

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Kommissarischer Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Götz von Wichert

**Expression und Lokalisation von Galektin-1, Galektin-3 und
Galektin-8 in Pankreaskarzinomzelllinien**

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Andreea Porr
geb. in Braşov, Rumänien
2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaudia Giehl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth

Tag der Promotion: 19.05.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	III
1. Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom.....	1
1.2 Molekulare Grundlagen des Pankreasadenokarzinoms	4
1.3 Die Ras-Proteine	5
1.4 Struktur der Ras-Proteine.....	7
1.5 Isoform-spezifische Funktionen der Ras-Proteine.....	10
1.6 Die Galektine	11
1.7 Ziel der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	25
2.1.3 Rekombinante Proteine	26
2.1.4 Prokaryontische und eukaryontische Zellen.....	26
2.1.5 Plasmide	29
2.1.6 Enzyme, Transfektionsreagenzien und molekularbiologische Kits	29
2.1.7 Antikörper.....	30
2.1.8 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	32
2.1.9 Marker für Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.1.10 Oligonukleotide	33
2.1.11 Medien und Standardlösungen.....	33
2.1.12 Geräte.....	34
2.1.13 Software.....	35
2.2 Methoden	36
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	36
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	45
2.2.4 Zellbiologische Methoden	56

2.2.5	Auswertung.....	59
3.	Ergebnisse	60
3.1.	Quantitative Analyse der Proteinexpression von Galektin-1, -3, und -8 in verschiedenen Zelllinien.....	62
3.2	Analyse der kodierenden DNA des Galektin-8 mittel PCR in unterschiedlichen Zelllinien.....	76
3.3	Klonierung von pcDNA3/Galektin-8 long und pcDNA3/Galektin-8 short.....	80
3.4	Co-Expression von Galektin-8 long und Galektin-8 short und Ras-Isoformen in PANC-1- und HEK 293-Zellen	88
3.5	Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Galektin-8 long und Galektin-8 short an Ras-Isoformen durch <i>in vitro</i> -Bindungsstudien	91
4.	Diskussion	104
4.1	Quantifizierung der Expression der Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8- Isoformen in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien	106
4.2	Analyse der Galektin-8 cDNA und Identifizierung der zwei Isoformen- Galektin-8 long und Galektin-8 short.....	110
4.3	Identifizierung von Galektin-8 als Interaktionspartner von Ras-Isoformen.....	111
5.	Zusammenfassung	117
6.	Literaturverzeichnis	119
	Anhang	141
	Danksagung	145

Abkürzungen

AKT	Proteinkinase B
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	<i>bibinichoninic acid</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BHL	<i>bovine heart lectin</i>
bp	Basenpaare
BRCA 2	<i>BReast CAncer 2</i>
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CBP 35	<i>carbohydrate-binding protein 35 kDa</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	kodierende Desoxyribonukleinsäure
CEA	Karzinembryonäres Antigen
CMF-PBS	Calcium- und Magnesium-freies PBS
CR3	<i>complement receptor 3</i>
CRD	Cystein-reiche Domäne
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbeccos's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
e.V.	eigetrager Verein
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>

EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G1-3	Guaninbase-bindende Sequenzelemente
Gal-1	Galektin-1
Gal-3	Galektin-3
Gal-8L	Galektin-8 long (lange Isoform)
Gal-8S	Galektin-8 short (kurze Isoform)
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	grün fluoreszierende Protein
GL	Gesamtlysat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRIFIN	<i>glectin-related interfiberprotein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HA	Influenza-Virus-Hämagglutinin-12CA5-Epitop
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HER-2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HMW	<i>high molecular weight</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
JNK	<i>c-jun NH₂-terminal protein kinase</i>
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	<i>lectin</i>
Lamp-1 und -2	<i>lysosome-associated membrane proteins 1 and 2</i>
LB	Luria Bertani

LMW	<i>low molecular weight</i>
M	Mol
m/V	Masse pro Volumen
MAPK/ERK	<i>mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated Kinase</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
P	<i>particular fraction</i>
p. a.	<i>pro analysi</i>
PanIN	<i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC ξ	Proteinkinase C zeta
PLC ϵ	Phospholipase C epsilon
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP-13	<i>placental tissue protein 13</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunde
S	<i>soluble fraction</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interference RNA</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethylethylendiamin
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
Thy-1 Antigen	<i>thymus cell antigen 1</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 20	Polyoxymethylensorbitan-monolaurat
U	<i>unit</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute

UV	Ultraviolett
V/V	Volumen pro Volumen
VT	Volumenteil
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreas ist eine exokrine und endokrine Drüse, die zahlreiche hormonregulierte Funktionen in der Protein- und Kohlenhydratverdauung und der Glukose-Homöostase besitzt.

Der endokrine Teil des Pankreas besteht aus den Langerhans-Inseln, die fünf unterschiedlichen hormonproduzierenden Zelltypen (Edlund, 2002) enthält: A-Zellen (α -Zellen: Glucagon-produzierende α -Zellen), B-Zellen (Insulin-produzierende β -Zellen), D-Zellen (Somatostatin-sezierende δ -Zellen:), PP-Zellen (pankreatisches Polypeptid-produzierende Zellen) und die Ghrelin-Zellen (Ghrelin-sezierende γ -Zellen) (Andralojc *et al.*, 2009). Der exokrine Anteil des Pankreas, der etwa 80% der Organmasse ausmacht, ist aus einem verzweigten Netzwerk von Azinus- und Gangzellen aufgebaut, die für die Produktion und Sezernierung der Verdauungsenzyme in den Gastrointestinaltrakt verantwortlich sind. Die exokrine Funktion besteht darin, alkalisches Pankreassekret zu produzieren. Die darin enthaltenen Verdauungsenzyme dienen der Nahrungsaufschlüsselung.

Der Ursprungsort für ein Pankreaskarzinom ist in den meisten Fällen das Epithel der kleinen Pankreasgänge unter Bildung eines duktales Karzinoms und in 10 % der Fälle das Azinusepithel, was zur Entstehung eines azinäres Karzinoms führt. 98 % der Pankreastumoren entstehen aus dem exokrinen Organanteil, und hier vor allen Dingen aus dem Epithel der Pankreasgänge (Bardeesy und DePinho, 2002).

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas gehört zu den aggressivsten menschlichen Neoplasien (Haller, 2003). Mittlerweile steht es in der globalen Krebsstatistik an vierter Stelle, nach Bronchial-, Prostata- bzw. Brust- und Kolonkarzinom (American Cancer Society, Inc., Surveillance and Health Policy Research, 2009). In Deutschland werden zwischen 6300 und 6600 Neuerkrankungen an Pankreaskarzinom pro Jahr und genauso viele Sterbefälle registriert. Die geschätzte Inzidenz wie auch die Mortalität an Pankreaskarzinomen blieben in Deutschland bei Männern seit Ende der 1980er Jahre konstant. Bei Frauen steigt die Inzidenz gleichartig wie die Mortalität leicht an. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 76 Jahren und für Männer bei 69 (aus: Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends. Eine gemeinsame Veröffentlichung

des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 6. überarbeitete Auflage, 2008). Eine Zunahme der Prävalenz des Pankreaskarzinoms wird auf Übergewicht (Michand de Gonzales *et al.*, 2001; Percik *et al.*, 2009), zunehmendes Lebensalter und Rauchen (Ghaneh *et al.*, 2007) zurückgeführt. Muscat und seine Arbeitsgruppe konnten bereits 1997 in einer epidemiologischen Studie zeigen, dass 30% der Pankreaskarzinome auf das langjährige Rauchen zurückzuführen sind (Muscat *et al.*, 1997). Zum gleichen Ergebnis kamen auch Iodice und Mitarbeiter in einer aktuellen Meta-Analyse, die den Zusammenhang zwischen Rauchen und der Entstehung eines Pankreaskarzinoms untersucht (Iodice *et al.*, 2008). Andere Risikofaktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms sind vor allem hereditäre Pankreaserkrankungen (Brand *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2003; Ghaneh *et al.*, 2007), chronische familiäre Pankreatitis (Lowenfels *et al.*, 1993), familiäres atypisches multiples Melanom (Bartsch *et al.*, 2002), Peutz-Jeghers Syndrom (Gruber *et al.*, 1998), Diabetes mellitus (Everhart *et al.*, 1995), Gallensteine und Umwelt- und Ernährungsfaktoren (Yeo *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2005).

Für den exzessiven Alkoholkonsum als Risikofaktor zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms existieren verschiedene kontroverse Studien. Genkinger und Mitarbeiter haben all diese Ergebnisse analysiert und kamen zur Schlussfolgerung dass, ein Alkoholkonsum von 30 g oder mehr über mehrere Jahre zu einem minimalen Anstieg des Risikos an Pankreaskarzinom zu erkranken führt (Genkinger *et al.*, 2009)

Da die spezifischen Frühsymptome fehlen und bislang keine Verfahren für ein routinemäßiges Screening existieren, werden 90% der Pankreaskarzinome erst im metastasierten Stadium diagnostiziert (Haller, 2003; Jemal *et al.*, 2007). Die Prognose des Pankreaskarzinoms wird von einer sehr frühen lymphogenen, neurogenen und hämatogenen Karzinomzell dissemination bestimmt (Hermanek, 1991; Takahashi *et al.*, 1992; Jemal *et al.*, 2007). Etwa 75% der Patienten sterben im ersten Jahr nach Diagnosestellung und nur 4-5% überleben nach 5 Jahren. Auch die im T1 und T2 N0 M0 R0 Stadium (Wittekind *et al.*, 2003) diagnostizierten und resezierten Tumoren führen nur zu einer 20%igen Fünf-Jahres-Überlebensrate (Haller, 2003; Jemal *et al.*, 2007).

Hruban und Mitarbeiter haben für die Entstehung des Pankreasadenokarzinoms ein Progressionsmodell aufgestellt (Hruban *et al.*, 2000). Danach entstehen Pankreasadenokarzinome aus normalen Pankreasgangepithelzellen, aus denen schrittweise über kleinste Vorläuferläsionen ein maligner Tumor entsteht. Im Verlauf durchläuft das normale muzinproduzierende Gangepithel vier histologische Stadien, über die *pancreatic*

intraepithelial neoplasias (PanINs) bis zum malignen, infiltrativen Pankreasadenokarzinom.

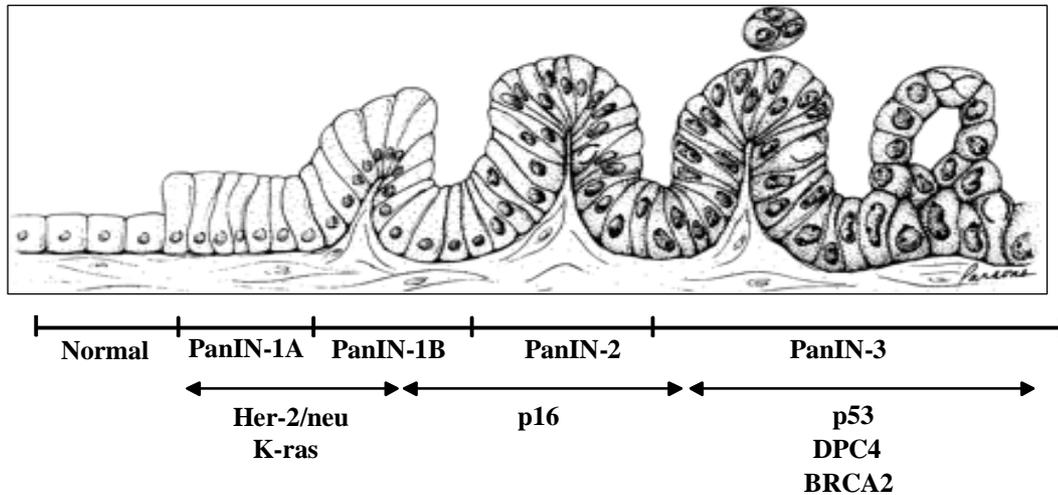


Abb. 1: Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms. Aus dem normalen Epithel der Pankreasgänge entwickelt sich über verschiedene Stadien von Vorläuferläsionen sog. *pancreatic intraepithelial neoplasias* (PanINs), die verschiedengradige zytologische und architekturelle Atypien aufweisen, ein Karzinom. In den frühen Stadien sind Punktmutationen im *K-ras*-Protoonkogen nachweisbar, in späteren Stadien kommen Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen, zunächst von *p16*, in späteren Stadien von *p53*, *DPC4* und *BRCA2* hinzu (nach Hruban *et al.*, 2000).

Bereits in den frühen Stadien (PanIN-1A und PanIN-1B), die nur minimale Veränderungen der Epithelstruktur aufweisen, konnten in 50% der Fälle aktivierende Mutationen im Kodon 12 des *K-ras*-Gens und eine Überexpression des EGF-Rezeptors HER-2/neu nachgewiesen werden (Day *et al.*, 1996; Caldas *et al.*, 1994). Frühe PanIN Läsionen konnten auch bei Patienten mit normalen Pankreasgewebe aber mit einer chronischen Pankreatitis, nachgewiesen werden (Hruban *et al.*, 2000; Adsay, 2005; Tanaka *et al.*, 2006; Hezel *et al.*; 2006). In den höheren PanIN Stadien konnte zusätzlich eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *p16* (Wilentz *et al.*, 1998) beobachtet werden. Im fortgeschrittenen Stadium PanIN-3, dem *carcinoma in situ*, weisen die Läsionen einen Verlust der Tumorsuppressorgene *p53*, *DPC4* und *BRCA2* auf (Pellegata *et al.*, 1994; Goggins *et al.*, 2000; Wilentz *et al.*, 2000). Da aktivierende *K-ras*-Mutationen bereits im frühen Stadium der Zellveränderung im Pankreasgewebe auftreten und etwa 90% der Adenokarzinome des Pankreas diese Mutation aufweisen (Almoguerra *et al.*, 1998), wurden die Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 als Modellsystem zur Untersuchung der speziellen Funktion in der Umwandlung von normalen Epithelzellen zur Karzinomzelle, ausgewählt.

Ein tieferes Verständnis der molekularen und genetischen Veränderungen vom normalen Gangepithel zur malignen Umwandlung und Metastasierung des Pankreasgewebes ist notwendig, um neue und effektive Therapien für das Adenokarzinom des Pankreas etablieren zu können.

1.2 Molekulare Grundlagen des Pankreasadenokarzinoms

Die im Pankreaskarzinom häufigsten beschriebenen genetischen Veränderungen betreffen das Protoonkogen *K-ras* (Hruban *et al.*, 2000) und die Tumorsuppressorgene *p16* und *p53* (DiGiuseppe *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1996; Khalid, 2009). Punktmutationen im Kodon 12, seltener auch im Kodon 13 oder 61, der Protoonkogene *K-*, *N-* und *H-ras* führen zur Bildung von konstitutiv aktiven Onkogenen (Bos, 1988). Diese Punktmutationen beinhalten einen Basenaustausch von GGT zu GAT, GTT oder CGT, der zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Asparaginsäure, Valin oder Arginin führt (Laghi *et al.*, 2002). Aktive *ras*-Onkogene lassen sich in vielen maligne Tumoren nachweisen:

Tabelle 1: Häufigkeit der aktiven *ras*-Onkogene in Malignome:

Maligner Tumor	Häufigkeit der aktiven <i>ras</i> -Onkogene (%)	Literatur
Adenokarzinom des Pankreas	80-93% (<i>K-ras</i>)	Bos, 1989; Caldas, 1994; Almoguerra <i>et al.</i> , 1988
Kolorektales Karzinom	50% (<i>K-ras</i>)	Forrester <i>et al.</i> , 1987
Adenokarzinom der Lunge	33% (<i>K-ras</i>)	Rodenhuis <i>et al.</i> , 1988
Akute myeloische Leukämie	30% (<i>N-ras</i>)	Janssen <i>et al.</i> , 1987
Blasenkarzinom	10% (<i>H-ras</i>)	VisVanathan <i>et al.</i> , 1988
Nierenkarzinom	10% (<i>H-ras</i>)	Fujita <i>et al.</i> , 1988

Eine Mutation im *K-ras*-Protoonkogen reicht jedoch nicht aus, um eine morphologisch und genetisch intakte Pankreaszelle in einen malignen Phänotyp umzuwandeln (Bos, 1989; Khalid, 2009). Etwa 70% der Pankreaskarzinome weisen zusätzlich eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *p53* auf, die durch eine Deletion oder Mutation einen Funktionsverlust hervorruft. Andere Tumorsuppressorgene, wie SMAD4, ein Regulator von TGF- β (*transforming growth factor β*)-abhängigen Signalwegen, oder *p16* und *p53* können ebenfalls betroffen sein (Perugini *et al.*, 1998; Laghi *et al.*, 2002). Mutationen des *p53* Tumorsuppressorgens kommen in mehr als 50% der Adenokarzinome des Pankreas

vor (Rozenblum *et al.*, 1997) und führen im hochgradigen PanIN-3 zu Aneuploidie, starken zellulären Atypien und Bildung eines *carcinoma in situ*. (Hruban *et al.*, 2000; Harada *et al.*, 2002)

1.3 Die Ras-Proteine

Ras-Proteine gehören zur Gruppe der membranassoziierten Guaninnukleotid-bindenden Proteine. Ihre Funktion ist die Transduktion von Signalen membranständiger Rezeptoren an intrazellulären Signalkaskaden, indem sie als molekulare Schalter zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen und einer aktiven GTP-gebundenen Konformation wechseln (Giehl, 2005). Humane Zellen enthalten über hundert verschiedene GTP-bindende Proteine, die in 5 Superfamilien eingeteilt werden: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran Superfamilie (Takai *et al.*, 2001; Giehl, 2005). Zu den klassischen Ras-Proteine, dessen Name sich vom *rat sarcoma* ableitet, gehören H (Harvey)-Ras, N (Neuroblastoma)-Ras und K (Kirsten)-Ras, mit den zwei Spleiß-Varianten K-Ras4A und K-Ras4B (Wennerberg *et al.*, 2005). Ras wirkt als Bindungsglied zwischen membranständigen Rezeptoren wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), und nachgeschalteten zellulären Signalkaskaden (Giehl *et al.*, 2000; Janssen, 2003; Giehl, 2005). Der Austausch der gebundenen Guaninnukleotide, der sogenannte GDP/GTP-Zyklus, wird durch 2 Klassen von Regulatorproteinen, den *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) und den *GTPase-activating proteins* (GAPs), reguliert und dadurch tausendfach beschleunigt (siehe Abb. 2). GEFs katalysieren den Austausch von GDP gegen GTP und aktivieren somit die Ras-Proteine (Cherfils u Chardin, 1999; Giehl, 2005). GAPs erhöhen im GDP/GTP-Zyklus die intrinsische GTPase Aktivität und beschleunigen die Hydrolyse zu GDP und somit die Überführung in den inaktiven Zustand der Ras-Proteine (Donovan *et al.*, 2002).

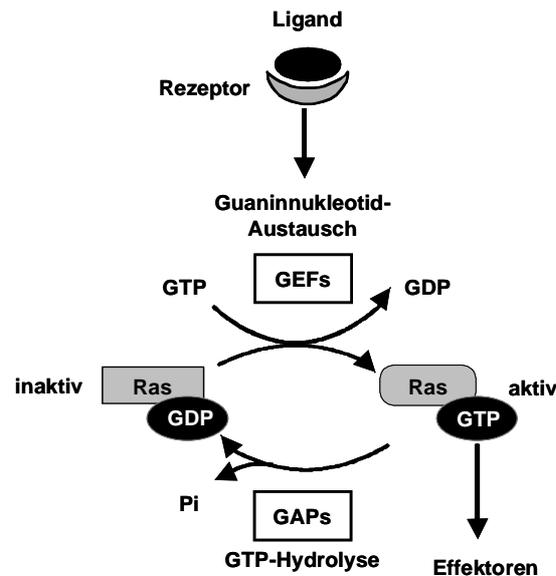


Abb. 2: Der Ras-GDP/GTP-Zyklus. Ras wird durch den Austausch von GDP gegen GTP aktiviert. Dieser Schritt wird durch GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) katalysiert, welche rezeptorvermittelt durch extrazelluläre Signale aktiviert werden. Durch Hydrolyse von GTP zu GDP wird aktives Ras wieder in seine inaktive Form überführt. Diese Reaktion wird durch GAPs (*GTPase-activating proteins*) katalysiert (Giehl, 2005).

Im aktiven Zustand können Ras-Proteine mit Effektorproteinen interagieren. Dies sind Proteine, die bevorzugt an die aktive, GTP-gebundenen Form von Ras binden und das Signal weiterleiten (Herrmann *et al.*, 2003). Im inaktiven Zustand kann Ras nicht mit Effektoren wechselwirken. Mehr als zehn solcher Effektorproteine sind heute bekannt. Einige der wichtigsten und meist untersuchten Effektoren sind Raf-Kinasen (Dhillon *et al.*, 2002), PI3-Kinasen (*phosphatidylinositol 3-kinases*) (Wymann *et al.*, 2003), RalGEF (Wolthuis *et al.*, 1998; Gonzalez-Garcia *et al.*, 2005), AF-6 (Kuriyama *et al.*, 1996), Nore1/RASSF (Vavvas *et al.*, 1998), MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated Kinase*), (Lange-Carter und Johnson, 1994), Rin1 (Han und Colicelli, 1995), Phospholipase C epsilon (PLC ϵ) (Kelley *et al.*, 2001) und die Proteinkinase C zeta (PKC ζ) (Diaz-Meco *et al.*, 1994).

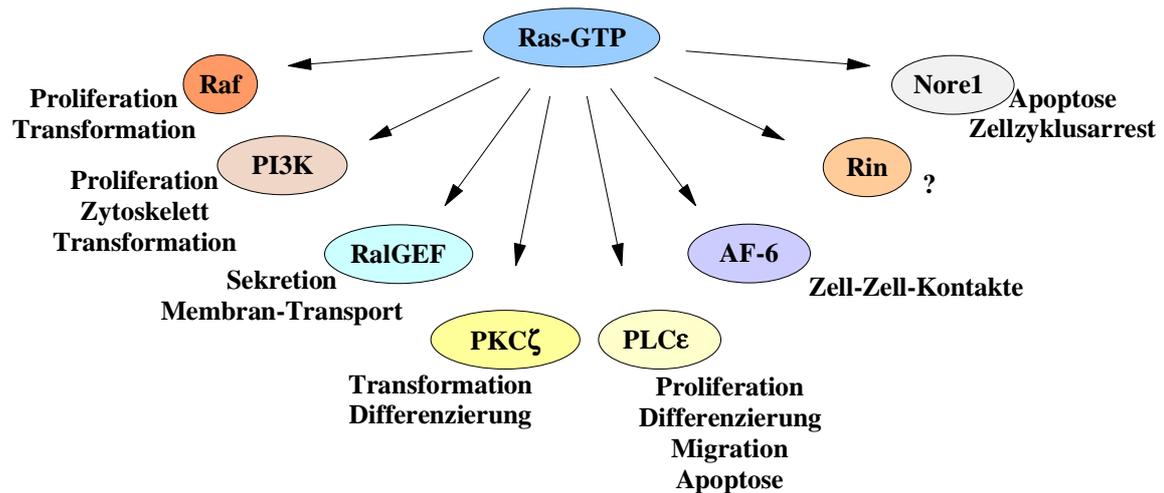


Abb. 3: Übersicht der bisher bekannten Ras-Effektorproteine und deren biologische Rolle in humanen Zellen (Ehrhardt *et al.*, 2002)

Die Halbwertszeit eines von Ras weitergeleiteten Signals wird durch die Bestehensdauer der aktiven Form bestimmt. Wird diese, durch verschiedene Mechanismen, verlängert, kann die nun unregulierte Antwort zu verschiedenen pathologischen Veränderungen in der Zelle führen. Aktive, GTP-gebundene Ras-Proteine kontrollieren zahlreiche biologische Funktionen, wie das Zellwachstums und die Proliferation (Martin und Blenis, 2002; Giehl, 2005), die zellulären Differenzierung, die Apoptose und die Ausbildung der Zellmorphologie (Downward, 1998). Eine weitere biologische Rolle der Ras-Proteine ist die Regulation der Migration und der Zellmotilität (Giehl, 2005). Die Aktivierung der Ras-Proteine bewirkt eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts mit begleitendem Zelladhäsionsverlust und erhöhter Matrix-Metalloproteasen-Aktivität (Wells, 2000; Giehl, 2005).

