- Sahai E, Olson MF, Marshall CJ: Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J* 20: 755-766 (2001)
- Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG: Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behaviour. *J Cell Biol* 147: 1009-1021 (1999)
- Scangos G, Huttner KM, Juricek DK, Ruddle FH: DNA-mediated gene transfer in mammalian cells: molecular analysis of unstable transformants and their progression to stability. *Mol Cell Biol* 1: 111-120 (1981)
- Scheele JS, Rhee JM, Boss GR: Determination of absolute amounts of GDP and GTP-bound to Ras in mammalian cells: comparison of parenteral and Ras-overproducing NIH3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1097-1100 (1995)
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmueller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A: The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277: 333-338 (1997)
- Schneider G, Lersch C, Schmid RM: Karzinogenese des Pankreaskarzinoms. *Chirurg* 74: 165-170 (2003)

Scita G, Tenca P, Frittoli E, Tocchetti A, Innocenti M, Giardina G, Di Fiore PP: Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO J* 19: 2393-2398 (2000)

Seger R, Krebs EG: The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9: 726-735 (1995)

Seufferlein T, Van Lint J, Liptay S, Adler G, Schmid R: Transforming growth factor  $\alpha$  activates Ha-Ras in human pancreatic cancer cells with Ki-ras mutations. *Gastroenterology* 116: 1441-1452 (1999)

Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ: Understanding Ras: „It ain't over ,til it's over“. *Trends Cell Biol* 10: 147-154 (2000)

Shimizu K, Goldfarb M, Suard Y, Perucho M, Li Y, Kamata T, Feramisco J, Stavnezer E, Fogh J, Wigler MH: Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2112-2116 (1983)

Shimomura O, Hohnson FH, Saiga Y: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-227 (1962)

Siddiqui AA, Garland JR, Dalton MB, Sinensky M: Evidence for a high affinity, saturable, prenylation-dependent p21Ha- ras binding site in plasma membranes. *J Biol Chem* 273: 3712-3717 (1998)

Sigal IS, Gibbs JB, D'Alonzo JS, Temeles GL, Wolanski BS, Socher SH, Scolnick FM: Mutant ras encoded proteins with altered nucleotide binding exert dominant biological effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 952-956 (1986)

Simons K, Toomre D: Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39 (2000)

Smith JJ, Derynck R, Korc M: Production of transforming growth factor alpha in human pancreatic cancer cells: evidence for a superagonist autocrine cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7567 (1987)

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85 (1985)

Soderqvist H, Imreh G, Kihlmark M, Linnman C, Ringertz N, Hallberg E: Intracellular distribution of an integral nuclear pore membrane protein fused to green fluorescent protein-localization of a targeting domain. *Eur J Biochem* 250:803-813 (1997)

Sorrentino R, Porcellini A, Spalletti-Cernia D, Lombardi V, Vecchio G, Laccetti P: Inhibition of MAPK activity, cell proliferation, and anchorage-independent growth by N-Ras antisense in an N-ras-transformed human cell line. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 11: 349-358 (2001)

Stähle M, Veit C, Bachfischer U, Schierling K, Skripczynski B, Hall A, Gierschik P, Giehl K: Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK. *J Cell Science* 116: 3835-3846 (2003)

Stambolic V, Mak TW, Woodgett JR: Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis. *Oncogene* 18: 6094-6103 (1999)

Stewart S, Guan KL: The dominant negative Ras mutant, N17Ras, can inhibit signaling independently of blocking ras activation. *J Biol Chem* 275: 8854-8862 (2000)

Stokoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symons M, Hancock JF: Activation of Ras as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264: 1463-1467 (1994)

Sumi S, Beauchamp RD, Townsend JR, Pour PM, Ishizuka J, Thompson JC: Lovastatin inhibits pancreatic cancer growth regardless of Ras Mutation. *Pancreas* 5: 657-661 (1994)

Sun J, Qian Y, Hamilton AD, Sebti SM: Both farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors are required for inhibition of oncogenic K-Ras prenylation but each alone is sufficient to suppress human tumor growth in nude mouse xenografts. *Oncogene* 11: 1461-1473 (1998)

Szybalski W, Szybalska EH: Genetics of human cell lines, IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 2026-2034 (1962)

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208 (2001)

Terhune PG, Phifer DM, Tosteson TD, Longnecker DS: K-ras mutation in focal proliferative lesions of human pancreas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 515-521 (1998)

Thissen JA, Gross JM, Subramanian K, Meyer T, Casey PJ: Prenylation-dependent association of Ki-Ras with microtubules. Evidence for a role in subcellular trafficking. *J Biol Chem* 272: 30362-30370 (1997)

Tian X, Feig LA: Basis for signaling specificity difference between Sos and Ras-GRF Guanine Nucleotide Exchange Factors. *J Biol Chem* 276: 47248-47256 (2001)

Trahey M, McCormick F: A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238: 542-545 (1987)

Tran NH, Frost JA: Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated kinase 1 and SRC regulates Raf-1 autoinhibition. *J Biol Chem* 278: 11221-11226 (2003)

Tsien RY: The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-544 (1998)