1.4 Struktur der Ras-Proteine

Drei *ras*-Gene auf unterschiedlichen Genloci wurden im menschlichen Genom identifiziert: *H-ras* (Chromosom 11 – 11p15-p15.5), *N-ras* (Chromosom 1 – 1p22-p32) und *K-ras* (Chromosom 12 – 12p12.1-pter) (Barbacid, 1987). Letzteres wird in zwei alternative Varianten gespleißt: K-Ras4A und K-Ras4B, die sich in den letzten, durch Exon 4 kodierten, 25 Aminosäuren unterscheiden (Barbacid, 1987; Khosravi-Far *et al.*, 1998). Die *ras*-Gene sind hoch konserviert und ubiquitär exprimiert. Da K-Ras4A in humanen Zellen nur in sehr geringem Maße exprimiert wird (Shimizu *et al.*, 1983), wird in

dieser Arbeit der Begriff „K-Ras“ als Synonym für K-Ras4B verwendet. Die vier Ras-Proteine haben eine Molekularmasse von 21 kDa, was einem Aminosäuregehalt von 189 Aminosäuren für H-Ras, K-Ras4A und N-Ras, und von 188 Aminosäuren für K-Ras4B entspricht. In ihrer Aminosäuresequenz weisen alle vier Ras-Proteine eine hohe Homologie auf. Die ersten 85 Aminosäuren sind in allen vier Ras-Proteine gleich und die daran anschließenden 80 Aminosäuren weisen eine Sequenzidentität von 85% auf. Es konnte gezeigt werden, dass die ersten 166 Aminosäuren von Ras für dessen biochemische Eigenschaften notwendig und hinreichend sind. Der C-Terminale Anteil ist für die Lokalisierung der Ras-Proteine an der Plasmamembran notwendig. John und seine Arbeitsgruppe gingen davon aus, dass die Ras-Proteine demzufolge nicht direkt mit anderen Proteinen interagieren können (John *et al.*, 1989). Diese Hypothese konnte von Paz und Mitarbeiter und Elad-Sfadia und Mitarbeiter nicht bestätigt werden. Die zwei Arbeitsgruppen identifizierten bereits 2001 und 2004 neue Bindungspartnern für die Ras-Proteine. So bindet Galektin-1 bevorzugt an aktives H-Ras-GTP (Paz *et al.*, 2001), während Galektin-3 selektiv mit K-Ras-GTP interagiert (Elad-Sfadia *et al.*, 2004).

In ihrer Primärsequenz weisen die Ras-Proteine sechs hochkonservierte Domänen auf: drei Phosphat- und Magnesium-bindende Sequenzelemente (PM1-3, AS 10, 17, 35, 57-61) und drei Guaninbase-bindende Sequenzelemente (G1-3, AS 28, 116-119, 145-147). Diese Domänen vermitteln die Bindung der Guaninnukleotide GDP und GTP (Wittinghofer und Waldmann, 2000). Die Änderung der räumlichen Struktur von zwei weitere Regionen, *Switch I* (As 30-36) und *Switch II* (As 60-67), bewirkt während der Bindung von GTP eine Konformationsänderung der *Ras*-Proteine (Wittinghofer und Waldmann, 2000). Diese acht hochkonservierten Regionen sind allen vier Ras-Proteine gemeinsam.

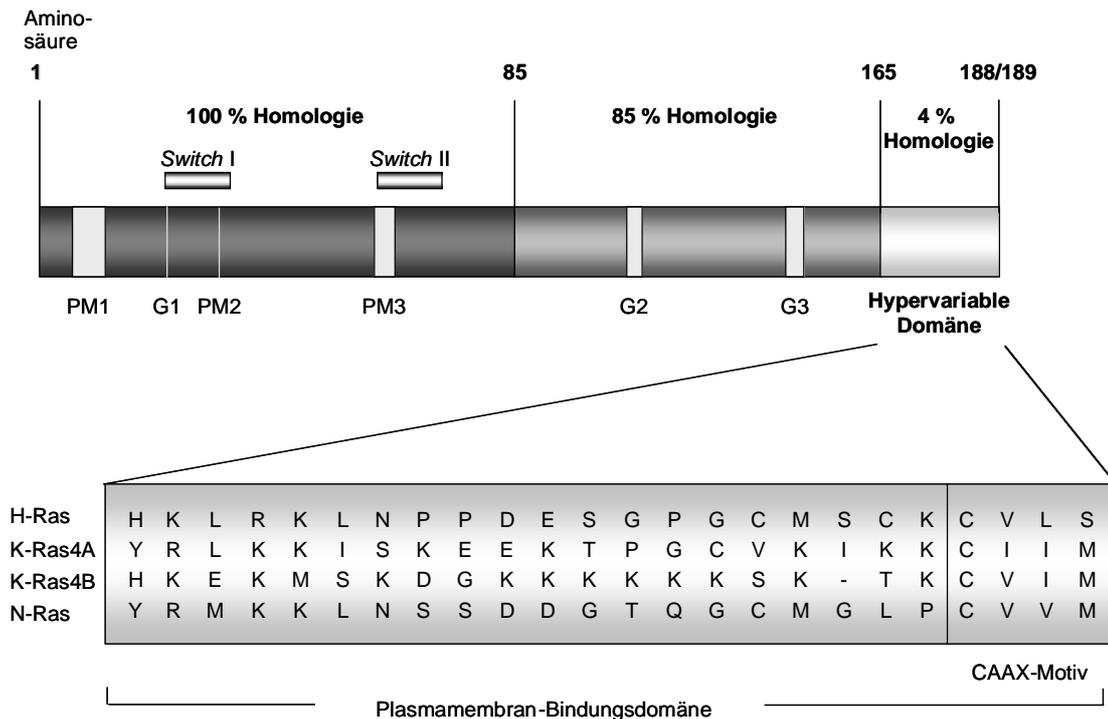


Abb. 4: Schematische, lineare Darstellung der Primärstruktur von Ras-Proteinen. Die abgebildete schematische Struktur der Ras-Proteine zeigt die homologen Regionen von AS 1-85 und 86-165 mit den darin enthaltenen konservierten Bereichen G1-3 und PM1-3 (G = Guaninbase-bindendes Sequenzelement; PM = Phosphat- und Magnesium-bindendes Sequenzelement), die für die Bindung von Guaninnukleotiden verantwortlich sind. Die C-terminale hypervariable Domäne von AS 166-188/189 ist für die Lokalisation der Ras-Proteine entscheidend, da hier eine posttranslationale Prenylierung stattfindet, durch die eine Verankerung der Ras-Proteine in der Plasmamembran ermöglicht wird (verändert nach Hancock, 2003). Abkürzungen: C: Cystein; A: aliphatische Aminosäure; X: beliebige Aminosäure.

Die größten Unterschiede in der Aminosäuresequenz befinden sich auf der C-terminalen Region (AS 166-188/189). Diese Region, die sogenannte hypervariable Domäne, umfasst je nach Ras-Isoform 23 oder 24 Aminosäuren und ist für die subzelluläre Lokalisation der Ras-Proteine notwendig. Alle vier Ras-Proteine werden als lösliche zytosolische Vorläufer synthetisiert. Diese erfahren eine posttransitionale Prenylierung, die eine Verankerung der Ras-Proteine in der Membran ermöglicht (Hancock, 2003) und in drei Schritten erfolgt: (i) Farnesylierung des Cystein-Rest am C-Terminalen –CAAX-Motivs (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = beliebige Aminosäure; Reiss et al., 1990); (ii) Proteolyse der letzten drei Aminosäurenreste –AAX durch die Carboxypeptidase Rce 1 (Otto et al., 1999); (iii) Methylierung der Carboxylgruppe des freien farnesylierten Cysteins durch die Isoprenyl-Carboxymethyltransferase Icmt (Winter-Vann und Casey, 2005). Chiu und seine Arbeitsgruppe konnten außerdem zeigen, dass die Lokalisation von Ras nicht

ausschließlich auf die Plasmamembran beschränkt ist, sondern Ras-Proteine auch an Endomembranen lokalisiert sind (Chiu *et al.*, 2002).

1.5 Isoform-spezifische Funktionen der Ras-Proteine

Obwohl die vier Ras-Proteine eine Aminosäuresequenzidentität von 85% aufweisen (Shields *et al.*, 2000; Giehl, 2005), werden mehr und mehr Unterschiede zwischen den Ras-Isoformen entdeckt, die auf spezifische Funktionen deuten.

Die besondere und einzigartige Rolle von K-Ras wurde durch *knock-out*-Experimente an Mäusen gezeigt. Die Deletion des *K-ras*-Gens ist bereits embryonal letal. Die Tiere zeigen schwere kardiale Störungen und weisen neuronale Degenerationen auf (Koera *et al.*, 1997). *N-ras-knock-out*-Mäuse und *H-Ras-knock-out*-Mäuse dagegen weisen keine phänotypischen Veränderungen auf, werden lebend geboren und zeigen keine Beeinträchtigung in der Entwicklung, dem Wachstum und der Fertilität (Umanoff *et al.*, 1995; Esteban *et al.*, 2001). Interessanterweise zeigen Doppel-*knock-out*-Mäuse (Genotyp *N-Ras*^{-/-}/*H-Ras*^{-/-}) ebenfalls ein normales Wachstum und eine normale Entwicklung (Esteban *et al.*, 2001).

Weitere Hinweise auf Isoform-spezifische Funktionen der Ras-Proteine ergaben Studien zur Lokalisation in der Plasmamembran. Es konnte gezeigt werden, dass K-Ras4B in den sogenannten *non-raft*-Domänen nachweisbar ist, während H-Ras sowohl in cholesterolreichen Strukturen, den *lipid-rafts*-, als auch in *non-raft*-Domänen lokalisiert ist (Prior *et al.*, 2001). Die unterschiedliche Verteilung von H-Ras in der Plasmamembran stellt einen dynamischen Prozess dar, da die Erhöhung des aktiven H-Ras Anteils zu einer vermehrten Lokalisation von H-Ras in *non-raft*-Domäne führt (Prior *et al.*, 2001 und 2003; Niv *et al.*, 2002).

Als weiteren Unterschied zwischen den einzelnen Ras-Proteinen wurden Isoform-spezifische Ras-Effektorproteine identifiziert. In COS-7-Zellen kommt es nach transienter Expression von konstitutiv aktivem H-Ras(G12V) vor allem zur Aktivierung der PI3-K, während K-Ras4B hauptsächlich Raf-1 aktiviert (Yan *et al.*, 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression von konstitutiv aktivem K-Ras4B in COS-7-Zellen zu einer Steigerung der Migration führen kann, während die Expression von aktivem H-Ras und N-Ras nur minimalen bzw. keinen Einfluss auf die Migration hat (Voice *et al.*, 1999). Außerdem wurde RasGRF als ein GEF identifiziert, der spezifisch H-Ras aktiviert (Jones *et al.*, 1998). SmgGDS aktiviert dagegen bevorzugt K-Ras4B (Orita *et al.*, 1993). Die

Arbeitsgruppe von Vos konnte mittels *in vitro*-Bindungsstudien zeigen, dass in humanen, embryonalen Nierenzellen das Tumorsupressor-Protein RASSF2 mit K-Ras4B, nicht aber mit H-Ras interagiert (Vos *et al.*, 2003).

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaudia Giehl konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression von EGFP-K-Ras(G12V) in den Pankreaskarzinomzellen PANC-1 zu einer Erhöhung der Migration und Invasion führt.

In Anbetracht der in dieser Arbeit dargestellten deutlich erhöhten Migration und Invasion EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierender PANC-1-Zellen kann davon ausgegangen werden, dass das aktive K-Ras nicht nur in der Tumorentstehung im Pankreas eine wichtige Rolle spielt, sondern auch an der Progression des Primärtumors mit Entwicklung eines invasiven Phänotyps und an der Metastasierung maßgeblich beteiligt ist (Dreissigacker *et al.*, 2005).

Des Weiteren binden die vier Ras-Proteine unterschiedlich an verschiedenen Bindungspartner. So bindet Galektin-1 bevorzugt an aktives H-Ras-GTP (Paz *et al.*, 2001), während Galektin-3 selektiv mit K-Ras-GTP interagiert (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Bei all diesen Beobachtungen muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Isoform-spezifische Bindung von Ras-Proteinen sehr stark vom Zelltyp, vom Organ und der Spezies abhängig sind. Es konnte gezeigt werden, dass im humanem System der Ras-Ral-Signalweg ein wichtiger Effektorsignalweg bei der Transformation von Zellen, wogegen im murinen Systemen der Ras-Raf-Signalweg stärker transformierend wirkt (Ellis und Clark, 2000; Hamad *et al.*, 2002). Des Weiteren konnten Unterschiede im Vorkommen unterschiedlicher Ras-Mutationen in bestimmten Tumoren nachgewiesen werden. Es findet sich keine gleichmäßige Verteilung zwischen den mutierten Genen *H-ras*, *K-ras* und *N-ras*, sondern es zeigt sich vielmehr, dass eine Korrelation von Tumortyp und mutiertem *ras*-Gen existiert (Bos *et al.*, 1989). Die unterschiedliche Verteilung der mutierten *ras*-Gene und deren Häufigkeit in verschiedenen Tumortypen zeigt Tabelle 1. Diese Befunde deuten auf eine besondere Rolle von K-Ras in der Tumorgenese hin.

1.6 Die Galektine

Galektine gehören zu der phylogenetisch konservierten Familie der Lektine, die spezifisch β -Galaktoside binden, in der Regel Glukokonjugate die N-Azetyl-Laktosamin-Reste enthalten, (Cooper, 2002; Lahm *et al.*, 2004; Liu und Rabinovich, 2005). Die Lokalisation der Galektine wurde sowohl in verschiedenen Geweben der Säugetiere als auch in Schwämmen, Nematoden, Insekten, Fischen und Vögeln nachgewiesen. Da Galektine

während der Evolution erhalten blieben und eine ubiquitäre Verbreitung im Tierreich aufweisen, kann vermuten werden, dass diese unentbehrlich für das Leben sind. Fünfzehn Mitglieder der Galektin-Familie wurden im Tierreich bis heute entdeckt. Einige von ihnen sind ubiquitär verbreitet, während andere gewebsspezifisch, nur in bestimmte Organe nachweisbar sind (Cooper, 2002).

Tabelle 2: Lokalisation der Galektine im menschlichen Organismus (Rabinovich *et al.*, 2002)

Abkürzungen: BHL (*bovine heart lectin*), CBP 35 (*carbohydrate-binding protein 35kDa*), GRIFIN (*galectin-related interfiber protein*), PP-13 (*placental tissue protein 13*), L (*lectin*).

Galektin	Synonymbezeichnung	Lokalisation
-1	L-14, BHL, Galaptin	Ubiquitär, häufig in Lymphknoten, Milz, Thymus, Plazenta, Prostata, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Tumoren
-2	-	Gastrointestinaltrakt, Tumoren
-3	Mac-2, L-29, CBP-35	häufig in Tumorzellen, Makrophagen, Epithelzellen, Fibroblasten, aktivierte T-Lymphozyten
-4	-	Gastrointestinaltrakt
-5	-	Erythrozyten
-6	-	Gastrointestinaltrakt
-7	-	Hautzellen, Tumoren mit epidermaler Herkunft
-8	-	Leber, Prostata, Nieren, Herzmuskel, Lunge, Gehirn, Tumoren
-9	Ecalektin	Thymus, T-Lymphozyten, Nieren, Hodgkin-Lymphom
-10	Charcot-Leyden <i>crystal protein</i>	Eosinophile und Basophile
-11	GRIFIN	Augenlinse
-12	-	Adipozyten
-13	PP-13	Plazenta
-14	-	Eosinophile
-15	-	Uterus

1.6.1 Struktur der Galektine

Galektine enthalten eine oder zwei identische Domänen (etwa 130 Aminosäuren), die für die Kohlehydratbindung verantwortlich sind und die CRDs (*carbohydrate recognition domains*) genannt werden. Abhängig von der Anzahl dieser CRDs werden die Galektine in drei Gruppen eingeteilt: (i) Galektin-Prototypen mit einer CRD, die auch als Homodimer

existieren können: Galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15; (ii) Galektine mit zwei CRDs (*tandem repeat*-Typ), die durch eine 5-70 Aminosäuren lange Polypeptidkette verbunden sind: Galektin-4, -6, -8, -9 und -12 und (iii) Galektin-3, das zur Gruppe der chimären Galektine gehört und nur eine an eine prolin-, glyzin-, und tyrosinreiche Polypeptidkette (~120 Aminosäuren) gebundenen CRD enthält (Liu und Rabinovich, 2005).

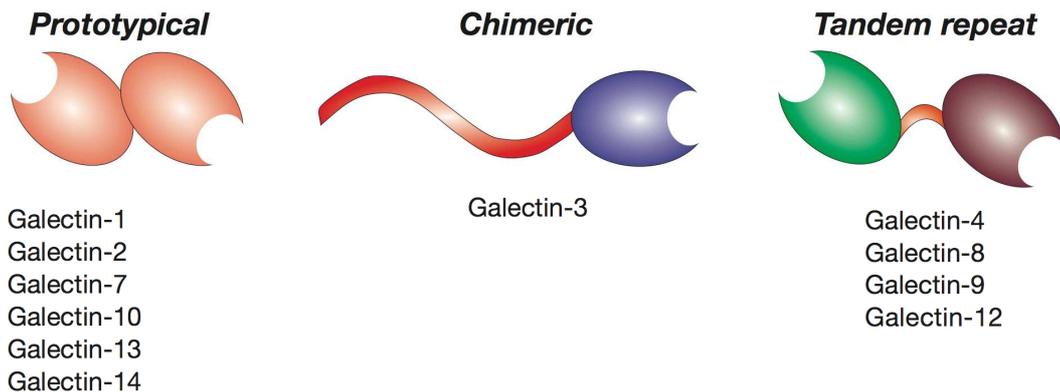


Abb. 5: Schematische Darstellung der drei unterschiedlichen Gruppen der Galektine: Galektine werden abhängig von der Anzahl der enthaltenen CRDs in drei Gruppen eingeteilt: (i) Galektin-Prototypen mit einer CRD (Galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15); (ii) Galektine mit zwei CRDs *tandem repeat*-Typ (Galektin-4, -6, -8, -9 und -12) und (iii) Galektin-3, das zur Gruppe der chimären Galektine gehört und eine CRD an einer 120 Aminosäuren langen Kette enthält (Cumming und Liu, 2009).

Die 15 Gene, die für die Galektine kodieren, werden als LGALS (*lectin, Galactoside-binding, soluble*) bezeichnet (Barondes *et al.*, 1994; Farmer *et al.*, 2008). Durch unterschiedliches Spleißen während der Transkription entstehen weitere Galektin-Isoformen. So konnte gezeigt werden, dass es mindestens sechs verschiedene mRNAs für das humane Galektin-8 gibt. Diese Isoformen können verschiedene Lokalisationen und isoformspezifische Funktionen im Organismus haben. Ähnlich zu Galektin-8 weisen auch Galektin-4 und -9 mehrere Isoformen auf (Barondes *et al.*, 1994, Leffler *et al.*, 2001).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass jedes einzelne Galektin spezifisch die Bindung zu bestimmten Kohlenhydrate bevorzugt (Brewer, 2002). Die CRDs der Galektine sind aus fünf oder sechs antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut und die CRDs der dimeren Galektine sind durch eine zweifache axiale Rotation, senkrecht zur planaren Seite der β -Faltblätter gebunden (Barondes *et al.*, 1994, Leffler *et al.*, 2001).

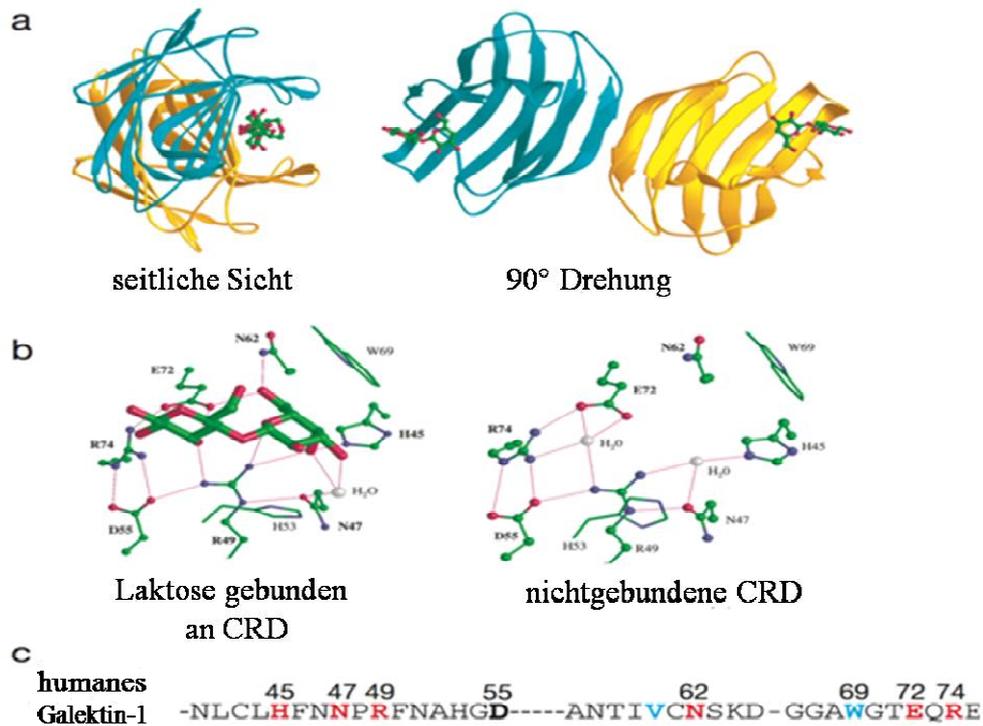


Abb. 6: Schematische Darstellung der Struktur der Galektine am Beispiel des Galektin-1: (a) Kristallographische Struktur von Galektin-1 während der Bindung an Laktose. Galektin-1 ist als Dimer mit den Farben blau und gelb aus zwei verschiedenen Perspektiven dargestellt (links: seitliche Darstellung, rechts: 90° gedrehte Darstellung); (b) Interaktion zwischen Laktose und den Aminosäureresten des CRDs des Galektin-1. Im linken Bild ist die CRD an Laktose gebunden und im rechten Bild ungebunden dargestellt; (c) Primäre Struktur des humanen Galektin-1. Die an der Bindung des Zuckers beteiligten Aminosäuren sind hervorgehoben (Cumming und Liu, 2009).

1.6.2 Biosynthese und Sekretion der Galektine

Galektine können im Nukleus, im Zytoplasma, an der Plasmamembran und extrazellulär nachgewiesen werden. Alle Galektine werden im Zytoplasma der Zellen synthetisiert, interagieren dort mit verschiedenen intrazellulären Liganden und können somit verschiedene Signaltransduktionswege beeinflussen. Die wichtigsten intra- und extrazellulären Liganden der Galektine, am Beispiel der am meist untersuchten Galektine, Galektin-1, -3 und -8, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Intra- und extrazelluläre Liganden von Galektin-1, -3 und -8 (Oka *et al.*, 2004):

Abkürzungen: Lamp-1 und -2 (*lysosome-associated membrane proteins 1 and 2*), Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*).

Extrazelluläre Liganden	Literatur
<u>Galektin-1</u> Karzinoembryonäres Antigen (CEA) und Lamp-1 und -2 Laminin und Fibronectin Thy-1 Antigen und CD 45 $\alpha 7 \beta 1$ Integrin Complement Rezeptor 3 (CR3)	Ohannesian <i>et al.</i> , 1994 Zhou und Cummings, 1993 Symons <i>et al.</i> , 2000 Gu <i>et al.</i> , 1994 Avni <i>et al.</i> , 1998
<u>Galektin-3</u> Karzinoembryonäres Antigen (CEA) Laminin und Fibronectin Tenascin, neuronale adhäsive Glykoprotein L1 und Myelin-bindendes Protein Mac-2-bindendes Protein $\beta 1$ Integrin	Ohannesian <i>et al.</i> , 1995 Sato und Hughes, 1992 Probstmeier <i>et al.</i> , 1995 Rosenberg <i>et al.</i> , 1991 Ochieng <i>et al.</i> , 2001
<u>Galektin-8</u> $\alpha 3 \beta 1$ Integrin	Hadari <i>et al.</i> , 2000
Intrazelluläre Liganden	Literatur
<u>Galektin-1</u> Gemin-4 H-Ras	Park <i>et al.</i> , 2001 Park <i>et al.</i> , 2001
<u>Galektin-3</u> Bcl-2 Zytokeratin Gemin-4 Synexin N-Ras K-Ras	Yang <i>et al.</i> , 1996 Karsten, 1997 Park <i>et al.</i> , 2001 Yu <i>et al.</i> , 2002 Elad-Sfadia <i>et al.</i> , 2004 Elad-Sfadia <i>et al.</i> , 2004; Ashery <i>et al.</i> , 2006

Durch einen nichtklassischen, noch nicht entschlüsselten Sekretionsweg, der das endoplasmatische Retikulum und den Golgi Apparat umgeht, passieren die Galektine die Plasmamembran und können extrazellulär an die Matrix oder an die Plasmamembran

binden. Es scheint allerdings, dass jedes einzelne Galektin auf unterschiedliche Weise sekretiert wird und sich der Sekretionsmechanismus von Zelltyp zu Zelltyp unterscheidet (Hughes, 1999, Brewer *et al.*, 2002). Am Beispiel des Galektin-1 wurden zwei Sekretionshypothesen aufgestellt. Zum einen könnte Galektin-1 durch spezifische transmembranäre *Carrier* aus der Zelle exportiert werden (Cleves *et al.*, 1996). Zum anderen könnte Galektin-1 durch einen noch unbekanntem apokrinen Sekretionsmechanismus nach Ansammlung in kleine Ausstülpungen der Plasmamembran und durch extrazelluläre Vesikel externalisiert werden (Cooper, 1997). Extrazellulär lokalisierte Galektine binden an ihren CRDs spezifisch β -Galaktoside (Cooper, 2002; Lahm *et al.*, 2004; Liu und Rabinovich, 2005). Eine Bindung von intrazellulären Galektinen an β -Galaktoside ist nicht nachweisbar, was zu der Hypothese führt, dass die Galektine andere, noch nicht näher charakterisierte Funktionen im Zytoplasma ausüben (Brewer *et al.*, 2002).

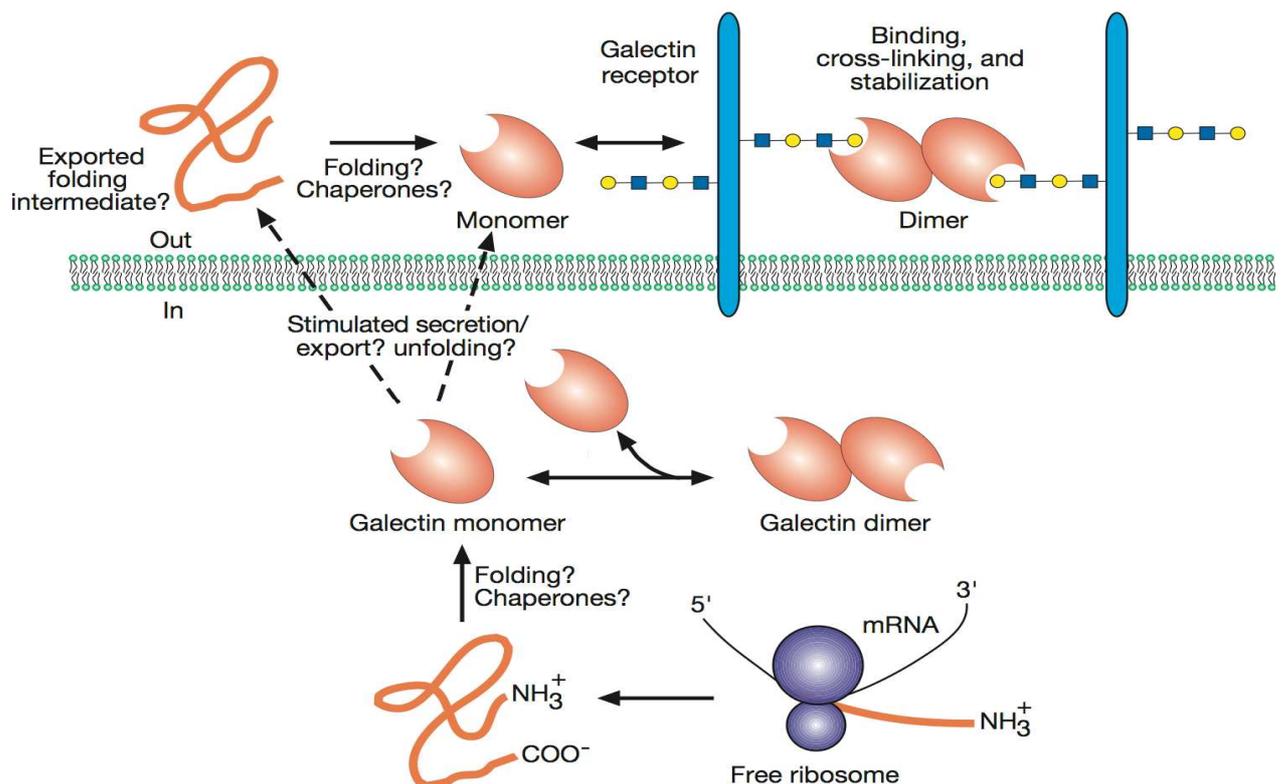


Abb.7: Der vermutete Biosyntheseweg von humanem Galektin in der Zelle: Die mRNA des Proteins wird an freien Polysomen im Zytoplasma gebildet. Das neu entstandene Protein kann mit Kohlenhydraten und andere zytoplasmatische Proteinen interagieren. Die Sekretion aus der Zelle erfolgt durch einen nichtklassischen Weg, der das endoplasmatische Retikulum und das Golgi-Apparat umgeht. Das nun extrazelluläre Protein kann mit Liganden an der Plasmamembran und in der extrazellulären Matrix interagieren (Cumming und Liu, 2009). ● (Galaktose), ■ (N-Azetyl-Glukosamin)

1.6.3 Funktion der Galektine

Galektine üben eine duale Funktion im menschlichen Organismus aus. Als intrazelluläre Proteine können diese mit zytosolischen und nukleären Proteinen interagieren und somit verschiedene Signaltransduktionswege und Genexpressionsvorgänge beeinflussen. Extrazelluläre Galektine hingegen interagieren an der Plasmamembran und der extrazellulären Matrix mit verschiedenen Glykoproteinen, die die entsprechenden Oligosaccharid enthalten müssen (Rabinovich, 2002; Liu *et al.*, 2002; Ochieng *et al.*, 2004; Elola *et al.*, 2007). Diese verschiedenen intra- und extrazellulären Bindungspartner verleihen den Galektinen multiple Funktionen. Hierzu gehören die Regulierung des Zellwachstums, der Differenzierung, der Apoptose, der malignen Transformation und die Stimulierung der Zelladhäsion (Gabius *et al.*, 1997; Perillo *et al.*, 1998; Kaltner *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 2001). Verschiedene Studien konnten die wichtige Rolle der Galektine in der Tumorgenese zeigen. Galektine, insbesondere Galektin-3 begünstigen die Zelltransformation zum metastatischen Phänotyp und das Zellwachstum von Tumorzellen indem sie diese vor immunologischen Angriffen schützen (Barondes *et al.*, 1994; Perillo *et al.*, 1998). Außerdem können Galektine die Immunmodulation und die Inflammation (Levy *et al.*, 1983; Offner *et al.*, 1990; Yamaoka *et al.*, 1995), sowie die Embryogenese und die Reproduktion (Poirier *et al.*, 1992; Iglesias *et al.*, 1998a und 1998b) beeinflussen.

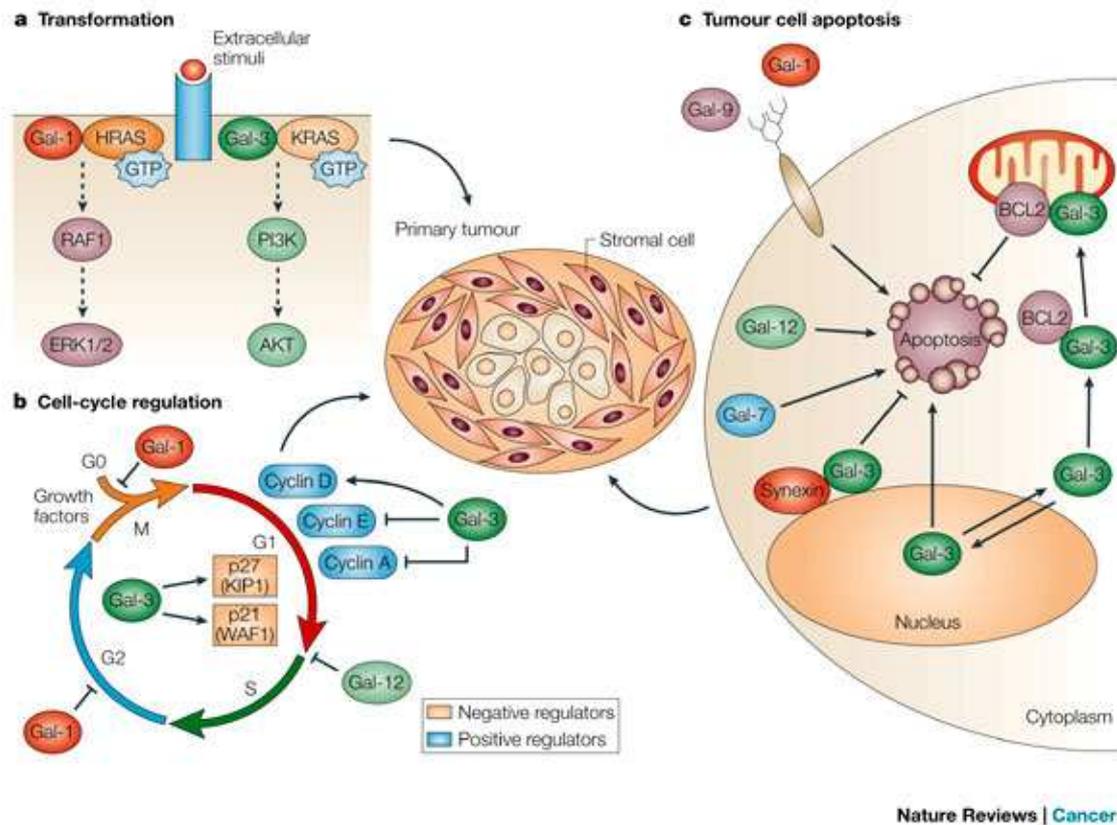
1.6.3.1 Die Funktion der Galektine in der Tumorgenese und Metastasierung

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der Galektin-Familie häufig in Tumorzellen überexprimiert werden und dass das Ausmaß der Expression mit der Tumorprogression und der Metastasierung korreliert. Einige Galektine und deren Expression in den Tumorzellen können als Prognosefaktor und zur Therapiekontrolle genutzt werden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass sich die Lokalisation der Galektine während der Transformation zur Tumorzelle verändert, zum Beispiel vom Nukleus ins Zytosol (van den Brule *et al.*, 2004).

Die neoplastische Transformation der Zelle ist eine kumulative Reihe von Ereignissen, die die Dysregulation der Zellwachstumsmechanismen, der Apoptose und des Zellzyklus beinhaltet. Für Galektin-1 und Galektin-3 konnte gezeigt werden, dass diese die Transformation zum Tumorphänotyp in multiplen Zellarten initialisieren können. Außerdem zeigen Untersuchungen, dass die Inhibition von Galektin-3 in Brustkarzinom-

und Schilddrüsenkarzinomzellen *in vitro* eine Inhibierung der typischen malignen Transformation verursacht (Abb.8 (a))(Yamaoka *et al.*, 2000; Yoshi *et al.*, 2001). Die Mechanismen, durch die Galektine die Transformation zum malignen Phänotyp beeinflussen sind nur im Ansatz entschlüsselt. So konnte gezeigt werden, dass Galektin-1 und Galektin-3 mit Ras-Proteinen interagieren (Paz *et al.*, 2001; Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Kloog und seine Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Bindung von Ras-Proteinen an die Plasmamembran nur in Anwesenheit von Galektinen stattfinden kann (Kloog und Cox, 2004). Galektin-1 bindet hauptsächlich an H-Ras (Paz *et al.*, 2001), hingegen bindet Galektin-3 hauptsächlich an K-Ras und induziert die Aktivierung von Raf1 und PI3K (Elad-Sfadia *et al.*, 2004).

Der Einfluss der Galektine auf die Apoptose wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht und bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass exogen hinzugefügtes rekombinantes Galektin, insbesondere Galektin-1 die Apoptose *in vitro* sowohl in Zellen mit normalem Phänotyp als auch in denen die einen malignen Phänotyp aufweisen, induziert (Abb.8 (c)). Galektin-3 dagegen übt eine anti-apoptotische Wirkung aus und beeinflusst auch die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika (Liu *et al.*, 2002). Interessanterweise ist die Wirkung von Galektin-3 auf die Apoptose abhängig von dessen Lokalisation. Ist Galektin-3 im Zytoplasma lokalisiert übt es eine anti-apoptotische Wirkung aus. Ist es hingegen im Nukleus lokalisiert, so hat es eine pro-apoptotische Funktion (van den Brule *et al.*, 2004). Abbildung 8 zeigt schematisch die Funktion einzelner Galektine in der Tumorgenese.



Nature Reviews | Cancer

Abb. 8: Die Funktion einzelner Galektine in der Tumorgnese: Galektine regulieren wichtige Funktionen in der Tumorgnese, wie die Zelltransformation, die Regulation des Zellzyklus und die Apoptose. **(a) Transformation:** Galektin-1 und -3 können die maligne Transformation durch Interaktion mit onkogenen Ras-Proteinen (H-Ras und K-Ras) und Ras-abhängigen Signaltransduktionsproteinen (Raf1, ERK 1 und 2, PI3K und AKT) beeinflussen. **(b) Regulation des Zellzyklus:** Galektin-3 beeinflusst die Expression verschiedener Zellzyklusregulatoren (Cyclin A, E, D) und Zellzyklusinhibitoren (p21/WAF1 und p27/KIP1). Galektin-1 und -12 beeinflussen den Zellzyklus zu Beginn der S-Phase und in der G1-Phase. **(c) Apoptose der Tumorzellen:** Während Galektin-1 und -9 eine pro-apoptotische Wirkung in den Tumorzellen haben, übt Galektin-3 eine anti-apoptotische Wirkung aus. Diese Wirkung kann durch eine Translokation des Proteins an die Mitochondrienmembran und durch Interaktion mit intrazellulären Regulatoren der Apoptose, wie Bcl2, erklärt werden. Der Effekt von Galektin-3 auf die Apoptose hängt von dessen Lokalisation ab. Befindet sich Galektin-3 im Zytoplasma übt es eine anti-apoptotische Wirkung aus, befindet es sich im Nukleus hat es eine pro-apoptotische Funktion. (Liu und Rabinovich, 2005).

Abkürzungen: Gal (Galektin); GTP (Guanosintri-phosphat); PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase); AKT (*protein kinase B*); ERK1 und 2 (*extracellular signal-regulated kinase*); M, G1, S, G2 (Phasen des Zellzyklus); Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*.)

Neuere Studien haben eine Rolle der Galektine in der Tumormetastasierung bestätigt. Die Metastasierung setzt den Verlust der interzellulären Adhäsion, die Migration der einzelnen Tumorzellen und die Bindung an Endothelzellen oder an Membranproteine anderer Zellen

voraus. Da Galektine an membranständigen Glykoproteinen binden können, wird vermutet, dass diese die Adhäsion der Tumorzellen an andere Zellen und die extrazelluläre Matrix modulieren. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass durch Hinzufügen von rekombinantem Galektin-1 und -3 die Adhäsion von Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix verhindert werden kann (Hughes *et al.*, 2001; Ochieng *et al.*, 2004; Kuwabara *et al.*, 2004). Lösliches Galektin-8 kann die Adhäsion von Tumorzellen an Zellkulturplatten inhibieren (Levy *et al.*, 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Galektine die Motilität der Tumorzellen und die Tumorinvasion beeinflussen (Hittelet *et al.*, 2003).

Tabelle 4: Korrelation zwischen der Expression von Galektinen und Tumorprogression (Oka *et al.*, 2004):

Tumorgewebe	Literatur
positive Korrelation	
<u>Galektin-1</u>	
Schilddrüsenkarzinom	Xu <i>et al.</i> , 1995
Uterussarkom	Schwarz <i>et al.</i> , 1999
Kolonkarziom	Bresalier <i>et al.</i> , 1998
Gliom	Yamaoka <i>et al.</i> , 2001
<u>Galektin-3</u>	
Magenkarzinom	Lotan <i>et al.</i> , 1994
Leberkarzinom	Hsu <i>et al.</i> , 1999
Schilddrüsenkarzinom	Xu <i>et al.</i> , 1995
Astrozytom	Bresalier <i>et al.</i> , 1997
negative Korrelation	
<u>Galektin-1</u>	
Karzinom in der Hals- und Kopfregion	Choufani <i>et al.</i> , 1999
<u>Galektin-3</u>	
Karzinom in der Hals- und Kopfregion	Choufani <i>et al.</i> , 1999
Uterussarkom	Schwarz <i>et al.</i> , 1999
Brustkrebs	Castronovo <i>et al.</i> , 1996
Pankreaskarzinom	Shimamura <i>et al.</i> , 2002
<u>Galektin-8</u>	
Kolonkarzinom	Nagy <i>et al.</i> , 2002
kontroverse Ergebnisse	
<u>Galektin-3</u>	
Kolonkarzinom	Lotz <i>et al.</i> , 1993; Schoeppner <i>et al.</i> , 1995; Ma und Geng, 2002

1.6.3.2 Spezifische Funktionen von Galektin-1, -3 und -8

Als Mitglied der Prototypgruppe der Galektine enthält Galektin-1 zwei antiparallel gebundene β -Faltblätter und kann in löslicher Form als Homodimer existieren (Liao *et al.*, 1994). Sowohl intra- als auch extrazellulär weist Galektin-1 multiple biologische Funktionen auf. Die wichtigste Rolle übt Galektin-1 in der Tumorgenese und der Immunantwort aus. Verschiedene Studien konnten die Überexpression von Galektin-1 in Tumorzellen bestätigen. Quantitativ korreliert die Galektin-1 Expression in verschiedenen Tumoren mit einer schlechten Prognose und einer frühen Metastasierung (Liu und Rabinovich, 2005; Camby *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen sind Folge einer, durch Galektin-1 vermittelten Steigerung der Zellmigration, Adhäsion und Angiogenese (Liu und Rabinovich, 2005).

Galektin-3 gehört zur Gruppe der chimären Galektine und enthält in seiner Struktur eine CRD, die an einer prolin-, glyzin-, und tyrosinreichen Polypeptidkette (~120 Aminosäuren) gebunden ist (Liu und Rabinovich, 2005). Die dreidimensionale Struktur von Galektin-3 weist zwei β -Faltblätter, gebildet aus fünf bzw. sechs Ketten, auf, die ähnlich wie Galektin-1 und -2 eine β -Sandwich-Struktur bilden (Seetharaman *et al.*, 1998). Galektin-3 kann oligomerisieren und membranständige Glykane binden und somit transmembranäre Signalwege initiieren und vielfältige zelluläre Funktionen beeinflussen (Ochieng *et al.*, 2004; Liu und Rabinovich, 2005).

In der Tumorgenese hat Galektin-3 eine entscheidende Funktion. Multiple Studien konnten zeigen, dass die Expression von Galektin-3 für die Transformation der Zellen zu einem malignen Phänotyp und für das Tumorwachstum unverzichtbar ist (Liu und Rabinovich, 2005). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen konnten bislang nicht komplett entschlüsselt werden. Es wird vermutet, dass die Interaktion mit onkogenem K-Ras und der damit verbundenen Signalübertragung zu Raf und PI3K eine Rolle spielen könnte (Elad-Sfadia *et al.*, 2004; Ashery *et al.*, 2006). Galektin-3 kann die Tumorgenese außerdem durch Regulierung des Zellzyklus und die Bindung an β -Catenin steuern (Shimura *et al.*, 2004 und 2005).

Durch alternatives Spleißen des Galektin-8-Transkripts und durch das Vorhandensein von drei einzigartigen Polyadenylierungsstellen wurden mehrere Galektin-8 mRNAs entdeckt (Bidon *et al.*, 2001). Diese kodieren für mindestens sechs Galektin-8 Isoformen: drei

Formen, die zwei CRDs und drei Formen, die nur eine CRD enthalten (Bidon-Wagner *et al.*, 2004). Galektin-8 ist ein wichtiger Bindungspartner für die Gruppe der Integrine, durch die die Interaktion mit der extrazellulären Matrix vermittelt wird und die Zelladhäsion und die Apoptose reguliert wird (Zick *et al.*, 2004).

Untersuchungen zur Funktion von Galektin-8 in der Tumorgenese und Metastasierung des Kolonkarzinoms zeigen eine verminderte Galektin-8 Expression im Vergleich zu Kolonzellen mit normalen Phänotyp (Nagy *et al.*, 2002). Da exogen zugeführtes Galektin-8 *in vitro* zu einer Suppression der Tumorzellmigration führt, kann man davon ausgehen, dass Galektin-8 eine wichtige Rolle im Tumorwachstum und Metastasierung des Kolonkarzinoms spielt (Nagy *et al.*, 2002).