Umanoff H, Edelmann W, Pellicer A, Kucherlapati R: The murine N-Ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci* 92: 1709-1713 (1995)

- van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE und Lefkowitz RJ: Mitogenic signaling via G-protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 17: 698-714 (1996)
- Visvanathan KV, Pocock RD, Summerhayes IC: Preferential and novel activation of H-ras in human bladder carcinomas. *Oncogene Res* 3: 77-86 (1988)
- Voice JK, Klemke RL, Le A, Jackson JH: Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J Biol Chem* 274: 17164-17170 (1999)
- Walsh AB, Bar-Sagi D: Differential activation of the Rac Pathway by Ha-Ras and K-Ras. *J Biol Chem* 276: 15609-15615 (2001)
- Wang S, Hazelrigg T: Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369: 400-403 (1994)
- Ward WW, Cody CW, Hart RC, Cormier MJ: Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in Renilla und Aequorea green-fluorescent proteine. *Photochem Photobiol* 31: 611-615 (1980)
- Watanabe M, Nobuta A, Tanaka J, Asaka M: An Effect of K-ras gene mutation on epidermal growth factor receptor signal transduction in PANC-1 pancreatic carcinoma cells. *Int J Cancer* 67: 264-268 (1996)
- Watzinger F, Mayr B, Gamerith R, Vetter C, Lion T: Comparative analysis of *ras* proto-oncogene mutations in selected mammalian tumors. *Mol Carcinog* 30: 190-198 (2001)
- Webb CP, Van AL, Wigler MH, Woude GF: Signalling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8773-8778 (1998)
- Weber CK, Slupsky JR, Hermann C, Schuler M, Rapp UR, Block C: Mitogenic signaling of Ras is regulated by different interaction with Raf isozymes. *Oncogene* 19: 169-176 (2000)

Wells A: Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res* 78: 31-101 (2000)

Welman A, Burger MM, Hagmann J: Structure and function of the c-terminal hypervariable region of K-Ras4B in plasma membrane targetting and transformation. *Oncogene* 19: 4582-4591 (2000)

Whitmarsh AJ, Davis RJ: a central control for cell growth. *Nature* 403: 255-256 (2000)

Wigler M, Seet R, Sim GK, Wold B, Pellicer A, Lacy E, Maniatis T, Silverstein S, Axel R: Transformation of mammalian cells with genes from prokaryotes and eukaryotes. *Cell* 16: 777-785 (1979)

Wittinghofer A, Nassar N: How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci* 21: 488-491 (1996)

Wittinghofer A, Waldmann H: Ras- Ein molekularer Schalter bei der Tumorentstehung. *Angew Chem* 112: 4360-4383 (2000)

Wolfman JC, Wolfman A: Endogenous c-N-Ras provides a steady-state anti-apoptotic signal. *J Biol Chem* 275: 19315-19323 (2000)

Wymann MP, Pirola L: Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436: 127-150 (1998)

Yamanaka Y, Friess H, Koblin MS: Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res* 13: 565-569 (1993)

Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A and Hancock JF: Ras Isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and Phosphoinositide 3-Kinase. *J Biol Chem* 273: 24052-24056 (1998)

Yang F, Moss LG, Phillips GN: The molecular structure of green-fluorescent protein. *Nature Biotechnol* 14: 1246-1251 (1996)

Yang Y, Li L, Wong GW, Krilis SA, Madhusudhan MS, Sali A, Stevens RL: RasGRP4, a new mast cell-restricted ras guanine nucleotide releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. Identification of defective variants of this signaling protein in asthma, mastocytosis and mast cell leukemia patients; and demonstration of the importance of RasGRP4 in mast cell development and function. *J Biol Chem* 277: 25756-25774 (2002)

Yeung K, Janosch P, McFerran B, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W: Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the Raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol* 20: 3079-3085 (2000)

Yip-Schneider MT, Lin A, Marshall MS: Pancreatic tumor cells with mutant K-Ras suppress ERK activity by MEK-dependent induction of MAP kinase phosphatase-2. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 992-997 (2001)

Zamboni G, Capelli P, Pesci A, Beghelli S, Lüttges J, Klöppel G: Pancreatic Head Mass: What Can Be Done? Classification: the Pathological Point of View. *JOP* 1: 77-84 (2000)

Zhang J, King WG, Dillon S, Hall A, Feig L, Rittenhouse SE: Activation of platelet phosphatidylinositol 3-Kinase requires the small GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem* 268: 22241-22254 (1993)

Zohn IM, Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Der CJ: Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* 17: 1415-1438 (1998)

Zondag GCM, Evers EE, ten Klooster JP, Janssen L, van der Kammen RA, Collard JG: Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 149: 775-781 (2000)

## 10 Danksagung

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Peter Gierschik für die freundliche Aufnahme in der Abteilung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das große Interesse an meiner Arbeit.

Frau PD Dr. Klaudia Giehl für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung der Arbeit und die Geduld, die sie mir entgegengebracht hat.

Herrn PD Dr. Andre Menke für die zeitweilige Bereitstellung seines Labors.