1.7 Ziel der Arbeit

Die Bedeutung der Galektine für die Tumorprogression und die Metastasierung ist bis heute nur in Ansätzen geklärt. Während Galektin-1 die Zellmigration und die Tumorgenese in verschiedenen Organen vermittelt, hat Galektin-3, abhängig von der Zellart in dem es produziert wird pro- oder antiapoptotische Eigenschaften. Galektin-8 dagegen wurde eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und Metastasierung im Kolon zugeschrieben. Ein Ziel dieser Arbeit war die subzelluläre Expression von Galektin-1, -3 und -8 in ausgewählten Karzinomzelllinien zu untersuchen und zu quantifizieren. Des Weiteren sollte die Expression von Galektin-8 Isoformen in verschiedenen Zelllinien untersucht und die cDNA der Galektin-8 Isoformen mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) analysiert. Zur weiteren Charakterisierung sollten die Galektin-8 Isoformen transient in der humanen Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 und die embryonalen Nierenzellen HEK 293 exprimiert werden und ihre Interaktion mit Ras-Isoformen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamidlösung 30 % (m/V)	Roth, Karlsruhe
Agar Agar <i>high gel strength</i>	Serva-Bioproductions, Heidelberg
Agarose, <i>molecular biology grade</i>	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva-Bioproductions, Heidelberg
Ampizillin, Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Aprotinin (Trasylol® 0,5)	Bayer, Leverkusen
Bacto™ Trypton	Becton-Dickinson, Heidelberg
BCA™ <i>Protein Assay Reagent A</i>	Pierce, St. Augustin
Bisacrylamidlösung 2 % (m/V)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva-Bioproductions, Heidelberg
<i>Coomassie® Brilliant Blue R 250</i>	Serva-Bioproductions, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma, Taufkirchen
Dimethylformamid (DMF)	VWR, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Serva-Bioproductions, Heidelberg
DMRIE-C <i>Reagent</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>ECL Advance Blocking Reagent</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>ECL Advance Western Blotting Detection Kit</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>ECL Western Blotting Detection Reagent</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
Essigsäure	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol, p.a.	Fluka, Neu-Ulm
Ethidiumbromid	Genaxis Biotechnology, Spechbach
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	VWR, Darmstadt
Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-	Sigma, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem, Darmstadt

fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Genitacin (G-418-Sulfat)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Glukose	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	AppliChem, Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Isobutanol	VWR, Darmstadt
Isopropanol	VWR, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	VWR, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kanamyzin	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Kupfer(II)-sulfat	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin	Serva-Bioproducts, Heidelberg
L-Glutamin (200 mM)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Magermilchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	VWR, Darmstadt
Methanol	VWR, Darmstadt
Natriumazetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumkarbonat	VWR, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natrium-Deoxycholat	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt
4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	AppliChem, Darmstadt
<i>non essential amino acids</i>	Gibco BRL, Paisley, Scotland
OptiMEM I	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10 mg/ml)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Pepstatin A	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen

Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Protein A-Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V)	Serva-Bioproducts, Heidelberg
RTU 60 Entwickler/Fixierer	Adefo-Chemie, Dietzenbach
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37% (m/V)	Fluka, Neu-Ulm
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat- Toluidinsalz (BCIP)	AppliChem, Darmstadt
Transfast (<i>Transfection Reagen</i>)	Promega, Mannheim
Trichloressigsäure (TCA)	Serva-Bioproducts, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	USB, Cleveland, Ohio, USA
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 %)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Trypsin-Inhibitor (aus Sojabohnen)	Fluka, Neu-Ulm
X-Gal	Roche Diagnostics, Mannheim
Xylene Cyanol FF	Sigma, Taufkirchen
<i>Yeast extract</i> Servabacter (Hefe-Extrakt)	Serva-Bioproducts, Heidelberg

Alle weiteren verwendeten und hier nicht angeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in p.a.-Qualität von den Firmen VWR, Darmstadt, Roth, Karlsruhe, oder Sigma, Taufkirchen, bezogen.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Agfa Cronex 5, <i>medical x-ray film</i>	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Biosphere-Qualitätsspitzen, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen Gr. 18 (0,45 x 25 mm)	Braun, Melsungen
Mikro-Schraubröhrchen (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Millex-GS Sterilfilter (0,22 µm)	Millipore Corporation, Bedford, USA
Millex-GS Sterilfilter (0,45 µm)	Millipore Corporation, Bedford, USA
µ-Säulen	Miltenyi-Biotech, Bergisch-Gladbach
Protran® BA85 <i>Nitrocellulose Transfer Membran</i>	Schleicher & Schuell, Dassel
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim

Petrischalen (Ø 100 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5 ml/ 1,5 ml/ 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Polypropylenröhrchen (3,5 ml/ 13 ml/ 15 ml/ 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	Aesculap, Tuttlingen
Tuberkulin-Spritzen (1 ml)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Ultrazentrifugationsgefäße (1,5 ml)	Beckman, München
Whatman® Papier (3 mm CHR)	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen (150 cm ²)	Renner, Dannstadt
Zellkulturschalen (Ø 100 mm)	Renner, Dannstadt
Zellkulturschalen (Ø 60 mm)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Zellschaber (30 cm)	Renner, Dannstadt

2.1.3 Rekombinante Proteine

Rekombinantes, humanes Galektin-1	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Best.-Nr. 1152-GA
Rekombinantes, humanes Galektin-3	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Best.-Nr. 1154-GA
Rekombinantes, humanes Galektin-8	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Best.-Nr. 1305-GA

2.1.4 Prokaryontische und eukaryontische Zellen

2.1.4.1 *Escherichia coli* Stämme

One Shot® Chemically Competent *Escherichia coli* TOP 10 (Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.4.2 Eukaryontische Zelllinien

Tabelle 5: Eukaryontische Zelllinien

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, USA

Zelllinie	Beschreibung	ATCC Nr./ Herkunft
PANC-1	Humane, Pankreaskarzinomzelllinie epithelialer Morphologie (Lieber et al., 1975), bei der eine mono-allelische Punktmutation im Kodon 12 des <i>K-ras</i> -Gens (GGT→GAT) zum Austausch von Glyzin gegen Asparaginsäure und damit zu einem konstitutiv-aktiven K-Ras-Protein führt (Giehl <i>et al.</i> , 2000).	CRL-1469
AsPc-1	Humane duktale Pankreaskarzinomzelllinie, bei der eine Punktmutation im Kodon 12 in beiden Allelen des <i>K-ras</i> -Gens (GGT→GAT) zu einem Austausch von Glyzin gegen Asparaginsäure und damit zu einem konstitutiv aktiven K-Ras-Protein führt (Aoki <i>et al.</i> , 1997).	CRL-1682
MiaPaCa-2	Humane Pankreaskarzinomzelllinie epithelialen Ursprunges, die sowohl eine Mutation im <i>p53</i> -Gen (Position 248, CGG→TGG), als auch eine Punktmutation in beiden Allelen des <i>K-ras</i> -Gens enthält. Letztere führt zu einem Austausch von Glyzin gegen Cystein und hat zur Folge, dass die Zellen ein konstitutiv aktives K-Ras-Protein exprimieren (Berrozpe <i>et al.</i> , 1994).	CRL-1420
BxPC-3	Humane Pankreaskarzinomzelllinie, bei der eine Mutation im Kodon 220 des <i>p53</i> -Gens (TAT→TGT) zum Austausch von Tyrosin gegen Glyzin führt, die aber keine <i>K-ras</i> -Mutationen aufweist (Giehl <i>et al.</i> , 2000; Tan <i>et al.</i> , 1986).	CRL-1687
Capan-1	Humane Pankreaskarzinomzelllinie aus einer Lebermetastase eines Adenokarzinoms des Pankreas, die den CFTR Regulator (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) exprimieren und einen magensäureartigen Muzin sekretieren (Holland E. <i>et al.</i> , 1998).	HTB-79
Capan-2	Humane Pankreaskarzinomzelllinie aus einem duktalem Pankreasadenokarzinom mit <i>K-ras</i> -Mutation im Kodon 12	HTB-80

	(GGT→GTT), die durch den Austausch von Glyzin gegen Valin zu einem konstitutiv aktiven K-Ras-Protein führt (Kalthoff <i>et al.</i> , 1993).	
PaTu 8902	Humane Pankreaskarzinomzelllinie duktales Ursprungs (Elsässer <i>et al.</i> , 1993b) mit einer monoallelischen Mutation (GGT→GTT) im Kodon 12 des <i>K-ras</i> -Gens (Niedergethmann <i>et al.</i> , 2001).	Dr. H. F. Kern, Marburg
SW480	Humane Kolonkarzinomzelllinie aus einem kolorektalen Adenokarzinom im Stadium Dukes B (Leibovitz <i>et al.</i> 1976), die sowohl eine Mutation im überexprimierten <i>p53</i> -Gen (Position 273, G→A), mit einem Austausch von Arginin gegen Histidin, als auch eine Mutation im 309. Kodon (C→T) mit einem Austausch von Prolin gegen Serin (Rodrigues <i>et al.</i> , 1990, Weiss <i>et al.</i> , 1993). Die Zellen exprimieren <i>c-myc</i> , K-Ras, H-Ras und N-Ras (Trainer <i>et al.</i> , 1988).	CCL-228
PaTu 8988 t	Humane Pankreaskarzinomzelllinie aus einer Lebermetastase eines Adenokarzinoms des Pankreas mit <i>K-ras</i> -Mutation (Elsässer <i>et al.</i> 1993).	Dr. H. F. Kern, Marburg
PaTu 8988 s	Humane Pankreaskarzinomzelllinie aus einer Lebermetastase eines Adenokarzinoms des Pankreas mit <i>K-ras</i> -Mutation (Elsässer <i>et al.</i> 1993).	Dr. H. F. Kern, Marburg
MCF7	Humane Brustkarzinomzelllinie epithelialen Ursprungs, aus einer Pleurametastase, eines Adenokarzinoms der Brustdrüse, die die Fähigkeit haben Estradiol an den zytoplasmatischen Estrogenrezeptor zu binden (Pratt <i>et al.</i> 1993). Die Zellen exprimieren onkogenes WNT7B und Tx-4 (Huguet <i>et al.</i> 1994). Das Wachstum der Zellen kann durch TNF- α inhibiert werden (Sugarman <i>et al.</i> 1985)	HTB-22
HEK-293	Humane, embryonale Nierenzelllinie mit epithelialer Morphologie, die durch Adenovirus 5 (Ad 5) transformiert wurde (Graham <i>et al.</i> , 1977).	CRL-1573

2.1.5 Plasmide

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden unterschiedliche Plasmide in HEK 293- und PANC-1-Zellen transient transfiziert. Die verwendeten Plasmide sind unten aufgeführt:

Tabelle 6: Plasmide

Plasmid	Herkunft
pcDNA 3.1 (+)/Galektin-8 long	diese Arbeit
pcDNA 3.1 (+)/Galektin-8 short	diese Arbeit
pcDNA 3/ Kozak-Galektin-8 long	diese Arbeit
pcDNA 3/ Kozak-Galektin-8 short	diese Arbeit
pEGFP-C3/K-Ras(G12V)	Prof. Dr. Klaudia Giehl, Ulm
pEGFP-C2/K-Ras(S17N)	Prof. Dr. Klaudia Giehl, Ulm
pEGFP-C2/HA-N-Ras(G12V)	Prof. Dr. Klaudia Giehl, Ulm
pEGFP-C1/H-Ras (Wildtyp)	Prof. Dr. Klaudia Giehl, Ulm

2.1.6 Enzyme, Transfektionsreagenzien und molekularbiologische Kits

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
NucleoSpin [®] <i>Extraction Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin [®] <i>Plasmid Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
REDTaq [®] ReadyMix [™] PCR Reaction Mix <i>with MgCl₂</i>	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot Roche-Diagnostics, Mannheim,
Restriktionspuffer	Fermentas, St. Leon-Rot Roche-Diagnostics, Mannheim
RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
StrataPrep [®] EF <i>Plasmid Midiprep Kit</i>	Stratagene, Heidelberg
T4-DNA-Ligase Frankfurt/Main	New England Biolabs,
TA <i>Cloning Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe

TOPO TA 2.1 <i>Cloning Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Transfast (<i>Transfection Reagent</i>)	Promega, Mannheim
DMRIE-C <i>Reagent</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Tabelle 7: Primäre Antikörper

Abkürzungen: HRP: *horse-radish peroxidase*; (1): 0,5 % (m/V) Magermilchpulver in TBS, (2): 2 % (m/V) *Blocking-Reagenz* (Amersham Biosciences, Freiburg) in TBS; (3): 1 % BSA in 0,1 % Tween 20 + 1 x TBS für SNAP *i.d.*TM (*Protein Detection System*, Millipore Corporation, Billerica, MA).

Primäre Antikörper	Isotyp	Herkunft
anti- β -Aktin Verdünnung 1:6000 in (2)	monoklonal, Maus	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. A 1978
anti-GFP für Immunpräzipitation in (3)	monoklonal, Maus	BioMol (Rockland), Hamburg Best.-Nr. 600-301-215
anti-GFP-HRP Verdünnung 1:2000 in (2), (3)	monoklonal, Maus	Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach Best.-Nr. 130-091-833
anti-ERK2 (C-14) Verdünnung 1:2000 in (1), (2)	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Best.-Nr. SC-154
anti-human Galektin-1 Verdünnung 1:1000 in (2)	polyklonal, Ziege	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt Best- Nr. AF 1152
anti-human Galektin-3 Verdünnung 1:1000 in (2)	monoklonal, Maus	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt Best- Nr. MAB1154
anti-human Galektin-8 Verdünnung 1:1000 in (2), 1:500 in (3)	polyklonal, Ziege	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt Best- Nr.: AF1305
anti-human Galektin-8 Verdünnung 1:1000 in (2), 1:500 in (3)	monoklonal, Maus	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt Best- Nr.: MAB 1305
Ras Pan (AB-3), Verdünnung 1:500 in (1), (2)	monoklonal, Maus	Calbiochem, Nottingham, UK Best.-Nr.: Cat#OP40
anti-GFP für Coimmunpräzipitation	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg Best.-Nr.: sc-8334

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

2.1.7.2.1 Peroxidase (HRP)-gebundene Antikörper

Tabelle 8: Peroxidase (HRP)-gekoppelte Antikörper

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G; HRP: *horse-radish peroxidase*.

sekundäre Antikörper	Isotyp	Herkunft
anti-Kaninchen-IgG Verdünnung 1:5000	affinitätsgereinigt aus Ziegen-Antiserum	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. A-6154
anti-Maus-IgG Verdünnung 1:2000	IgG-Fraktion aus Ziegen-Antiserum	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. A-5278
Anti-Maus-IgG Verdünnung 1:8000	affinitätsgereinigt aus Pferd- Antiserum	Cell Signaling Technology, USA, Best. Nr. 7076
anti-Maus-IgG Verdünnung 1:7000	affinitätsgereinigt aus Ziegen- Antiserum	Pierce, St. Augustin Best-Nr. 31430
anti-Ziegen/Schaf-IgG, Verdünnung 1:15000	gereinigt aus GT-34 Maus-Hybridoma-Zellen	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. A 9452

2.1.7.2.2 Alkalische Phosphatase-gekoppelte Antikörper

Tabelle 9: Alkalische Phosphatase-gekoppelte Antikörper

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G.

Antikörper	Isotyp	Herkunft
anti-Maus-IgG Verdünnung 1:1000	affinitätsgereinigt aus Ziegen- Antiserum	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. A-3562
anti-Kaninchen-IgG Verdünnung 1:1000	affinitätsgereinigt aus Maus- Antiserum	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Baltimore, USA Best.-Nr. 211-055-109

2.1.8 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 10: Low molecular weight marker, SDS-7, Sigma, Taufkirchen

Protein	Molekulargewicht (kDa)
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Glyzerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase	36
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	29
Trypsinogen, Rinderpankreas	24
Trypsininhibitor, Sojabohnen	20
β -Lactalbumin, Rind	14,2

Tabelle 11: High molecular weight marker, SDS-6H, Sigma, Taufkirchen

Protein	Molekulargewicht (kDa)
Myosin, Kaninchenmuskel	205
β -Galaktosidase, <i>E. coli</i>	116
Phosphorylase B, Kaninchenmuskel	96
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Carboanhydrase, Rindererythrozyten	29

2.1.9 Marker für Agarose-Gelelektrophorese

DNA Molecular Weight Marker III, (λ -DNA *Hind* III/*Eco*RI gespalten), Roche Diagnostics, Mannheim:

Fragmentgrößen in Basenpaaren:

21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564

1 Kb DNA Ladder, New England Biolabs, Frankfurt/Main:

Fragmentgrößen in Basenpaaren:

10002, 8001, 6001, 5001, 4001, 3001, 2000, 1500, 1000, 517, 500

2.1.10 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron, Ulm, synthetisiert und in H₂O in einer Konzentration von 10 µM gelöst. Diese Stammlösung wurde entsprechend der Verwendung weiter verdünnt.

Tabelle 12: Primer für die PCR der humanen Galektin-8 Varianten

Abkürzungen: bp: Basenpaare.

Primer	Sequenz	Länge
Galektin 8 RT-PCR KL1 5' Primer	5'-A TCG ACA AGA AGC TGG AAA A-3'	20 bp
Galektin 8 RT-PCR KL1 3' Primer	5'-GGT TTT TGT AGC AGC TGT GT-3'	20 bp
Galektin 8 RT-PCR KL2 5'Primer	5'-AGC TGG AAA AGA ATG ATG TT-3'	20 bp
Galektin 8 RT-PCR KL2 3'Primer	5'-TTT TGT AGC AGC TGT GTA GG-3'	20 bp
Galektin 8-Kozak-5' Primer	5'-GGG GGT ACC GCC ACC ATG ATG TTG TCC TTA AAC-3'	33 bp
Galektin 8-Kozak-3' Primer	5'- GGG GAT ATC CTA CCA GCT CCT TAC TTC CAG-3'	30 bp

2.1.11 Medien und Standardlösungen

2.1.11.1 Bakterienkulturmedium

Luria-Bertani-Flüssigmedium (LB-Medium):

1,0 % (m/V) Bacto™ Trypton; 0,5 % (m/V) Hefeextrakt; 1,0 % (m/V)
NaCl pH 7,5; in dH₂O

LB-Agar: 1,5 % (m/V) Agar in LB-Medium

2.1.11.2 Zellkulturmedium (Wachstumsmedium)

Alle Zelllinien wurden in DMEM (*high glucose*; 4,5 g/l) mit folgenden Zusätzen kultiviert:

10 % (V/V) fötales Kälberserum (FCS)

1 % (V/V) *Non-essential Amino Acids*

1 % (V/V) L-Glutamin (200 mM)

Alle Medienzusätze wurden jeweils vor Gebrauch durch einen Sterilfilter (0,22 µm; Millipore Corporation, Bedford, USA) filtriert.

2.1.11.3 Standardlösungen

1 x CMF-PBS: 140 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,2

1 x TBS: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl

Die Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert.

2.1.12 Geräte

Axiovert-25 Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Certomat BS-1	Braun, Melsungen
CO ₂ -Inkubator, Typ CB 210	WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen
Concentrator 5301 (<i>speed vac</i>)	Eppendorf, Hamburg
DNA-Photometer <i>GeneQuant pro</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
EGFP-Filter F41/014 für Olympus-Mikroskop	AHF-Analysentechnik, Tübingen
Vertikal-Elektrophoresekammer 10 x 8 cm	Sigma, Taufkirchen
Vertikal-Elektrophoresekammer 14 x 12,5 cm	Eigenbau, Werkstatt Universität Ulm
Heraeus Sepatech Megafuge 1.0	Kendro, Hanau
Horizontal-Gelkammer	MBT-Brand, Heidelberg
Immunoblot-Transfer-Kammer	Renner GmbH, Darmstadt
Inverses Fluoreszenzmikroskop IX 70	Olympus, Hamburg

J2-HS Zentrifuge; Rotoren JA10, JA20	Beckman Instruments, München
Miniblotkammer B 2157	Sigma, Taufkirchen
Minifuge GL	Kendro, Hanau
MasterCycler Personal	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Primus	MWG-Biotech
Optima TLX Ultrazentrifuge; Rotor TLA.45	Beckman Instruments, München
Sicherheitswerkbank	Kendro, Hanau
<i>SNAP i.d.TM (Protein Detection System)</i>	Millipore Corporation, Billerica, MA
Sorvall Ultrazentrifuge; Rotor SW41	Kendro, Hanau
Tischzentrifuge 5417-C	Eppendorf, Hamburg
Überkopf-Rotor REAX 2	Heidolph, Schwabach

2.1.13 Software

AnalySIS 3.2 Imaging System	Soft Imaging System, Münster
GraphPad Prism Version 3.0	GraphPad Software Inc., 32 bit version for Windows 95, San Diego, USA
ImageQuant 5.0	Molecular Dynamics (GE Healthcare), Freiburg
Micrografx Designer 9.0	Micrografx Inc., München
Micrografx Picture Publisher 9.0	Micrografx Inc., München

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung von Luria-Bertani (LB)-Medium

Das durch Autoklavieren sterilisierte Luria-Bertani (LB)-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika-Zusatz (Ampizillin 75 mg/l oder 75 µg/ml LB-Medium und Kanamycin 25 mg/l oder 250 µg/ml LB-Medium) wurde zur Kultivierung des *Escherichia coli*-Stamms TOP 10 verwendet. Zur Herstellung von Agarplatten wurde LB-Agar-Medium hergestellt. Das sterile LB-Agar-Medium wurde auf Handwärme abgekühlt und mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Anschließend wurden 20 ml davon in sterile Petrischalen (Ø 100 mm) gegossen. Diese wurden nach dem Erstarren des Agars bei 4 °C gelagert.

LB-Medium: 1,0 % (m/V) Bactotrypton; 0,5 % (m/V) Hefeextrakt;
1,0 % (m/V) NaCl in ddH₂O

LB-Agar-Medium : 1,5 % (m/V) Agar in LB-Medium

2.2.1.2 Antibiotika zur Selektion transformierter Bakterien

Durch Auflösen des als Natriumsalz in Pulverform vorliegenden Antibiotikums Ampizillin in ddH₂O wurde eine Stocklösung von 75 mg/ml Ampizillin steril hergestellt. Das Antibiotikum Kanamycin wurde ebenso in ddH₂O gelöst und eine Stocklösung von 25 mg/ml steril hergestellt. Die Stocklösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden 200 µl kompetente TOP 10 *E. coli* Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 0,2-0,4 µg Plasmid-DNA und 100 µl eiskalten TCM-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock für 3 min bei 42 °C und anschließendes Inkubieren für 1 min auf Eis ermöglicht die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien. Anschließend wurden 700 µl LB-Medium (Raumtemperatur) zugegeben und die Bakterien bei 200 Upm für 40 min bei 37 °C unter Schütteln zur Regeneration

inkubiert. Aus diesem Ansatz wurden anschließend 100-400 µl mit einem Drygalsky-Spatel auf LB-Platten ausgestrichen, denen entsprechend der Resistenz der transformierten Plasmide Antibiotikum zugesetzt worden war. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

TCM-Puffer: 10 mM Tris/HCl; 10 mM CaCl₂; 10 mM MgCl₂; pH 7,5

2.2.1.4 Selektion von transformierten Bakterien

Zur Selektion von plasmidhaltigen Bakterien wurde der Transformationsansatz auf antibiotikumhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Aufgrund eines Antibiotikumresistenz-Gens auf dem Plasmid können plasmidhaltige Bakterien das in den LB-Agarplatten zugesetzte Antibiotikum inaktivieren und sich somit vermehren. Dagegen können nichttransformierte Bakterien, denen das Resistenzgen für das entsprechende Antibiotikum fehlte, auf den antibiotikumhaltigen LB-Platten nicht wachsen. Mit Bakterien, die mit dem pCR2.1[®] TOPO-Vektor transformiert worden waren, konnte zusätzlich eine Blau/Weiß-Selektion durchgeführt werden. Mit Hilfe der Substanzen Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) kann die Aufnahme des rekombinanten Plasmids in Bakterien nachgewiesen werden. Nach Zugabe des Induktors IPTG setzte die plasmid-kodierte β-Galaktosidase das Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff um. Bei Bakterien mit rekombinanten Plasmiden verursachte die Insertion der klonierten cDNA in das β-Galaktosidase-Gen (lacZ) eine Unterbrechung der β-Galaktosidase-Sequenz. Diese Bakterienkolonien bestehen aus milchig-weißen Bakterien. Bakterien, die nur mit dem leeren Plasmid transformiert wurden, wuchsen als blaue Kolonie auf der LB-Agarplatte. Für jede Agarplatte wurden 50 µl X-Gal und 10 µl IPTG in 100 µl LB-Medium verdünnt. Diese Lösung wurde gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt und die Platte bis zum Ausstreichen des Transformationsansatzes getrocknet.

X-Gal: 20 mg/ml in DMF

IPTG: 100 mM in ddH₂O

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von DNA-Mengen bis zu 60 µg erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin®*Plasmid*-Kit (Macherey-Nagel, Düren). Aus 3 ml Bakterienkultur, die nach Animpfen einer Einzelkolonie 16 Stunden bei 37 °C inkubiert wurde, wurde nach Angaben des Herstellers die DNA aus den Bakterienzellen isoliert. Für die Isolierung von DNA-Mengen bis zu 350 µg wurden Bakterienzellen aus 200-250 ml Über-Nacht-Kultur sedimentiert. Mit Hilfe des StrataPrep®*EF Plasmid Midiprep Kit* (Stratagene, Heidelberg) wurde die DNA entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die erhaltene DNA wurde anschließend durch Ethanolfällung zusätzlich gereinigt.

2.2.2.2 Ethanolfällung von DNA

Zur Reinigung von Plasmid-DNA wurden zu 400 µl isolierter DNA, 10 % (V/V) 3 M Natriumazetat, pH 7,0, sowie 1 ml 100 % Ethanol (-20 °C) zugefügt und über Nacht bei -20 °C oder für 1 h bei -80 °C präzipitiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 14000 Upm (Tischzentrifuge 5415-R, Eppendorf, Hamburg) pelletiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol (-20 °C) überschichtet und erneut für 10 min unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einem Vakuumkonzentrator (Speed Vac Concentrator, Savant, New York, USA) getrocknet und in einem angemessenen Volumen ddH₂O oder Elution Buffer (Stratagene, Heidelberg) aufgenommen (Endkonzentration 0,5-1,0 µg/µl). Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Lösungen: 100 % (V/V) Ethanol p.a. (-20 °C);
70 % (V/V) Ethanol p.a. (-20 °C);
3 M Natriumazetat, pH 7,0

2.2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm mit einer Quarzküvette in einem Spektrophotometer (Smart SpecTM 3000, Bio-Rad Laboratories, München) bestimmt. Eine optische Dichte von 1 einer doppelsträngigen DNA entspricht 50 µg DNA/ml.

Die Konzentration der DNA (µg/µl) lässt sich wie folgt berechnen:

$$\frac{OD_{260} \times 50 \text{ µg} \times VF}{1000 \text{ µl}}$$

(VF = Verdünnungsfaktor)

Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit von DNA-Lösungen. Reine DNA-Lösungen weisen einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 auf.

2.2.2.4 DNA-Sequenzierung

Die automatisierte Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Firma GATC, Freiburg, durchgeführt.

2.2.2.5 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme werden von Bakterien gebildet, um virale DNA nach ihrem Eindringen in die Zelle zu zerstören und sich so vor Viren zu schützen. Restriktionsendonukleasen spalten DNA an bestimmten palindromischen Basensequenzen und ermöglichen so die Entstehung von linearer DNA mit glatten Enden (*blunt ends*) oder überstehenden Enden (*sticky ends*).

Die DNA wurde mit dem jeweiligen gewünschten Restriktionsenzym und dem vom Hersteller (Fermentas, St. Leon-Rot, Roche Diagnostics, Mannheim) hierfür vorgesehenen Puffer inkubiert. Durch Zugabe von ddH₂O wurde der Ansatz auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Ein Restriktionsansatz mit einem Volumen von 10 µl setzte sich wie folgt zusammen:

DNA (0,5-1 µg):	x µl
Restriktionsenzym (1-5 U):	0.1-0.5 µl
10 x Restriktionspuffer	1 µl
auffüllen mit ddH ₂ O auf 10 µl	

Nach sorgfältigem Mischen der Lösungen wurde der Ansatz für 60 min bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur, in der Regel 37 °C, inkubiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Spaltung wurde die DNA im Agarosegel aufgetrennt.

2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA erfolgt entsprechend ihres Molekulargewichtes in einem elektrischen Feld in einem Agarosegel. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert DNA im elektrischen Feld durch das Gel zur Anode. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA und ermöglicht so ein Sichtbarmachen der DNA-Banden durch ultraviolettes Licht. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe von DNA-Markern, bestehend aus DNA-Fragmenten bekannter Größen [1 Kb DNA *Ladder*, Invitrogen, Groningen, Niederlande und DNA *Molecular Weight Marker III* (0,12-21,2 kbp), Boehringer, Ingelheim]. Die Konzentration des verwendeten Agarosegels richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. In der Regel wurde eine 1 %ige Agaroselösung verwendet.

Tabelle 13: Agarose-Gelelektrophorese:

Agarosemengen und Trennbereich (nach Sambrook *et al.*, 1989)

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

Zur Herstellung eines Agarosegels (etwa 5 mm dick) wurde die Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und auf 50° gekühlt. Zur Agaroselösung wurde 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) pipettiert und diese in den vorbereiteten Gelschlitten (Größe:

8,5 x 7,5 cm) mit einem 8 oder 12 Taschen enthaltenden Kamm gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde der Gelschlitten in die Horizontalgelkammer gesetzt, welche mit 1 x TAE-Puffer gefüllt wurde. Der Kamm wurde entfernt und die im Verhältnis 6:1 mit DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Proben in die Taschen des Gels geladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 45-60 min. Die DNA-Banden wurden danach durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA durch ultraviolettes Licht bei 312 nm sichtbar gemacht.

1 x TAE-Puffer: 40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA, pH 8,0

6 x DNA-Probenpuffer: 0,25 % (m/V) Bromphenolblau; 60 mM EDTA, pH 8,0;
60 % (V/V) Glycerin

2.2.2.7 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen

Zur DNA-Extraktion aus Agarosegelen wurde der NucleoSpin® *Extraction Kit* von Macherey-Nagel verwendet. Die gewünschte DNA-Bande wurde nach Visualisierung auf dem UV-Tisch bei 312 nm mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend entsprechend den Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel eluiert.

2.2.2.8 Amplifizierung von Galektin-8 cDNA mittels PCR (*polymerase-chain-reaction*)

Um die für das Protein Galektin-8 kodierende cDNA klonieren zu können, wurde dieses mittels PCR amplifiziert. Das Enzym DNA-Polymerase kann in Gegenwart von Desoxynukleotiden (dNTPs) ein definiertes DNA-Segment, das durch die Bindung von zwei Primern an komplementäre Sequenzen begrenzt wird, amplifizieren.

Alle Polymerasekettenreaktionen wurden im MultiCycler PTC 200 (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) durchgeführt. Für die PCR-Reaktion wurde der REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma, Taufkirchen), das den Reaktionspuffer, dNTPs und die Taq-Polymerase enthält, verwendet. Um Kontaminationen der Lösungen mit Fremd-DNA zu überprüfen, wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt. Nach Beendigung der PCR wurde 1/10 der Ansätze in einem 1%igen (m/V) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die erhaltenen DNA-Fragmente unter UV-Beleuchtung analysiert. Die cDNA der untersuchten Zellen wurde freundlicherweise von Prof. Dr.

Andre Menke und seiner Arbeitsgruppe bereitgestellt.

In dieser Arbeit wurden für die PCR zwei verschiedene Reaktionsansätze verwendet. Der erste Reaktionsansatz (Reaktionsansatz 1) diente zur Amplifizierung der Galektin-8 cDNA zur nachfolgenden Klonierung in den Vektor pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) und weiteren Klonierung von pcDNA 3.1 (-)/Galektin-8 long bzw. pcDNA 3.1 (-)/ Galektin-8 short. Der zweite Ansatz (Reaktionsansatz 2) diente zur Amplifizierung der klonierten Galektin-8-cDNA-Sequenzen und anschließenden Klonierung von pcDNA 3/Kozak-Galektin-8 long und pcDNA 3/Kozak-Galektin-8 short verwendet.

Reaktionsansatz 1 (für die Klonierung von pCR 2.1 TOPO/Galektin-8):

1 µl (ca. 10 ng) cDNA (aus PANC-1-Zellen)

12,5 µl 2 x REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix , (Sigma, Taufkirchen)

1 µl 5´ Primer: Galektin-8 RT-PCR KL1- bzw. Galektin-8 RT-PCR KL2

1 µl 3´ Primer: Galektin-8 RT-PCR KL1- bzw. Galektin-8 RT-PCR KL2

ad 25 µl ddH₂O

Mit folgendem PCR-Programm wurden 35 Zyklen durchlaufen:

Denaturierung: 3 min, 94 °C

35 Zyklen: 30 sec, 94 °C Denaturierung

45 sec, 60 °C Anlagerung der Oligonukleotide

90 sec, 72 °C Synthese

Schlussynthese: 10 min, 72 °C

Abschlusstemperatur: 8 °C

Reaktionsansatz 2 (für die Klonierung von pcDNA 3/Kozak-Galektin-8 long und pcDNA 3/Kozak-Galektin-8 short):

0,5 µl (ca. 5 ng) dsDNA-Plasmid [pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 long bzw. pcDNA 3.1 (-)/Galektin-8 short]

2 µl 5´ Primer Galektin-8 (Kozak)

2 µl 3´ Primer Galektin-8 (Kozak)

25 µl REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma, Taufkirchen)

ad 50 µl ddH₂O

Mit folgendem PCR-Programm wurden 35 Zyklen durchlaufen:

Denaturierung: 5 min, 94 °C
35 Zyklen: 1 min, 94 °C Denaturierung
2 min, 50 °C Anlagerung der Oligonukleotide
2 min, 72 °C Synthese
Schluss-synthese: 10 min, 72 °C
Abschlusstemperatur: 8 °C

2.2.2.9. Ligation

Die Ligation von linearen DNA-Stücken in hydrolysierte Plasmide erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Diese kann die Phosphodiesterbindungen zwischen der 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-Hydroxylgruppe an dem anderen DNA-Ende schließen. Das Verhältnis von Fragment zu Vektor richtet sich nach der Art der Schnittstellen. Liegt eine *sticky end*-Schnittstelle vor, so werden Plasmid und Fragment im Verhältnis 1:5 eingesetzt, bei einer *blunt end*-Schnittstelle beträgt das Verhältnis von Plasmid zu Fragment 1:10. Ein Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl setzt sich wie folgt zusammen:

Ligationsansatz: 3 µl *Insert*-DNA (0,1-0,5 µg)
2 µl Vektor-DNA (20-50 ng)
1 µl T4-DNA-Ligase (10 U/µl) (Fermentas, St. Leon-Rot)
1 µl 10 x Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot)
ad 10 µl ddH₂O

Der Ansatz wurde sorgfältig gemischt und 16 Stunden bei 15 °C inkubiert.

Um die spezifische Ligation der DNA's zu überprüfen, wurde bei jeder Ligation eine Negativ-Kontrolle ohne DNA mitgeführt.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Ligationen wurde der TOPO TA 2.1 Cloning Kit, (Invitrogen, Karlsruhe) mit dem Vektor pCR[®] 2.1 benutzt.

2.2.2.10 Klonierungen

2.2.2.10.1 Klonierung der cDNA der humanen Galektin-8 Varianten long und short aus dem Ausgangsvektor pCR 2.1[®] in dem Expressionsvektor pcDNA 3.1 (-)

Mittels PCR wurden die cDNA-Sequenzen der humanen Galektin-8 Varianten long und short amplifiziert. Als *template* diente die cDNA aus PANC-1-, AsPc-1-, Patu 8902- und Patu 8988t- Zellen und die zwei Primer Galektin-8 RT-PCR KL1 und KL2 (siehe Kapitel 3.2.8 Reaktionsansatz 1.). Die Primersequenzen sind im Kapitel 2.10, Tabelle 9, beschrieben. Die so erhaltenen PCR-Fragmente wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, extrahiert und durch Ligation in dem Vektor pCR[®] 2.1 inseriert. Anschließend wurden zur Kontrolle der DNA-Insertion die aus den erhaltenen Bakterienkolonien isolierten Plasmide mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* (Fermentas, St. Leon Rot) geschnitten und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Zur Klonierung der Galektin-8 long und Galektin-8 short cDNA aus dem Ausgangsvektor pCR[®] 2.1 in den Expressionsvektor pcDNA3.1 (-), wurde das Plasmid pCR[®] 2.1/Galektin-8 long bzw. pCR[®] 2.1/Galektin-8 short und das Plasmid pcDNA3.1 (-) zunächst mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *KpnI* (Fermentas, St. Leon Rot) behandelt. Der nun geschnittene Vektor und die Galektin-8-cDNA Fragmente wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und aus diesem extrahiert. Anschließend wurden die cDNA-Fragmente mittels Ligation in den Vektor pcDNA3.1 (-) inseriert. Die Insertion der cDNA Fragmente wurde anschließend durch Restriktionsanalyse der aus den erhaltenen Bakterienkolonien isolierten Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* (Fermentas, St. Leon Rot) und Auftrennen auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft und positive Plasmide mittels Sequenzierung analysiert.

2.2.2.10.2 Klonierung von pcDNA3/Kozak-Galektin-8

Für die Generierung von pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short wurden die Galektin-8 cDNA Sequenzen aus den Plasmiden pcDNA3.1/Galektin-8 long und pcDNA3.1/Galektin-8 short mittels PCR amplifiziert. Durch den 5' Primer (siehe Tabelle 12) wurde vor dem ATG Start-Kodon die Kozak-Sequenz: 5' -GCCACC- 3' und vor der Kozak-Sequenz eine *KpnI* Restriktionsenzym-Schnittstelle eingefügt. Durch den 3'

Primer wurde nach dem Stopp-Kodon eine *EcoRV* Restriktionsenzym-Schnittstelle inseriert. Die PCR wurde mit dem REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix *with* MgCl₂ (Sigma, Taufkirchen) und den im Kapitel 3.2.8 aufgeführten Bedingungen (Reaktionsansatz 2.) durchgeführt.

Die PCR-Fragmente wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.2.6), aus diesem extrahiert (siehe Kapitel 3.2.7) und in das Plasmid pcDNA3, welches mit *KpnI* und *EcoRV* hydrolisiert worden war, ligiert. Die Insertion der cDNA-Fragmente in das Plasmid pcDNA3 wurde durch Restriktionsanalyse mit dem Restriktionsenzym *KpnI* und *BamHI* (siehe Kapitel 3.2.5) und Sequenzierung (siehe Kapitel 3.2.4) überprüft.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen der Pankreaskarzinom-, der Mammakarzinom-, der Kolonkarzinomzelllinien und der embryonalen Nierenzelllinie bis zu einer Konfluenz von 90-95 % kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen 2 x mit 5 ml eiskaltem 1 x CMF-PBS gewaschen. Nach Zugabe von 200 - 500 µl (für Ø 100 mm-Schalen) oder 50-100µl (für Ø 30 mm Schalen) des geeigneten Lysispuffers, wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst. Das Lysat wurde sofort in ein auf Eis vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert und danach mit einer Spritze (Tuberkulin-Spritze 1 ml; Kanüle Gr. 18, 0,45 x 25 mm) durch 5-maliges Aufziehen homogenisiert. Die Lysate wurden bei 15800 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile abzutrennen. Die löslichen Proteine im Überstand wurden in ein neues, auf Eis vorgekühltes, 1,5 ml- Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Kapitel 3.3.3). Zur Herstellung von Zelllysaten wurden zwei Lysispuffer verwendet. Für die nichttransfizierten Pankreaskarzinom-, Mammakarzinom-, Kolonkarzinom- und embryonalen Nierenzellen wurde der RIPA-Puffer verwendet. Die mit Expressionsplasmiden für Galektin-8 und EGFP-Ras-Isoformen co-transfizierten PANC-1- und HEK 293-Zellen wurden in Gold-Lysis-Puffer lysiert.

Lysispuffer :

RIPA-Puffer: 50 mM Tris HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,5 % (m/V) Na Deoxycholat; 1 % (V/V) NP-40; 0,1 % (m/V) SDS; 0,1 μ M Aprotinin; 1 μ M Leupeptin; 1 mM PMSF

Gold-Lysis-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,9; 50 mM NaCl; 1 mM EGTA; 10 % (V/V) Glycerol; 1 % (V/V) Triton X100; 1 mM PMSF; 1 mM Aprotinin; 10 μ M Leupeptin; 1 μ M Pepstatin A

2.2.3.2 Präparation von partikulären und löslichen Zellfraktionen

Um die Verteilung von Proteinen in den Zellen zu analysieren, wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Dazu wurden aus dem Gesamtzelllysat eine lösliche Zellfraktion (zytosolische Fraktion) und eine partikuläre Fraktion (membranhaltige Fraktion) durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g gewonnen. Für die Gewinnung der partikulären und der löslichen Fraktionen von humanen Pankreaskarzinomzellen, Mammakarzinomzellen-, Kolonkarzinomzellen und embryonalen Nierenzellen wurden die Zellen bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium, DMEM mit 10 %igen FCS Zusatz, kultiviert und anschließend zweimal mit 5 ml eiskaltem 1 x CMF-PBS pro 100 mm-Schale gewaschen. Nach Zugabe von 250 μ l HEPES-Puffer wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturschale gelöst, das Lysat mit einer Gilson-Pipette 5-mal auf- und abpipettiert und in ein auf Eis vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Lyse wurden die Zellen 10-mal durch eine Kanüle (Gr. 18, 0,45 x 25 mm) in eine 1 ml Spritze aufgezogen. Große Zellbruchstücke, Zellkerne und nicht-lysierte Zellen wurden durch Zentrifugation bei 500 x g für 1 min bei 4 °C abgetrennt. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand in ein 1,5 ml-Ultrazentrifugationsgefäß überführt und bei 100000 x g für 60 min bei 4 °C zentrifugiert, um die Membranfraktionen zu pelletieren. Der Überstand mit der löslichen Fraktion wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde 2-mal mit 250 μ l HEPES-Puffer gewaschen und zwischen den Waschsritten bei 100 000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt und in 50-100 μ l RIPA-Puffer mit einem Pistill homogenisiert, um die partikuläre Fraktion zu erhalten. Anschließend wurde von beiden Fraktionen die Proteinkonzentration bestimmt.

HEPES-Puffer: 50 mM HEPES/NaOH; 8,6 % (m/V) Saccharose; 10 mM EDTA; 10 mM EGTA; 1 mM PMSF; 40 µg/ml Leupeptin; 400 µg/ml (m/V) Trypsin-Inhibitor (aus Sojabohnen); 40 µg/ml Pepstatin A; pH 7,6

RIPA-Puffer: 50 mM Tris HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,5 % (m/V) Na-Deoxycholat; 1 % (V/V) NP-40; 0,1 % SDS; 0,1 µM Aprotinin; 1 µM Leupeptin; 1 mM PMSF

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde kolorimetrisch nach der Methode von Smith (Smith *et al.*, 1985) mittels *bicinchoninic acid* (BCA) bestimmt. Bei dieser Methode wird Cu^{2+} in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu Cu^+ reduziert. Cu^+ bildet mit BCA einen Komplex, der bei 562 nm photometrisch gemessen werden kann. Zur Erstellung einer Standardreihe wurden 0 µl, 10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl und 50 µl einer Proteinstandardlösung (2 mg/ml BSA) eingesetzt. Von der zu bestimmenden Proteinlösung wurden 5 µl oder 10 µl eingesetzt, als Nullkontrolle wurde die gleiche Menge Lysispuffer verwendet. Alle Ansätze wurden mit ddH₂O auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt. Zu jedem Ansatz wurde 1 ml BCA-Reagenzlösung gegeben und die Proben anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion mit einem Photometer (Smart SpecTM 3000, Bio-Rad Laboratories, München) bei 562 nm gemessen. Über lineare Regression wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration ermittelt wurde.

BCA-Reagenzlösung: 10 ml BCATM *Protein Assay Reagent A* (Pierce, St. Augustin); 200 µl CuSO₄-Lösung (Sigma, Taufkirchen)

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde basierend auf der Methode von Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970) durchgeführt. Aus den Monomeren Acrylamid und Bisacrylamid wird in Anwesenheit von N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) durch

Radikalkettenpolymerisation ein quervernetztes Polyacrylamid-Gel hergestellt. Der Vernetzungsgrad und damit auch der Trennbereich der Proteine ist vom Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid im Trenngel sowie von der Acrylamid-Gesamtkonzentration (10 % oder 12,5 %) abhängig. Je nach Gelgröße wurden drei verschiedene Gelapparaturen verwendet: (a) Gelplatten: 14 x 12,5 cm, Abstandhalter mit 1 mm Dicke für die in der Werkstatt der Universität Ulm hergestellte vertikale Elektrophoresekammer (Trennkapazität: 70-120 µg Protein) (b) Gelplatten: 10 x 8 cm, Abstandhalter mit 1 mm Dicke für die Vertikal-Elektrophoresekammer der Firma Sigma, Taufkirchen (Trennkapazität: 20-70 µg Protein) und (c) Gelplatten 14,5 x 9 cm, Abstandhalter mit 1 mm Dicke für die Vertikal-Elektrophoresekammer hergestellt in der Werkstatt der Universität Ulm (Trennkapazität: 20-70 µg Protein). In der nachfolgenden Tabelle sind die Bestandteile des Trenngels je nach Acrylamidkonzentration aufgelistet. Die angegebenen Mengen sind für 2 Gele der Größe 10 x 8 cm.

Tabelle 14: Zusammensetzung für das SDS-Polyacrylamid-Trenngel und das Sammelgel

	10 % Trenngel	12,5 % Trenngel	Sammelgel
30 % (m/V) Acrylamidlösung	2,6 ml	3,25 ml	0,38 ml
2 % (m/V) Bisacrylamidlösung	1 ml	1,2 ml	0,15 ml
3 M Tris/HCl pH 8,8	1 ml	1 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	0,38 ml
10 % (m/V) SDS	0,08 ml	0,08 ml	0,03 ml
60 % (m/V) Saccharose	-	-	0,75 ml
H ₂ O	3,2 ml	2,45 ml	1,3 ml
TEMED	8 µl	8 µl	4 µl
10 % (m/V) APS	50 µl	50 µl	40 µl
Trennbereich	30-130 kDa	20-100 kDa	-

Zuerst wurden die Bestandteile des Trenngels pipettiert und gut gemischt. Die Lösung wurde zwischen die Glasplatten gegossen und mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isobutanol vollständig entfernt, das Sammelgel in der oben angegebenen Zusammensetzung gemischt, auf das Trenngel gegossen und anschließend ein Kamm mit 10, 14 oder 16 Taschen, je

nach Gelgröße, eingesetzt.

Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Tris-Glyzin-Puffer bei einer konstanten Spannung von 400-120 Volt. Von den zu analysierenden Proben wurden je nach Gelgröße 30 µg bis 50 µg Protein mit mindestens 20 % (V/V) SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proteine wurden vor dem Auftragen für 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend in die Geltaschen geladen und aufgetrennt.

1 x Tris-Glyzin-Puffer: 50 mM Tris; 0,5 M Glyzin; 0,1 % (m/V) SDS; pH ca. 8,5
(nicht eingestellt)

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

2.2.3.5 Coomassie-Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen

Nach Beendigung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Trenngel in 50-200 ml Coomassie-Blau-Färbelösung über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel in 50-200 ml Entfärbelösung überführt und solange darin inkubiert, bis sich die blau gefärbten Proteinbanden deutlich abzeichneten und der Hintergrund farblos war.

Färbelösung: 0,025 % (m/V) *Coomassie*® *Brilliant Blue R 250*;
10 % (V/V) Essigsäure, 25 % (V/V) 2-Isopropanol

Entfärbelösung: 10 % (V/V) Essigsäure; 25 % (V/V) 2-Isopropanol

2.2.3.6 Immunoblotting von Proteinen (*Western Blot*)

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Protran® BA85, Schleicher & Schuell, Dassel). Dazu wurde das Gel luftblasenfrei auf eine in Transferpuffer äquilibrierte Nitrozellulosemembran gelegt und beides zwischen zwei Whatman-Papieren (3 mm CHR) (Schleicher & Schuell, Dassel) und drei Schwämmen zwischen zwei Plastikgitter geklemmt und in die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer gestellt. Durch Anlegen einer konstanten Spannung

von 80 V erfolgte der Transfer der negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Nitrozellulose, wobei sich die Nitrozellulosemembran auf der Seite der Anode befand. Bei den 10 x 8 cm großen und 1 mm dicken Gelen erfolgte die Übertragung für 45 min, bei den 14 x 12,5 cm und 14,5 x 8 cm großen und 1 mm dicken Gelen für 1 h in einer Miniblotkammer (Sigma, Taufkirchen).

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

2.2.3.7 Detektion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran in 0,2 % (m/V) Ponceau S-Lösung gefärbt, um den Proteinstandard sichtbar zu machen, und um den Transfer der Proteine zu kontrollieren. Der Proteinstandard wurde markiert und die Membran anschließend in 1 x TBS wieder entfärbt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h in 1 x TBS mit 5 % (m/V) Magermilchpulver oder in 1 x TBS mit 2 % *Blocking*-Reagenz (Amersham Biosciences, Freiburg) inkubiert. Der Nachweis immunreaktiver Proteine erfolgte durch anschließende Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht bei 4 °C unter konstantem Schütteln auf einer Wippe. Der primäre Antikörper wurde, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, in 0,5 % (m/V) Magermilchpulver bzw. 2 % (m/V) *Blocking*-Reagenz in 1 x TBS verdünnt. Anschließend wurde die Membran dreimal mit 1 x TBS für jeweils 10 min gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln auf einer Wippe. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in der in Kapitel 2.7.2 angegebenen Verdünnung in 0,5 % (m/V) Magermilchpulver oder 2 % (m/V) *Blocking*-Reagenz in 1 x TBS eingesetzt. Nach erneutem dreimaligem Waschen, wie oben beschrieben, erfolgte die Detektion der Proteine. Je nach Modifikation des zweiten Antikörpers, d.h. Koppelung an HRP (*horseradish peroxidase*/Meerrettich-Peroxidase) oder alkalische Phosphatase, wurden die Protein-Antikörper-Komplexe entweder mit Hilfe des *ECL Western blotting*-Detektionssystems (ECL) oder des *ECL Advance Western Blotting*-Detektionssystems (ECL-Advance) bzw. durch eine Farbreaktion mittels alkalischer Phosphatase nachgewiesen.