Weiter bedanke ich mich bei

Frau Angela Mansard und Frau Anja Engst für die Unterstützung bei meiner Arbeit und die vielen interessanten Gespräche,

den Mitarbeitern des Labors Ulla Bachfischer, Christine Veit, Yannick Aguilar, Gesa Kierschke, Ute Dreißigacker und *last but not least* Rene Schwarz für das angenehme Laborklima und die reibungslose Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt

meinen Eltern und meiner Schwester Dagmar für ihre Unterstützung, besonders in schwierigen Zeiten,

Zemine Yasar und Jan Lowak für die vielen hilfreichen Gespräche,

Torsten Reiner für den EDV-Support,

Andreas Reiner für seine Freundschaft,

Dr. Jannis Mohm für seine wunderbare Art.

# 11 Lebenslauf

## Persönliche Daten

Nachname Siegert  
 Vornamen Patrizia Eva  
 Geburtstag/-ort 27. Juli 1976, Heydebreck-Cosel, Polen  
 Anschrift Vörstetterstr. 11  
 79194 Gundelfingen  
 Staatsangehörigkeit deutsch

## Schulbildung

10/1983 – 07/1987 Grundschule  
 08/1987 – 07/1996 Heinrich - Heine –Gymnasium, Ostfildern  
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Hochschulbildung:

10/1996 Beginn des Humanmedizinstudiums an der Universität Ulm  
 09/1998 Ärztliche Vorprüfung  
 08/1999 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
 03/2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
 13.05.2003 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

## Famulaturen

07-09/1996 Krankenpflegepraktikum Innere Medizin, Paracelsus-Krankenhaus Ostfildern  
 03/1999 HNO-Praxis, Paracelsus-Krankenhaus Ostfildern  
 09-10/1999 Innere Medizin, Paracelsus-Krankenhaus Ostfildern  
 08-09/2000 Gynäkologie, Pädiatrie und Traditionelle Chinesische Medizin, Southeast University Medical College, Nanjing, China  
 08/2001 Neurologie, Fachklinik für Neurologie, Dietenbronn  
 09/2001 Internistische Onkologie, Klinik für Tumorbiologie, Freiburg im Breisgau

## Praktisches Jahr

04–08/2002 1. Abschnitt: Universitätsklinik für Anästhesiologie, Ulm  
 08–10/2002 2. Abschnitt: Thorax- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Ulm  
 10–12/2002 Allgemein Chirurgie, Raigmore Hospital, Inverness, Großbritannien  
 12/2002–04/2003 3. Abschnitt: Innere Medizin, Spital Dornach, Schweiz

## Berufliche Tätigkeit

07/2003-09/2004 Ärztin im Praktikum in der Klinik für Tumorbiologie, Freiburg im Breisgau  
 10/2004-06/2005 Assistenzärztin in der Klinik für Tumorbiologie, Freiburg im Breisgau  
 Co-Investigator einer Phase-I-Studie zur Prüfung eines VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitors bei metastasierten soliden Tumoren  
 Seit 06/2005 Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin III des Schwarzwald-Baar Klinikums Villingen-Schwenningen GmbH

## 12 Publikationen/Kongressbeiträge

1. Bachfischer U, Siegert P, Mansard A, Gierschik P and Giehl K (2000): Epidermal growth factor induces N-Ras activation in the K-Ras mutated human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. 51. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, „*GTP-Binding Proteins: Central Regulators in Cell Biology*“, Mosbach / Baden (Posterbeitrag)
2. Giehl K, Schierling K, Siegert P, Bachfischer U, Veit C und Gierschik P (2000): Functional analysis of GTPases in cellular transformation using EGFP-tagged Ras and Rac1. Millenium Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Berlin, Signal Transduction (2001) Suppl. Vol.1: 55 (Posterbeitrag)
3. Giehl K, Siegert P, Dreißigacker U, Bachfischer U und Gierschik P (2001): Functional significance of activated K-Ras for the transformed phenotype of PANC-1 pancreatic carcinoma cells. 11. Kongress der Arbeitsgemeinschaft experimentelle Krebsforschung der Deutschen Krebsgesellschaft, Heidelberg, J. Cancer Res. Clin. Oncol. Suppl. Vol. 127 (1): CB55 (S65) (Posterbeitrag)
4. Dreißigacker U, Siegert P, Meinel K, Mansard A, Gierschik P und Giehl K. (2001): Functional significance of activated K-Ras for the transformed phenotype of PANC-1 pancreatic carcinoma cells. 5<sup>th</sup> Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes, Weimar, Signal Transduction (2001) Suppl. Vol.1-2: 147 (Posterbeitrag)
5. Giehl K, Dreißigacker U, Müller M, Siegert P, Bachfischer U, Meinel K und Gierschik P (2002): Overexpression of oncogenic K-Ras in pancreatic carcinoma cells results in morphological transformation and enhanced cell migration and invasion. 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. Vol. 365 (1): R 52 (193) (Vortrag)
6. Dreißigacker U, Müller MS, Unger M, Siegert P, Genze F, Gierschik P, Giehl K (2005): Oncogenic K-Ras downregulates Rac1 and RhoA activity and induces enhanced migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. Artikel zur Publikation eingereicht.