- Ponceau S-Lösung:** 0,2 % (m/V) Ponceau S (Sigma, Taufkirchen);
3 % (m/V) TCA
- 1 x TBS-Lösung:** 0,1 M Tris HCl pH 7,4; 150 mM NaCl

2.2.3.7.1 Detektion der Proteinen mit spezifischen Antikörpern mittels *SNAP i.d.*TM

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Blotten in 0,2 % (m/V) Ponceau S-Lösung gefärbt, um den Proteinstandard sichtbar zu machen, und um den Transfer der Proteine zu kontrollieren. Anschließend wurde der Proteinstandard markiert und die Membran in 1 x TBS entfärbt. Für die weiteren Schritten wurde die Nitrozellulosemembran blasenfrei in der vom Hersteller mitgelieferten *SNAP i.d.*TM Doppelkammer und anschließend in das *SNAP i.d.*TM Protein Detection System (Millipore Corporation, Billerica, MA) eingesetzt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden 15 ml 1 % BSA (m/V) in 1 x TBS + 0,1 % Tween 20 auf die Nitrozellulosemembran gegeben und mittels einer Absaugpumpe durch die Membran gesaugt. Der Nachweis immunreaktiver Proteine erfolgte durch anschließende Inkubation in 2,5 ml eines entsprechenden verdünnten primären Antikörpers (siehe Kapitel 2.7.1) für 10 min. Der primäre Antikörper wurde in 1 x TBS + 0,1 % Tween 20 verdünnt. Anschließend wurde die Antikörperlösung durch die Membran abgesaugt und die Membran dreimal mit je 15 ml 1 x TBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen. Die Inkubation mit dem in 1 x TBS + 0,1 % Tween 20 verdünnten sekundären Antikörper (siehe Kapitel 2.7.2) erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Dafür wurden 2,5 ml der verdünnten sekundären Antikörper-Lösung gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach erneutem dreimaligem Waschen, wie oben beschrieben, erfolgte die Detektion der Proteine. Je nach Modifikation des zweiten Antikörpers, d.h. Koppelung an HRP (*horseradish peroxidase*/Meerrettich-Peroxidase) oder alkalische Phosphatase, wurden die Protein-Antikörper-Komplexe entweder mit Hilfe des *ECL Western blotting*-Detektionssystems oder des *ECL Advance Western Blotting*-Detektionssystems bzw. durch eine Farbreaktion mittels alkalischer Phosphatase nachgewiesen.

2.2.3.8 Detektion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern

2.2.3.8.1 Nachweis immunreaktiver Proteine durch das ECL *Western-blotting* bzw. das ECL *Advance Western Blotting*-Detektionssystem

Zum Nachweis von HRP-gekoppelten Antikörpern wurden die beiden *ECL Advance Western Blotting Detection*- bzw. *ECL Western Blotting Detection* Reagen-Lösungen 1 und 2 (Amersham Biosciences, Freiburg) jeweils im Verhältnis 1:1 gemischt und die Nitrozellulosemembran für 5 min in der Lösung inkubiert. Die Membran wurde auf eine gereinigte Glasplatte gelegt und mit Frischhaltefolie abgedeckt. In einer Dunkelkammer wurde für 1 sec bis 30 min (je nach Signalstärke) ein Röntgenfilm aufgelegt und anschließend entwickelt (RTU 60 Entwickler/Fixierer, Adefo-Chemie, Dietzenbach).

2.2.3.8.2 Nachweis immunreaktiver Proteine mittels alkalischer Phosphatase

Zum Nachweis von alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörpern wurde die Membran einmal in AP-Puffer gewaschen. Zur Darstellung der Protein-Antikörper-Komplexe wurde 1 Teil NBT- und 1 Teil BCIP-Lösung mit 100 Teilen AP-Puffer gemischt und darin die Nitrozellulosemembran im Dunkeln inkubiert. Die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase-Antikörper-Komplexe führte an der jeweiligen Stelle auf dem Blot zu einer Braunfärbung in Form einer Bande. Sobald diese Banden deutlich erkennbar waren, wurde die Entwicklerlösung mit H₂O abgespült.

AP-Puffer: 50 mM Tris/HCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,5

NBT-Lösung: 3 % (m/V) 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) in
70 % (V/V) Dimethylformamid

BCIP-Lösung: 1,5 % (m/V) 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-
Toluidinsalz (BCIP) in 100 % Dimethylformamid

2.2.3.9 Elution gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran

Zur Entfernung gebundener Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran für 5 min in Elutionspuffer inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal in einem großen Volumen (> 100 ml) dH₂O für 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift für 10 min in 1 x TBS. Der Immunblot wurde danach wieder abgesättigt und erneut mit primären und sekundären Antikörper inkubiert.

Elutionspuffer: 200 mM Glyzin; 500 mM NaCl; pH 2,8

2.2.3.10 Co-Immunpräzipitation zur Analyse von Proteinkomplexen aus EGFP-K-Ras(G12V), -K-Ras(S17N), HA-N-Ras(G12V) und -H-Ras und Galektin-8 long und Galektin-8 short

Die Immunpräzipitation von Proteinen mittels spezifischer Antikörper ermöglicht die selektive Anreicherung eines Proteins aus einem Zelllysate. Dies wird durch Bindung spezifischer Antikörper an Immunglobulin-Fc-Bindungsstellen von Protein A oder Protein G erreicht. Die verwendeten Protein A-Moleküle sind an Agarose-*beads* gekoppelt und können somit aus der Proteinlösung über Zentrifugation sedimentiert werden.

Zunächst wurden 1-3 µg vom GFP-Kaninchen-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) Antikörper in 500 µl Gold-Lysis-Puffer mit 25 µl Protein A-Agarose 30 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert, um die Antikörper-Moleküle an die *beads* zu binden. Die nächsten Arbeitsschritte erfolgten auf Eis oder bei 4 °C. Die Agarose-*beads* wurden bei 3000 x g für 1 min präzipitiert, der Überstand abgenommen und Zelllysate mit einer Proteinmenge von 1 mg zugegeben. Der Ansatz wurde mit Gold-Lysis-Puffer auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt und anschließend 2 h in einem Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Das Präzipitat wurde einmal mit 500 µl Gold-Lysis-Puffer und anschließend zweimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und zwischen jedem Waschschrift jeweils bei 3000 x g für 1 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Agarose-*beads* mit der *Hamilton*-Spritze trockengesaugt. Die Agarose-*beads* wurden mit 20 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgekocht. Nach Auftrennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 3.3.4) und Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (siehe Kapitel 3.3.6) wurden die

immunpräzipitierten Proteine in einer Immunblotanalyse durch spezifische Antikörper detektiert (siehe Kapitel 3.3.8).

Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 1 % (V/V) NP-40;
0,5 % (m/V) Na-Deoxycholat; 0,1 % SDS, pH 8,0

Gold-Lysis-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,9; 50 mM NaCl; 1 mM EGTA;
10 % (V/V) Glycerol; 1 % Triton X100; 1 mM PMSF;
1 mM Aprotinin; 10 μ M Leupeptin; 1 μ M Pepstatin A

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

2.2.3.11. Immunpräzipitation mit μ MACSTM anti-GFP *MicroBeads* zur Analyse von Proteinkomplexen aus EGFP-K-Ras(G12V)-, -K-Ras(S17N)-, -HA-N-Ras(G12V)- und -H-Ras und Galektin-8 long und Galektin-8 short

Um die Bindung von Galektin-8 long und Galektin-8 short an EGFP-K-Ras(G12V), EGFP-K-Ras(S17N), EGFP-HA-N-Ras(G12V) und EGFP-H-Ras nachweisen zu können, wurden Zelllysate von EGFP-Ras und Galektin-8 long bzw. Galektin-8 short exprimierenden PANC-1-Zellen mit μ MACSTM anti-GFP *MicroBeads*, inkubiert, um entsprechende Protein-Protein-Komplexe zu isolieren. Die anti-GFP *MicroBeads* sind im μ MACSTM *Epitope Tagged Protein Isolation Kit* (Miltenyi-Biotech, Bergisch-Gladbach) enthalten. Bei diesem System werden Proteinkomplexe mit Hilfe von anti-GFP-Antikörper-haltigen, magnetischen *MicroBeads* aus Zelllysaten immunpräzipitiert und über sogenannte μ -Säulen (Miltenyi-Biotech, Bergisch-Gladbach), die sich in einem magnetischen Feld befinden, gereinigt.

Hierzu wurde je Probe Zelllysate mit einer Proteinmenge von 500 - 1000 mg mit 40 μ l anti-GFP-Antikörper-haltigen, magnetischen *MicroBeads* gemischt und auf ein Endvolumen von 500 μ l mit Gold-Lysis-Puffer aufgefüllt. Der Ansatz wurde 3 h bei 4 °C in einem Überkopf-Rotor inkubiert. Zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen wurden zwei weitere Ansätze mit Lysaten von Galektin-8 long bzw. Galektin-8 short bzw. EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1-Zellen- bzw. HEK 293-Zellen mitgeführt.

Um die entstandenen Proteinkomplexe anzureichern, wurden die Ansätze auf μ -Säulen

aufgetragen. Die Säulen waren zuvor in einem μ MACS-Magneten platziert und mit 200 μ l Gold-Lysispuffer äquilibriert worden. Anschließend wurden die Proben viermal mit je 500 μ l Gold-Lysis-Puffer gewaschen. Um Detergenzien und Salze zu entfernen, wurden die Säulen dann zweimal mit 500 μ l Waschpuffer gewaschen. Alle Waschlösungen wurden zuvor durch einen Filter der Porengröße 0,22 μ m sterilfiltriert. Zur Vorbereitung der Elution der Proteine wurden zunächst 25 μ l 95 °C-heißer Elutionspuffer auf die μ -Säulen gegeben und für 5 min inkubiert. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von 50 μ l heißem Elutionspuffer. Den eluierten Proben wurde je 10 μ l 5x SDS-Probenpuffer zugegeben. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C gekocht und anschließend direkt für die SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.3.4) verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurde in der Immunblotanalyse für die Detektion der immunpräzipitierten EGFP-Ras-Proteine ein monoklonaler Peroxidase-konjugierter anti-GFP Antikörper (Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach) in der Verdünnung 1:2000 verwendet. Für die Detektion von co-immunpräzipitiertem Galektin-8 Isoform wurde ein polyklonaler Galektin-8 Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) in der Verdünnung 1:500 verwendet.

Gold-Lysis-Puffer:	20 mM Tris/HCl; 50 mM NaCl; 10 % (V/V) Glycerin; 1% (V/V) Triton X-100; 1 mM PMSF; 1 mM Aprotinin; 10 μ M Leupeptin; 1 μ M Pepstatin A; 1 mM EGTA; 1 mM Na-Orthovanadat; 10 mM NaF; 0,5 μ M GTP; pH 7,9
Waschpuffer:	20 mM Tris/HCl; pH 7,5
Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl; 1 % (V/V) SDS; 1 mM EGTA; 10 % (V/V) Glycerin; 50 mM DTT; 0,1 % (m/V) Bromphenolblau; pH 6,8
5 x SDS-Probenpuffer:	200 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA; 1 M Saccharose; 1 mM DTT; 2% (m/V) SDS; 0,1 % (m/V) Bromphenolblau; pH 8,8

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die verwendeten Pankreaskarzinom-, Mammakarzinom-, Kolonkarzinom- und embryonalen Nierenzelllinien wachsen adhärent und wurden in Wachstumsmedium (*Dulbeccos's Modified Eagle Medium* (DMEM), Invitrogen, Groningen, Niederlande) plus Zusätze (siehe Kapitel 2.11.2) bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank (Kendro, Hanau) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 8-10 ml bzw. 3 ml Wachstumsmedium bei Verwendung von 100 mm bzw. 30mm-Zellkulturschalen. Das Wachstumsmedium der Kulturen wurde nach 2-3 Tage erneuert. Nach Erreichen einer konfluenten Zellschicht wurden die Zellen durch Passagieren auf neue Kulturschalen verteilt.

2.2.4.2 Passagieren von Zellen mittels Trypsin-EDTA-Lösung

Zum Passagieren der adhärennten Zellen wurde bei den bis zur Konfluenz kultivierten Zellen zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 5 ml 1 x CMF-PBS (für 100 mm Zellkulturschalen) gewaschen. Die bestehenden Zell-Zell-Kontakte sowie die Zell-Matrix-Kontakte wurden durch Zugabe von 2 ml (für 100 mm-Schalen) 0,25 %iger Trypsin/EDTA-Lösung (PAA Laboratories, Linz, Österreich) und Inkubation der Zellen für 5-7 min bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator gelöst. Der Ablösungsprozess der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium gestoppt, die Zellen von der Schale gespült und in ein steriles 15 ml-Polypropylenröhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 200 x g für 5 min bei Raumtemperatur (Sepatech Megafuge 1.0, Kendro, Hanau) sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung auf neue Schalen verteilt. Alle Lösungen und Kulturmedium wurden vorher auf 37 °C erwärmt.

2.2.4.3 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.4.2. beschrieben, mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Schalenboden gelöst, abzentrifugiert und in Wachstumsmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Zellen in einem der großen Quadrate mit dem Volumen von 0,1 mm³ bzw. 1 x 10⁻⁴ ml berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml Kulturmedium}$$

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte jeweils als Mittelwert aus zwei unabhängigen Bestimmungen.

2.2.4.4 Transfektion von PANC-1- und HEK 293-Zellen mit Plasmid-DNA mit DMRIE-C Reagent

Die PANC-1 Zellen (2-3 x 10⁶ bzw. 1-2 x 10⁵) wurden auf 100 mm bzw. 30 mm Zellkulturschalen ausgesät. Für die Transfektion wurden Zellen mit einer Konfluenz von 50 -80 % verwendet. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Lösungen und das Kulturmedium wurden vorher auf 37 °C erwärmt. Als Transfektionsreagenz wurde DMRIE-C Reagent (Invitrogen, Groningen, Niederlande) verwendet. Dieses Transfektionsreagenz enthält das Lipid 1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy-ethyl-ammoniumbromid sowie Cholesterol in wäßriger Lösung. Das Lipid bildet mit DNA einen Komplex, welcher sich in die Zellmembran einlagert und vermutlich durch Endozytose ins Zellinnere gelangt (Felgner, 1996; Felgner *et al.*, 1987).

In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden, wie in der unteren Tabelle dargestellt, folgende Lösungen kombiniert:

Tabelle 15: Transfektionsanleitung

Lösung A	Schalen (Ø 30 mm)	Schalen (Ø 100 mm)	Lösung B	Schalen (Ø 30 mm)	Schalen (Ø 100 mm)
Plasmid-DNA	2 µg	8 µg	DMRIE-C	5 µl	30 µl
OptiMEM I	auf 200 µl ergänzen	auf 500µl ergänzen	OptiMEM I	auf 200 µl ergänzen	auf 500 µl ergänzen

Die Lösungen A und B wurden sorgfältig durch Vortexen gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Lösungen A und B zusammengegeben, kurz gemischt und 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen zweimal mit Medium ohne Zusätze (DMEM, Invitrogen, Groningen, Niederlande) gewaschen und mit je 1 ml bzw. 4 ml Medium ohne Zusätze für 30 mm bzw. 100 mm Schalen vorgelegt. Die DNA-Liposomenlösung wurde anschließend tropfenweise auf die Zellen pipettiert und die Zellen für 6 h bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Nach der 6-stündigen Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit neuem Wachstumsmedium überschichtet (3 ml für 30 mm Schalen und 10 ml für die 100 mm Schalen). Um das Wachstum der Zellen zu unterstützen wurde das Kulturmedium bei Bedarf nach weiteren 24 h gewechselt. Die transfizierten Zellen wurden für 24 bis 48 h bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator, inkubiert und anschließend in dem entsprechenden Lysispuffer lysiert (siehe Kapitel 3.3.1).

2.2.4.5 Transfektion von HEK 293-Zellen mit Plasmid-DNA mit Transfast *Reagent*

Die HEK 293-Zellen ($3-4 \times 10^6$ bzw. $-2-3 \times 10^5$) wurden auf 100 mm bzw. 30 mm Zellkulturschalen ausgesät. Für die Transfektion wurden Zellen mit einer Konfluenz von 50-80 % verwendet. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Lösungen und das Kulturmedium wurden vorher auf 37 °C erwärmt. Als Transfektionsreagenz wurde Transfast *Reagent* (Promega, Mannheim), das nach Angaben des Herstellers gelöst wurde, verwendet. Hierzu wurden 0,4 mg Transfast in 400 µl H₂O gut aufgelöst und eingefroren.

Für die Transfektion wurden folgende Lösungen, wie in der unteren Tabelle dargestellt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße kombiniert:

Tabelle 16: Transfektionsanleitung

HEK 293-Zellen	Schalen (Ø 30 mm)	Schalen (Ø 100 mm)
OptiMEM I	400 µl	1 ml
Plasmid-DNA	4 µg	20 µg
Transfast	12 µl	60 µl

Die Bestandteile des Transfektionsansatzes wurden gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden 1 x mit Wachstumsmedium gewaschen und mit 1 ml bzw. 4 ml Wachstumsmedium überschichtet. Die DNA-Liposomenlösung wurde auf die Zellen tropfenweise pipettiert und für 1 h inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz mit 1 ml bzw. 6 ml Wachstumsmedium überschichtet. Um das Wachstum der Zellen zu unterstützen wurde das Kulturmedium nach 24 h gewechselt. Die nun transfizierten Zellen wurden für 24-48 h bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator inkubiert und anschließend geerntet.

2.2.5 Auswertung

Die Expressionsanalysen sowie die quantitative und die densitometrische Bestimmungen der Menge an Galektin-1, -3 und -8 Isoformen in den Zelllinien wurden jeweils als dreifach Bestimmungen durchgeführt und ein Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen bestimmt.

Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Ähnliche und identische Trends wurden bei jedem Versuch erzielt. Die Ergebnisse von repräsentativen Experimenten sind dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Quantitative Analyse der Proteinexpression von Galektin-1, -3 und -8 in verschiedenen Zelllinien

Den Galektinen werden multiple intra- und extrazelluläre Funktionen zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass Galektine in der Tumorgenese und Metastasierung eine entscheidende Rolle spielen. Verschiedene Untersuchungen konnten eine Korrelation zwischen der Expression einiger Galektine in Karzinomzellen und dem Stadium der Tumorentwicklung bzw. der Metastasierung zeigen (Oka *et al.*, 2004). Das Ziel der in diesem Kapitel dargestellten Analysen war die quantitative Bestimmung der Proteinexpression der drei Galektine: Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8, in 11 verschiedene Tumorzelllinien und HEK 293-Nierenepithelzellen.

Zunächst wurde die Proteinexpression der drei Galektine mittels Immunblotverfahren in RIPA-Gesamtlysaten der 12 Zelllinien -neun Pankreaskarzinom-, eine Mammakarzinom-, eine Kolonkarzinom- und eine embryonale Nierenzelllinie- untersucht. Um Hinweise auf gewebsspezifische Unterschiede zu bekommen wurden neben den Pankreaskarzinomzelllinien drei nicht-Pankreaskarzinomzelllinien in die Versuchsreihen eingeschlossen. Um die subzelluläre Lokalisation der Galektine analysieren zu können, wurden außerdem membran- bzw. zytosolhaltige Fraktionen mittels Ultrazentrifugation bei 100000 x g hergestellt. Durch die anschließend durchgeführten densitometrischen Analysen konnte der Galektin Gehalt in den 12 Zelllinien vergleichend bestimmt werden.

3.1.1 Analyse der Proteinexpression von Galektin-1, -3 und -8 in RIPA-Gesamtlysaten

Zur Untersuchung der Galektinexpression in den verschiedenen Zelllinien, wurden zunächst RIPA-Gesamtlysate aus den Zellen der neun Pankreaskarzinomzelllinien, PANC-1, MiaPaCa2, AsPc-1, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, Patu 8902, Patu 8988s, Patu 8988t, der Kolonkarzinomzelllinie SW480, der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und der Nierenepithelzelllinien HEK 293 angefertigt. Die bei einer 80 %igen Konfluenz geernteten Zellen wurden in 250-500 µl RIPA-Puffer lysiert und unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Von den Lysaten wurden zum Nachweis der Galektinexpression

jeweils 50 µg Proteinlysate für Galektin-1 und Galektin-3 und 75 µg Proteinlysate für Galektin-8 in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Zum Nachweis der Spezifität des polyklonalen anti-Galektin-1- bzw. monoklonalen anti-Galektin-3- und anti-Galektin-8-Antikörper wurde auf jedem Immunblot jeweils humanes rekombinantes Galektin-1, Galektin-3 oder Galektin-8 als Kontrolle aufgetragen.

Die Blots in Abbildung 9, 10 und 11 zeigen die Proteingehalte der Galektine in den Zelllinien. Deutliche Unterschiede erkennt man in der Anzahl der nachgewiesenen Banden, die den einzelnen Galektinen entsprechen. Während Galektin-1 und -3 im Immunblotverfahren als Einzelbande nachgewiesen werden konnte, deuten die im Immunblot nachgewiesenen Galektin-8-Doppelbanden auf zwei Isoformen hin.

Galektin-1 besteht aus 135 Aminosäuren was einer errechneten Molekularmasse von 14,716 kDa entspricht, und konnte in den meisten Zelllinien nachgewiesen werden. Die Ausnahme machen Patu 8988s- und HEK 293-Zellen, in denen kein Galektin-1 nachgewiesen werden konnte. Geringe Mengen Galektin-1 konnten in den Pankreaskarzinomzellen Capan-1, Capan-2 und Patu 8902 detektiert werden. Dagegen konnte in den anderen Zelllinien eine höhere Galektin-1-Quantität nachgewiesen werden. Der Blot in Abbildung 9 zeigt, dass in den Gesamtlysaten der Pankreaskarzinomzellen PANC-1, MiaPaCa-2 und Patu 8988t und die SW480-Kolonkarzinomzellen die größte Galektin-1 Menge enthalten. Durch die densitometrische Analyse der einzelnen Banden (siehe Tabelle 17) konnte gezeigt werden, dass die MiaPaCa-2-Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien die größte Menge Galektin-1 enthält.

Die anti-Galektin-1 Antikörper-Spezifität konnte durch den Nachweis des humanen rekombinanten Galektin-1 bei ca. 15 kDa. bestätigt werden (Abb. 9., Spur 1).

Zur Kontrolle der auf dem Immunblot aufgetragenen Proteinmengen, wurde der Blot anschließend mit einem β -Aktin-Antikörper behandelt und β -Aktin durch Detektion mit einem entsprechenden HRP-gebundenen Maus-Antikörper nachgewiesen. Ausgehend von der Annahme, dass die epithelialen Zellen ungefähr die gleiche Menge β -Aktin im RIPA-Lysat enthalten, zeigt der in Abbildung 9 abgebildete Immunblot eine gleichmäßige Proteinverteilung.

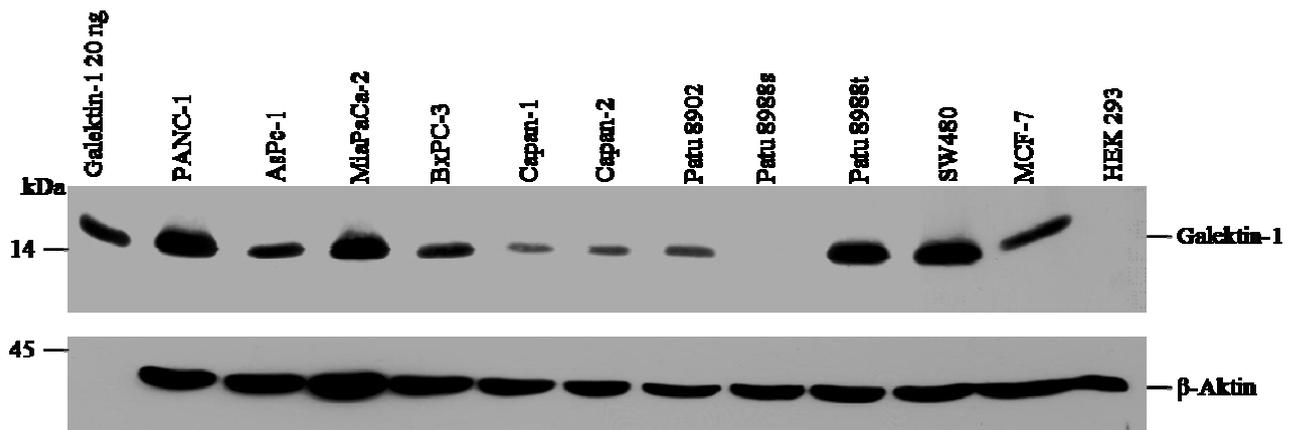


Abb. 9: Expression von Galektin-1 in verschiedenen Zelllinien: Die Zellen der Zelllinien PANC-1, AsPc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, Patu 8902, Patu 8988s, Patu 8988t, SW480, MCF-7, HEK 293 (Spur 2-13) wurden bis zu einer 80 %igen Konfluenz in Wachstumsmedium gezogen und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. Je 50 µg vom RIPA-Gesamtlysat wurde im Immunblotverfahren analysiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen anti-Galektin-1-Antikörper (1:1000 verdünnt) behandelt. Der Immunblot wurde anschließend mit einem zweiten HRP-gebundenen Ziegen-Antikörper (1:2000 verdünnt) inkubiert und mit ECL-Reagenz entwickelt. Anschließend wurde der Immunblot mit einem β-Aktin-Antikörper (1:6000 verdünnt) und Detektion durch einem entsprechenden HRP-gebundenen zweiten Maus-Antikörper (1:7000 verdünnt) erneut mit ECL-Reagenz entwickelt (unterer Blot). Zur Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-1-Antikörpers wurde auf der ersten Spur des Gels 20 ng humanes rekombinantes Galektin-1 aufgetragen. Ein Proteinstandard ist links markiert.

In Abbildung 10 ist der Nachweis von Galektin-3 in den verschiedenen Zelllinien dargestellt. Galektin-3 enthält 250 Aminosäuren und hat eine errechnete Molekularmasse von 26,152 kDa.

Galektin-3 erscheint im Immunblotverfahren, ähnlich wie Galektin-1, als Einzelbande. Gut nachweisbare Mengen Galektin-3 konnten in den Pankreaskarzinomzellen AsPc-1 und Capan-2 und in den Mamakarzinomzellen MCF-7 nachgewiesen werden. PANC-1- und HEK 293-Zellen exprimieren kein Galektin-3. Geringere und ungefähr gleiche Mengen Galektin-3 konnten in den Zellen MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1, Patu 8902, Patu 8988s und SW480 nachgewiesen werden. Die Pankreaskarzinomzellen Patu 8988t exprimieren nur eine geringe Menge Galektin-3.

Die Kontrolle der Spezifität des monoklonalen anti-Galektin-3 Antikörpers erfolgte durch den Nachweis von humanem rekombinantem Galektin-3, das auf der gleichen Höhe wie das endogene Galektin-3, bei 27 kDa, dargestellt werden konnte (Abb. 10, Spur 11).

Um die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung im Immunblot kontrollieren zu können, wurde der Blot anschließend mit einem anti- β -Aktin-Antikörper und dem entsprechenden HRP-gebundenen Maus-Antikörper behandelt. Ausgehend von einer gleichmäßigen β -Aktin-Verteilung in den Zellen, konnte eine, im Immunblot aufgetragene ungefähr gleiche Gesamtproteinmenge nachgewiesen werden. Gleiche Ergebnisse zur aufgetrennten Proteinmenge konnten durch die Färbung des Blots in einer 0,2 %igen PonceauS-Lösung nachgewiesen werden (Ergebnis nicht abgebildet).

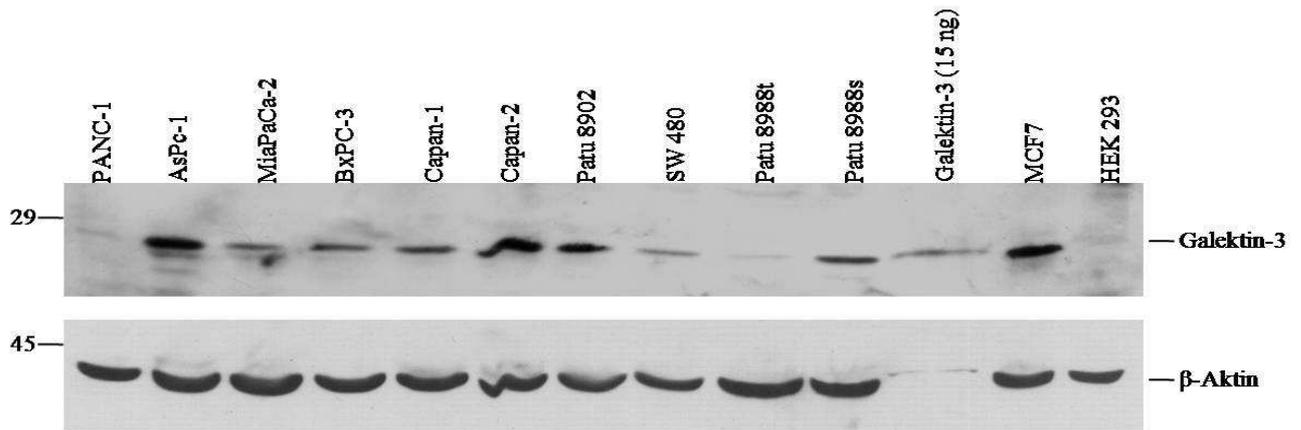


Abb. 10: Expression von Galektin-3 in verschiedenen Zelllinien: Die Pankreaskarzinomzellen PANC-1, AsPc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, Patu 8902, Patu 8988s, Patu 8988t, die Kolonkarzinomzellen SW480, die Mammakarzinomzellen MCF-7 und die embryonalen Nierenzellen HEK 293 (Spur 1-10, 12 und 13) wurden bis zu einer 80 %igen Konfluenz in Wachstumsmedium gezogen und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. Jeweils 50 μ g RIPA-Zelllysate wurden im Immunblotverfahren analysiert. Die Proteine des jeweiligen RIPA-Gesamtlysats wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion des Galektin-3 erfolgt durch Behandlung des Immunblots mit einem monoklonalen anti-Galektin-3-Antikörper (1:1000 verdünnt) und mit einem zweiten HRP-gebundenen Maus-Antikörper (1:2000 verdünnt) und der anschließenden Entwicklung mit ECL. Als nächstes wurde der Immunblot mit einem β -Aktin-Antikörper (1:6000 verdünnt) und Detektion durch einen entsprechenden HRP-gebundenen zweiten Maus-Antikörper (1:2000 verdünnt) erneut entwickelt (untere Blot). Zur Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-3-Antikörpers wurde in Spur 11 15 ng humanes rekombinantes Galektin-3 aufgetragen. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Als nächstes wurde die Proteinexpression von Galektin-8 in den verschiedenen Zellen untersucht. In Abbildung 11 ist der Nachweis der Proteinexpression von Galektin-8 in einem repräsentativen Immunoblot gezeigt. Galektin-8 konnte als Doppelbande in den meisten Zelllinien nachgewiesen werden. Auch in den AsPc-1- und Capan-1-Zellen konnte nach längerer Belichtungszeit die lange Isoform von Galektin-8 in Immunblotverfahren nachgewiesen werden (Spur 2 und 5). Lediglich in BxPC-3-Pankreaskarzinomzellen konnten

Galektin-8 nur als Einzelbande dargestellt werden. Die Galektin-8 Doppelbanden auf der Höhe von 36 bzw. 40 kDa entsprechen den durch PCR-Analyse nachgewiesenen cDNAs für zwei Galektin-8 Isoformen, Galektin-8 long und Galektin-8 short (siehe Kap. 4.2). Die Existenz der zwei Galektin-8 Isoformen in den Pankreaskarzinomzellen PANC-1, MiaPaCa-2, AsPc-1, BxPC-3, Capan-2, Patu 8902, Patu 8988s und Patu 8988t konnte auch in einer Arbeit in unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden („Charakterisierung des Einflusses von konstitutiv aktivem K-Ras(G12V) auf die Signaltransduktion und die Migration von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen“ Dissertation von Dr. rer. nat. Monika Unger). Zur einfacheren Beschreibung der zwei Galektin-8 Isoformen werden in dieser Arbeit die folgenden Begriffe verwendet: Galektin-8 short für die kurze Isoform des Galektin-8 mit einer berechneten Molekularmasse von ca. 35,826 kDa und Galektin-8 long für die lange Galektin-8 Isoform deren berechneten Molekularmasse 40,151 kDa beträgt. Das Immunblot in Abbildung 11 zeigt einen höheren Proteingehalt an Galektin-8 short als Galektin-8 long in jeder untersuchten Karzinomzelllinie. Die PANC-1-Zellen zeigen den größten Gehalt sowohl an Galektin-8 short als auch an Galektin-8 long. Geringere Mengen der zwei Proteine enthalten die Pankreaskarzinomzellen AsPc-1 und Capan-1. In den zwei nicht-Pankreaskarzinomzelllinien SW480 und MCF-7 konnte Galektin-8 ebenfalls als Doppelbande im Immunblotverfahren gezeigt werden. Die Nierenzellen HEK 293 weisen im Immunblot keine Galektin-8-Expression auf.

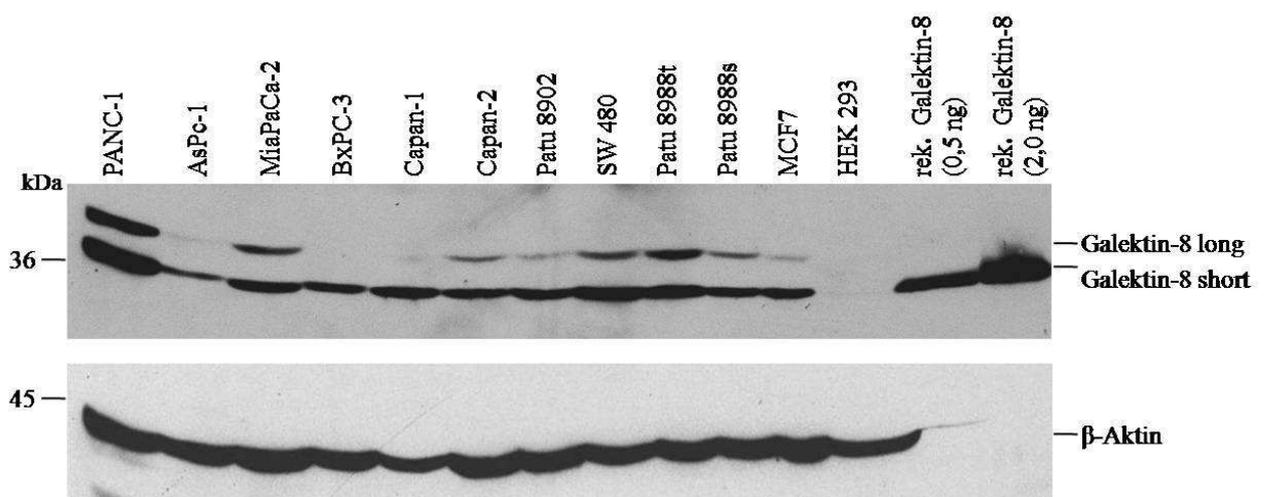


Abb. 11: Expression von Galektin-8 in verschiedenen Zelllinien: Die Karzinomzellen PANC-1, AsPc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, Patu 8902, Patu 8988s, Patu 8988t, SW 480, MCF7 und die Nierenzellen HEK 293 (Spur 1-12) wurden in Wachstumsmedium bis zu einer Konfluenz von 80 % inkubiert und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. Für die semi-quantitative Galektin-8 Proteinanalyse wurden 75 μ g von jedem RIPA-Zellysate in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion des Galektin-8 erfolgt durch

Behandlung des Immunblots mit einem monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörper (1:5000 verdünnt) und der anschließenden Inkubation mit einem entsprechenden HRP-gebundenen Maus-Antikörper. Die Entwicklung des Blots wurde mit ECL *Advance* durchgeführt. Der Immunblot wurde anschließend mit einem β -Aktin-Antikörper und Detektion durch einen HRP-gebundenen zweiten Maus-Antikörper erneut entwickelt (untere Blot). Zur Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-8-Antikörpers wurde auf den letzten zwei Spuren 0,5 ng und 2,0 ng vom humanen rekombinanten Galektin-8 aufgetragen. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Die Kontrolle der Spezifität des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers erfolgte durch den Nachweis des humanen rekombinanten Galektin-8. Das rekombinante Galektin-8 besteht aus 317 Aminosäuren und konnte im Immunblotverfahren auf einer Höhe von ca. 36 kDa identifiziert werden. Die Abbildung 11. zeigt dass das rekombinante Galektin-8 höher läuft als das endogene Galektin-8 short. Dieses Ergebnis konnte in allen Versuchen beobachtet werden und ist vermutlich auf die posttranslationäre Veränderung in der Zelle und die unterschiedliche Konformation des Galektin-8 short im Vergleich zu dem rekombinanten Galektin-8 zurückzuführen. Die gleichmäßige Proteinbeladung in den einzelnen Spuren des Immunblots wurde durch die anschließende Behandlung mit einem anti- β -Aktin-Antikörper und dem entsprechenden HRP-gebundenen Maus-Antikörper, Der Immunblot zeigt eine gleichmäßige Verteilung des aufgetrennten Proteine. Als weitere Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde der Immunblot mit einer 0,2 %igen PonceauS-Lösung gefärbt (Ergebnisse nicht abgebildet), die ebenfalls eine vergleichbare Proteinbeladung in allen Spuren zeigte.

Die Ergebnisse der Immunblotanalyse belegen, dass es deutliche Unterschiede in der Proteinexpression von Galektin-1, -3 und -8 in den verschiedenen Pankreaskarzinomzellen gibt. Außerdem konnte ein Unterschied in der Galektin-Expression in den Pankreaskarzinomzelllinien im Vergleich zu den nicht-Pankreaskarzinomzelllinien nachgewiesen werden.

3.1.2 Analyse der Proteinverteilung von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 nach subzellulären Fraktionierung

3.1.2.1 Subzelluläre Fraktionierung

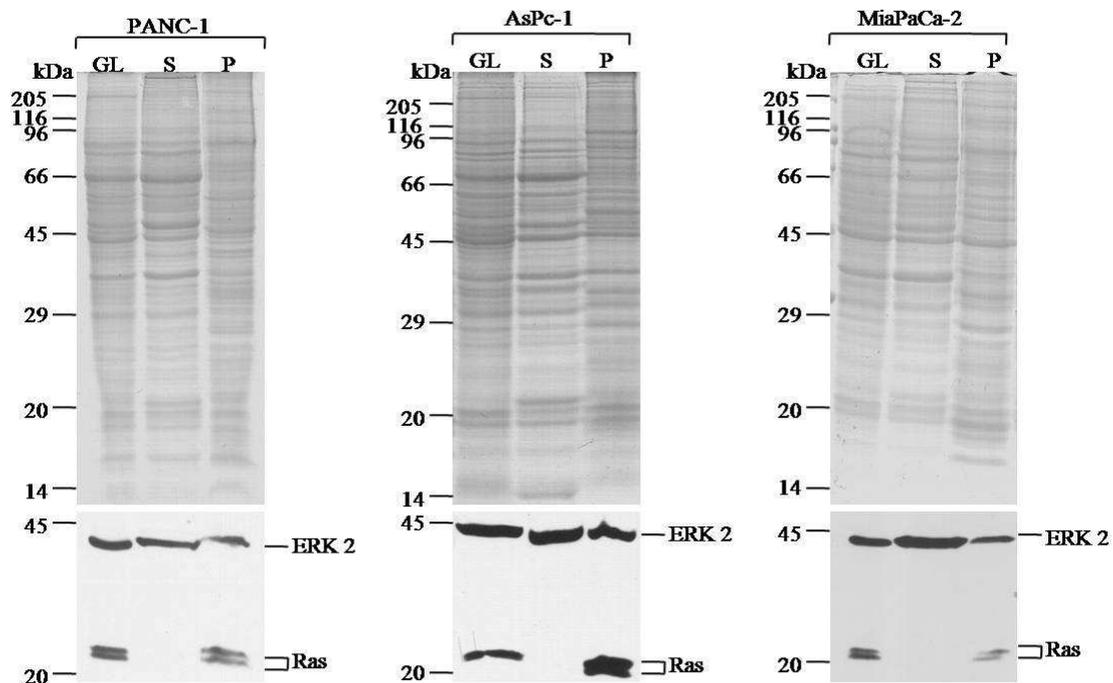
Um die subzelluläre Verteilung von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 in verschiedenen Pankreaskarzinomzellen untersuchen zu können, wurden die Lysate von Zellen der Zelllinien PANC-1, MiaPaCa2, AsPc-1, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, Patu 8902, Patu 8988s und Patu 8988t mittels Ultrazentrifugation in eine zytosolhaltigen Fraktion (S) mit löslichen Proteine und eine partikuläre, membranhaltigen Fraktion (P), getrennt. Von diesen Fraktionen wurden jeweils 50 µg im Immunblotverfahren analysiert. Subzelluläre Fraktionen von HEK 293-Nierenzellen, MCF-7-Mammakarzinom- und SW480-Mamakarzinomzellen wurden auf die gleiche Weise analysiert.

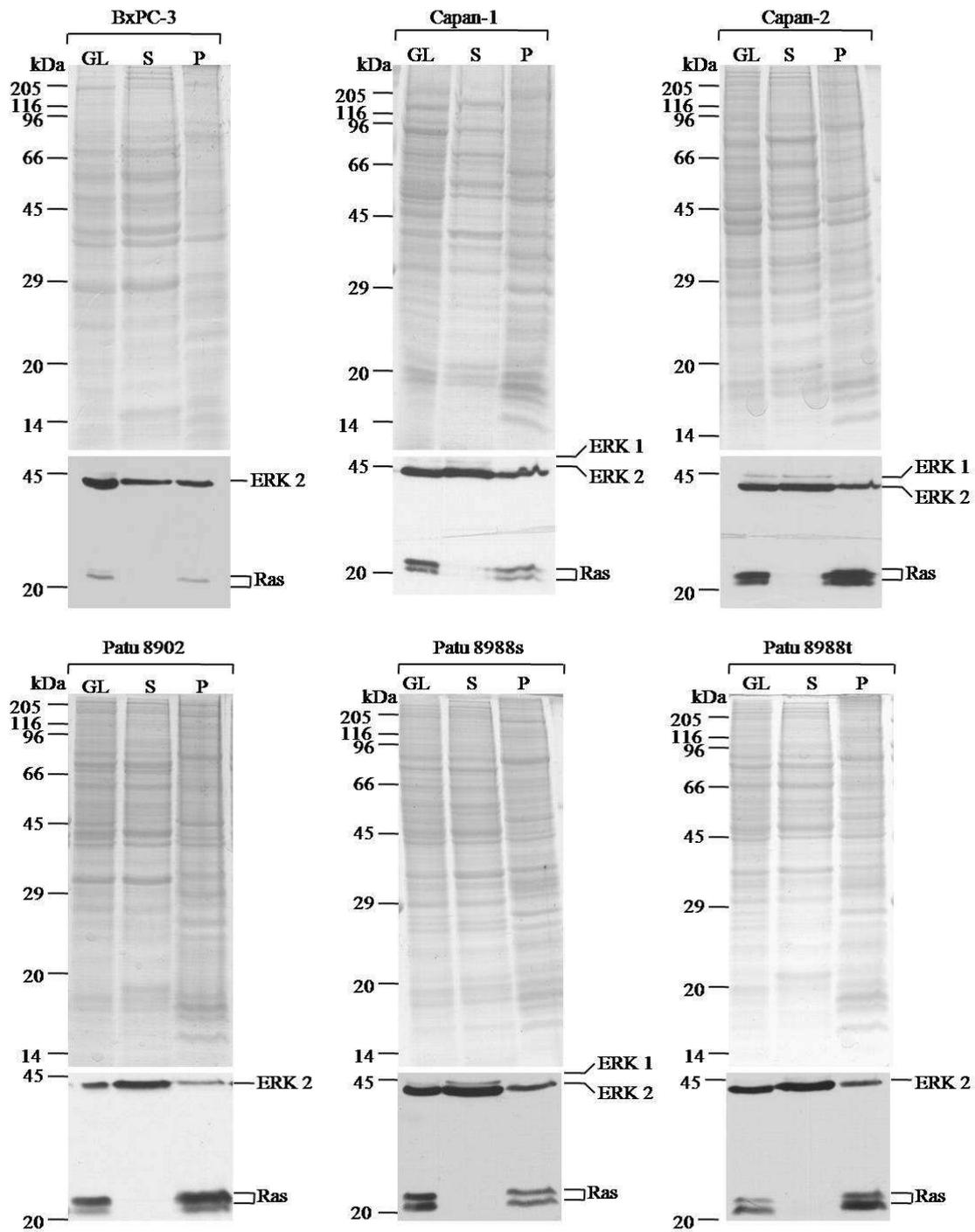
Um die Spezifität der Methode und Reinheit der einzelnen zytosol- und membranhaltigen Fraktionen kontrollieren zu können, wurden zunächst jeweils 50 µg des Gesamtlisat und der beiden subzellulären Fraktionen nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durch Coomassie-Blau-Färbung und im Immunblotverfahren analysiert. Die Coomassie-Blau-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte über Nacht unter leichtem Schütteln mit anschließender Entfärbung. Korrespondierende Immunblots wurden mit einem monoklonalen anti-Ras- und einem polyklonalen anti-ERK (*extracellular-signal regulated kinase*)-Antikörper und einem entsprechenden HRP-gebundenen zweiten Maus- bzw. - Kaninchen-Antikörper entwickelt. Die Proteine erscheinen im Immunblotverfahren als Banden auf der Höhe von 42 kD bzw. 44 kD für ERK2 und ERK1 und auf der Höhe von ca. 21 kD für Ras. Vorausgesetzt, dass sich ERK1 bzw. ERK2 sowohl im zytosolhaltigen als auch in der membranhaltigen Fraktion und Ras nur in der membranhaltigen Fraktion befinden (Shirakata *et al.*, 1999; Giehl, 2005), kann von einer hohen Spezifität der Methode und damit einer hohen Reinheit der erhaltenen Fraktionen ausgegangen werden. Der polyklonale anti-ERK 2-Antikörper, der aufgrund einer Kreuzreaktivität auch ERK 1 erkennt, detektiert spezifisch das in dem Gesamtlisat und in den zwei subzellulären Fraktionen enthaltene ERK 2 und ERK 1. Deshalb erscheint ERK im Immunblotverfahren in einigen Zellen der Zelllinien als Doppelbande für ERK1/2.

Die Abbildung 12 zeigt abwechselnd die mit Coomassie-Blau gefärbten Gele sowie im Immunblotverfahren den ERK 1-, ERK 2- bzw. Ras-Nachweis in den membranhaltigen und zytosolhaltigen Fraktionen und im Gesamtlisat. Im Coomassie-Gel erscheinen die

Proteinbanden in den drei Spuren unterschiedlich, da der qualitative Proteingehalt des Gesamtlysats und der zwei Fraktionen unterschiedlich ist. Die dazu entsprechenden Blots zeigen in der zytosolhaltigen Fraktion (S) einen eindeutigen Nachweis des ERK als Einzel- (ERK2) oder als Doppelbande (ERK1 und ERK2). Die Pankreaskarzinomzellen Capan-1, Capan-2 und Patu 8988s und die HEK 293-Nierenzellen weisen die für ERK1/ERK2 typische Doppelbande auf. Das Ras-Protein konnte in allen untersuchten Zelllinien als Doppelbande nachgewiesen werden. Lediglich in den MCF-7-Mammakarzinomzellen konnte Ras im Immunblotverfahren als Einzelbande dargestellt werden. Der verwendete Ras-Antikörper identifiziert im Immunblotverfahren verschiedene Ras-Isoformen, die auf unterschiedliche Höhen nachweisbar sind. Außerdem treten die Ras-Isoformen in der Zelle in prenylierten und nicht-prenylierten Form auf, die unterschiedliche Molekularmassen aufweisen. Die Prenylierung des C-terminalen Endes der Ras-Proteine ermöglicht die bevorzugte Lokalisation der Proteine an der Membran.

Die membranhaltige Fraktionen (P) der untersuchten Zellen dagegen enthalten sowohl ERK 1 bzw. ERK2 als auch Ras. Im Gesamtlysat aller Zelllinien konnten ERK 1 bzw. ERK 2 und Ras nachgewiesen werden.





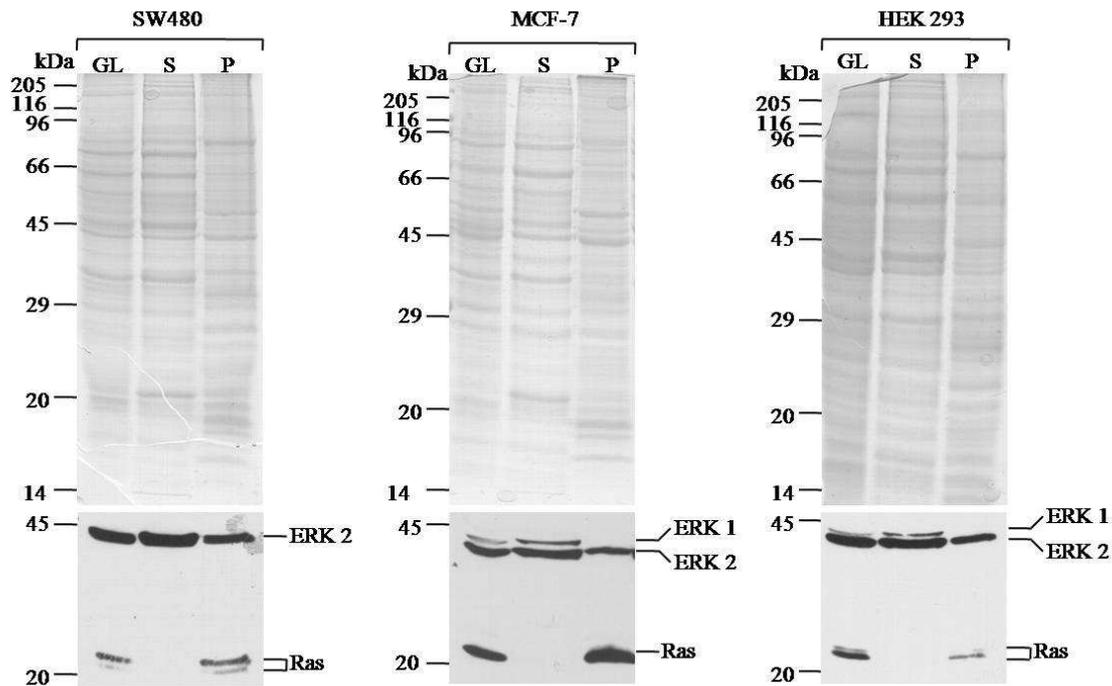


Abb. 12 Kontrolle der Präparation der zytosol- bzw. membranhaltigen Fraktionen im Coomassie-Gel und im Immunblotverfahren: Die Zellen der Zelllinien PANC-1, AsPc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, Patu 8902, Patu 8988s, Patu 8988t, SW 480, MCF7, HEK 293 wurden bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium gezogen und anschließend zur Präparation des Gesamtlysates in RIPA-Puffer lysiert, die unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Die zytosol (S)- bzw. membranhaltigen (P) Fraktionen wurden durch Lysieren der Zellen in HEPES-Puffer und Ultrazentrifugieren erhalten. Von jedem Gesamtlysate (GL) und den zwei subzellulären Fraktionen wurden jeweils 50 µg Protein durch Coomassie-Färbung (oben) und im Immunblotverfahren (unten) untersucht. Dazu wurden diese in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel nebeneinander aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem monoklonalen anti-Ras- und einem polyklonalen anti-ERK-Antikörper und einem entsprechenden HRP-gebundenen Maus- bzw. Kaninchen-Antikörper behandelt. Anschließend wurde der Immunblot durch Detektion mit ECL entwickelt. Die Coomassie-Blau-Färbung der 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgels erfolgte über Nacht unter leichtem Schütteln mit anschließender Entfärbung. Ein Proteinstandard ist links markiert.

3.1.2.2 Subzelluläre Verteilung von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8

Das Ziel der im folgenden Kapitel beschriebenen Versuche war die Untersuchung der subzellulären Verteilung der drei Galektine in den verschiedenen Pankreaskarzinom-, Mammakarzinom-, Kolonkarzinom- und Nierenzellen. Diese Versuche sollten Hinweise auf möglichen Funktionen der Galektine in den verschiedenen zellulären Kompartimenten geben. Hierzu wurden je 50 µg Protein des Gesamtlysates, der löslichen und der partikulären Fraktion in 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf

Nitrozellulosemembran übertragen. Durch die Behandlung mit den entsprechenden Antikörpern für Galektin-1, Galektin-3 bzw. Galektin-8 und entsprechenden HRP-gebundenen zweiten Antikörper, wurden die unten abgebildeten Immunblots erhalten.

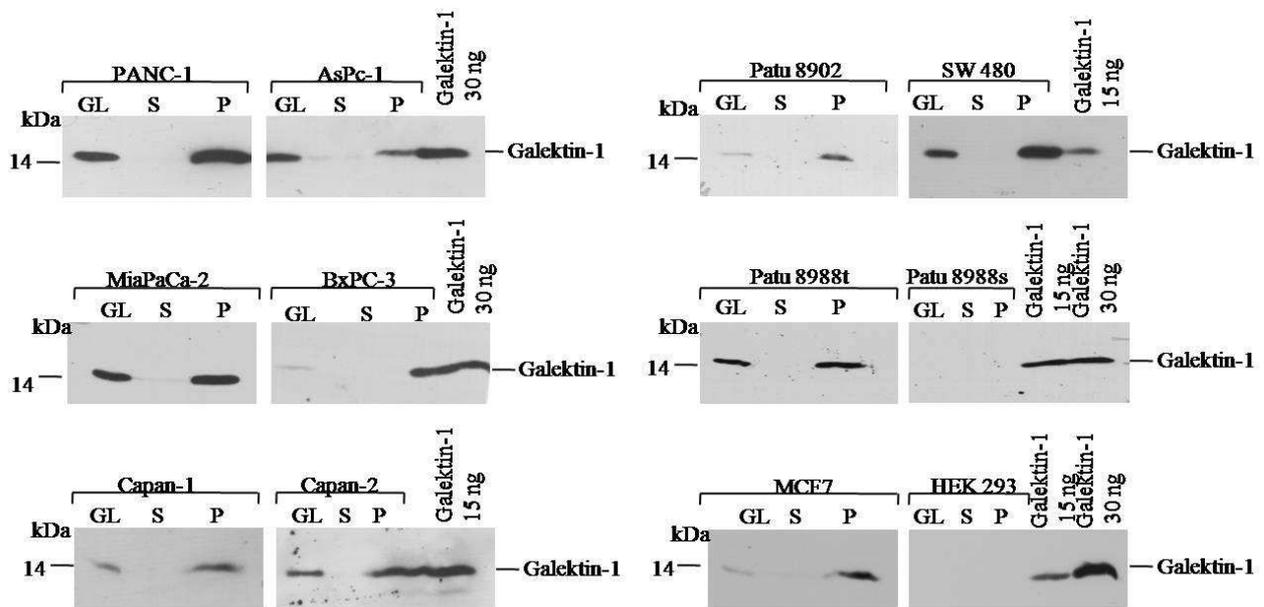


Abb. 13.: Die subzelluläre Verteilung von Galektin-1 in verschiedenen Zelllinien: Die Zellen der Zelllinien PANC-1, AsPc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, Patu 8902, SW480, Patu 8988t, Patu 8988s, MCF-7 und HEK 293 wurden bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium gezogen und zur Präparation des Gesamtlysats (GL) in RIPA-Puffer lysiert. Durch Lysieren der Zellen in HEPES-Puffer und Ultrazentrifugation bei 100000 x g wurde der Zellextrakt in eine zytosolhaltige (S) und einer membranhaltigen (P) Fraktion aufgetrennt. Von jedem Gesamtlysat und den subzellulären Fraktionen wurden jeweils 50 µg im Immunblotverfahren analysiert. Zur Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-1-Antikörpers wurde 15 bzw. 30 ng humanes rekombinantes Galektin-1 in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis von Galektin-1 erfolgte mit einem polyklonalen anti-Galektin-1-Antikörper und einem HRP-gebundenen Ziegen-Antikörper. Der Immunblot wurde durch Detektion mit ECL Reagenz entwickelt. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Die Blots in Abbildung 13 zeigen den Nachweis des Galektin-1 im Gesamtlysat und der membranhaltigen bzw. zytosolhaltigen Fraktion in den untersuchten Zellen. Endogenes Galektin-1 konnte ausschließlich in der membranhaltigen Fraktion nachgewiesen werden. In der zytosolhaltigen Fraktion der untersuchten Zelllysate konnte kein Galektin-1 nachgewiesen werden.

Zur Kontrolle der Spezifität des polyklonalen anti-Galektin-1-Antikörpers wurden 15 ng bzw. 30 ng humanes rekombinantes Galektin-1 in demselben SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Humanes rekombinantes Galektin-1 hat ein Molekulargewicht von 14 kDa und konnte im Immunblotverfahren als Bande auf der gleichen Höhe mit dem endogenen Galektin-1 nachgewiesen werden.

In den Lysaten der HEK 293-Nierenzellen und der Pankreaskarzinomzellen Patu 8988s konnte kein Galektin-1 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen des Galektin-1 in den RIPA-Gesamtlysaten überein (siehe Kap. 4.1.1).

Als nächstes wurde die Verteilung des Galektin-3 in der zytosol- bzw. membranhaltigen Fraktion der verschiedenen Pankreaskarzinom- bzw. Mammakarzinom-, Kolonkarzinom- bzw. Nierenzellen untersucht. Für diese Experimente wurden jeweils 50 µg der zytosol- bzw. membranhaltigen Fraktionen und des Gesamtlysats wie für Galektin-1 beschrieben im Immunblotverfahren analysiert. Die Immunblots wurden mit einem monoklonalen anti-Galektin-3-Antikörper und einem HRP-gebundenen Maus-Antikörper behandelt und durch Detektion mit ECL entwickelt.

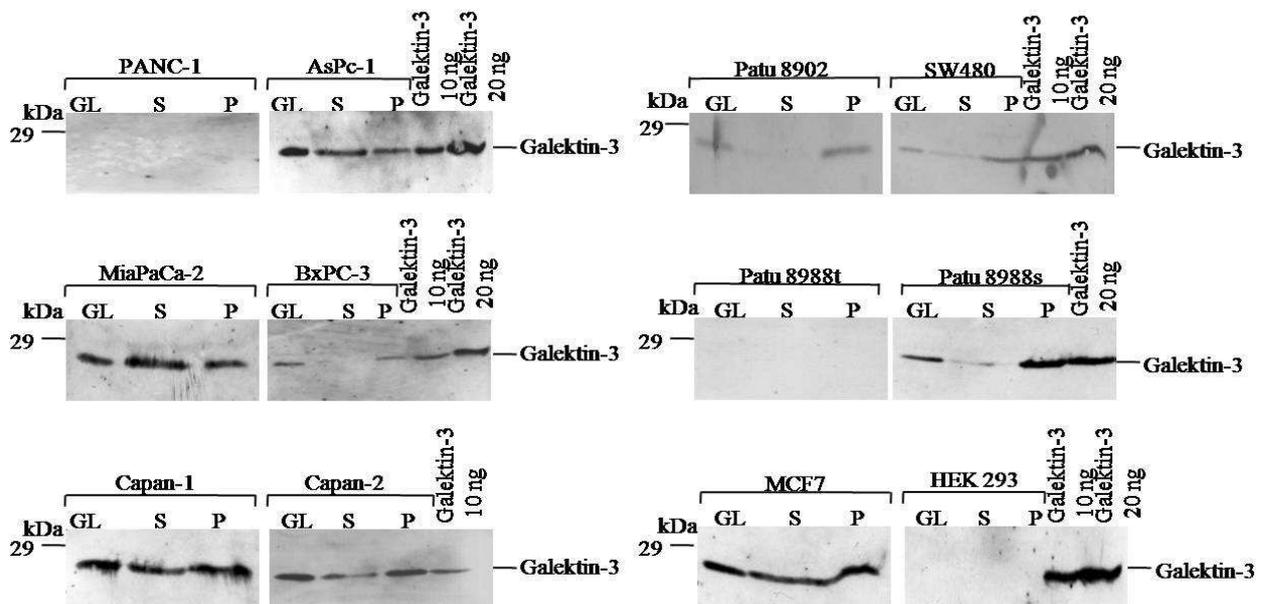


Abb. 14: Die subzelluläre Verteilung von Galektin-3 in verschiedenen Zelllinien: Die Pankreaskarzinomzellen PANC-1, AsPc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, Patu 8902, Patu 8988t und Patu 8988t, die Mammakarzinomzellen MCF-7 und die Kolonkarzinomzelle SW480 und die HEK 293-Nierenzellen wurden bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium gezogen und zur Gewinnung des Gesamtlysates in RIPA-Puffer lysiert. Durch das Lysieren der Zellen im HEPES-Puffer und anschließender Ultrazentrifugation wurden die Lysate in einer zytosolhaltige (S)- und einer membranhaltige (P) Fraktion aufgetrennt. Von dem Gesamtlysate (GL) und den zytosol- bzw. membranhaltigen Fraktionen wurden jeweils 50 µg im

Immunblotverfahren analysiert. Zur Kontrolle der Spezifität des Antikörpers wurden je 10 bzw. 20 ng humanes rekombinantes Galektin-3 im Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgels wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert und mit einem monoklonalen anti-Galektin-3-Antikörper und einem HRP-gebundenen zweiten anti-Maus-Antikörper behandelt. Der Immunblot wurde durch Detektion mit ECL-Reagenz entwickelt. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Die Blots in Abbildung 14 zeigen, dass endogenes Galektin-3 in den Pankreaskarzinomzellen Patu 8902 und BxPC-3 ausschließlich in der membranhaltigen Fraktion nachweisbar ist. In der zytosolhaltigen Fraktion dieser Zellen konnte kein Galektin-3 nachgewiesen werden. Nur kleine Mengen Galektin-3 konnten in der zytosolhaltigen Fraktion der Patu 8988s- und SW480-Lysate detektiert werden. Darüber hinaus zeigen die Analysen, dass die Lysate der PANC-1- und HEK 293-Zellen kein Galektin-3 enthalten.

Die abgebildeten Immunblots in Abbildung 14 zeigen eine relativ gleichmäßige Verteilung des Galektin-3 sowohl in der löslichen als auch in der partikulären Fraktion der Pankreaskarzinomzellen AsPc-1, MiaPaCa-2, Capan-1, Capan-2 und der Mammakarzinomzellen MCF-7.

Die Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-3-Antikörpers wurde durch den Nachweis des humanen rekombinanten Galektin-3 im Immunblotverfahren ermöglicht. Das rekombinante Galektin-3 hat ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa und konnte im Immunblotverfahren als Bande auf der gleichen Höhe wie das in den Zellen enthaltene endogene Galektin-3 nachgewiesen werden.

Die nächsten Versuche hatten das Ziel die subzelluläre Proteinverteilung des Galektin-8 in den untersuchten Zellen zu bestimmen. Dazu wurden, wie für die Versuche mit Galektin-1 und Galektin-3, je 50 µg vom Gesamtlisat und von der membranhaltigen bzw. zytosolhaltigen Fraktion im Immunblotverfahren analysiert. Zur Kontrolle der Spezifität des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers wurden 0,25 - 0.5 ng humanes rekombinantes Galektin-8 verwendet. Die Proteine wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde der Immunblot mit einem monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörper und anschließend mit einem entsprechenden HRP-gebundenen Maus-Antikörper behandelt. Die Detektion erfolgte durch Entwicklung mit ECL *Advance*.

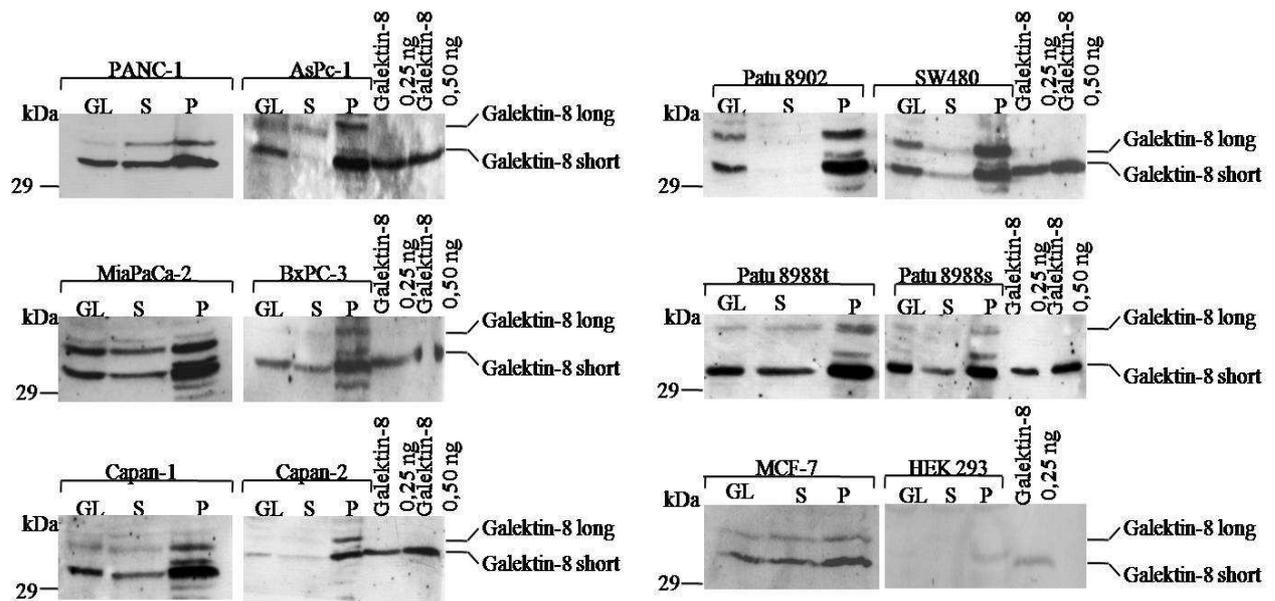


Abb. 15: Die subzelluläre Verteilung von Galektin-8 in verschiedenen Zelllinien: Die Zellen der Zelllinien PANC-1, AsPc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, Patu 8902, SW480, Patu 8988t, Patu 8988t, MCF7, HEK 293 wurden bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium gezogen und zur Gewinnung des Gesamtlisates in RIPA-Puffer lysiert. Durch die anschließende Zentrifugation des Lysats konnten die unlöslichen Bestandteile getrennt werden. Für die Auftrennung des Lysats in eine löslichen (S) bzw. partikulären (P) Fraktion wurden die Zellen in HEPES-Puffer lysiert und durch Ultrazentrifugation gereinigt. Von dem Gesamtlisat (GL) und den zwei Fraktionen wurden jeweils 50 µg im Immunblotverfahren analysiert. Die Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-8-Antikörpers wurden 0,25 ng bzw. 0,50 ng humanes rekombinantes Galektin-8 aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgels wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörper bzw. einem entsprechenden HRP-gebundenen zweiten Maus-Antikörper behandelt. Der Immunblot wurde durch Detektion mit ECL Reagenz entwickelt. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Das Galektin-8 konnte im Immunblotverfahren als Doppelbande nachgewiesen werden. Dieses deutet entweder auf zwei Spleiß-Varianten oder auf unterschiedlich modifizierte Formen von Galektin-8 hin. Die zwei auf dem Immunblot nachgewiesenen Galektin-8-Proteine haben ein apparentes Molekulargewicht von 36 kDa und 40 kDa. Um die Benennung der zwei Proteine zu erleichtern und eine Verwechslung zu vermeiden wurde das im Immunblotverfahren nachgewiesene Galektin-8 mit einem Molekulargewicht von 36 kDa als Galektin-8 short und das Protein mit einem Molekulargewicht von 40 kDa als Galektin-8 long bezeichnet.

Die Abbildung 15 zeigt die Verteilung der Galektin-8 Subtypen in den subzellulären Kompartimente der untersuchten Zellen. Die oberen Immunblots zeigen eine prädominante Verteilung der endogenen Galektin-8 Subtypen in der membranhaltigen Fraktion. In der

zytosolhaltigen Fraktion konnte wenig oder kein endogenes Galektin-8 nachgewiesen werden. Während die BxPC-3-Zellen kein Galektin-8 long enthalten, konnte in allen anderen Zellen sowohl Galektin-8 long als auch Galektin-8 short nachgewiesen werden. Die lösliche und partikuläre Fraktion der untersuchten Zellen enthalten mehr Galektin-8 short als Galektin-8 long. Eine starke Galektin-8 long und Galektin-8 short Expression konnte in den Zellen der Zelllinien PANC-1, MiaPaCa-2, SW 480, Patu 8902 und Patu 8988t nachgewiesen werden. Außerdem zeigen die Versuche einen hohen Gehalt an Galektin-8 long in PANC-1-, MiaPaCa-2- und Patu 8988t-Zellen. Geringere Mengen an Galektin-8 long konnten in den Zellen der Zelllinien AsPc-1 und BxPC-3 nachgewiesen werden. Galektin-8 long konnte nur in der membranhaltigen Fraktion der BxPC-3-Zellen nachgewiesen werden. Im Gesamtlysat und in der zytosolhaltigen Fraktion konnte kein Galektin-8 long nachgewiesen werden. HEK 293-Nierenzellen enthalten weder Galektin-8 long noch Galektin-8 short. Zur Kontrolle der Spezifität des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers erfolgte der Nachweis des ca. 36 kDa großen humanen rekombinanten Galektin-8 im selben Immunblot.

3.1.3 Quantifizierung der Proteinexpression von Galektin-1, -3 und -8 im Gesamtlysat der Zelllinien

Um die Galektin-Expression in den Zellen der Zelllinien genauer vergleichen zu können wurden mit Hilfe der *Software* ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics, GE Healthcare, Freiburg) die einzelnen Banden, die im Immunblotverfahren nachgewiesen werden konnten, abhängig von deren Fläche und Farbintensität im Vergleich zu einer Kontrollbande, die einer bekannten Menge humanen rekombinanten Galektin entspricht, quantifiziert. Aus dieser Auswertung von mindestens drei unterschiedlichen Immunblotsanalysen konnte eine Angabe bezüglich des Galektingehalts der Zellen der untersuchten Zelllinien gemacht werden. Da Galektin-8 als Doppelbande, entsprechend Galektin-8 long und Galektin-8 short, im Immunblotverfahren erscheint, wurde jede Bande einzeln quantifiziert und anschließend der Gesamtgehalt berechnet. Die untere Tabelle stellt die Ergebnisse der Quantifizierung dar.

Tabelle 17: Densitometrische Analyse der Galektingehalte in den untersuchten Zelllinien:

Abkürzungen: S [Galektin-8 short (kurze Isoform)], L [Galektin-8 long (lange Isoform)].

Zellen		Galektin-8		Galektin-1	Galektin-3
		ng/ μ g RIPA-Lysat		ng/ μ g RIPA-Lysat	ng/ μ g RIPA-Lysat
		Isoform	Gesamt		
PANC-1	L	0,0050	0,0170	0,510	0,00
	S	0,0120			
AsPc-1	L	0,0005	0,0033	0,304	0,419
	S	0,0028			
MiaPaCa-2	L	0,0033	0,0093	0,851	0,293
	S	0,0060			
BxPC-3	L	0,00	0,0053	0,109	0,339
	S	0,0053			
Capan-1	L	0,0010	0,0054	0,050	0,245
	S	0,0044			
Capan-2	L	0,0018	0,0079	0,130	0,476
	S	0,0061			
Patu 8902	L	0,0014	0,0064	0,068	0,026
	S	0,0050			
Patu 8988t	L	0,0033	0,0083	0,413	0,079
	S	0,0050			
Patu 8988s	L	0,0022	0,0076	0,00	0,325
	S	0,0054			
SWR480	L	0,0024	0,0118	0,494	0,234
	S	0,0094			
MCF-7	L	0,0009	0,0064	0,189	0,383
	S	0,0055			
HEK 293	L	0,00	0,00	0,00	0,00
	S	0,00			

Die obere Tabelle zeigt den Gehalt an Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 long und Galektin-8 short in den RIPA-Gesamtlysaten der untersuchten Zellen.

Galektin-1 konnte, wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, in den verschiedenen Zellen als Einzelbande nachgewiesen werden. In den Nierenzellen HEK 293 und den Pankreaskarzinomzellen Patu 8988s konnte keinen Galektin-1 nachgewiesen werden. Alle anderen untersuchten Zellen enthalten Galektin-1. Den größten Gehalt an Galektin-1 konnte in den PANC-1-, MiaPaCa-2- und den SW480-Zellen gezeigt werden.

Galektin-3 konnte ebenfalls als Einzelbande im Immunblotverfahren nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass PANC-1- und HEK 293- Zellen kein Galektin-3 exprimieren. Die Pankreaskarzinomzellen AsPc-1, Capan-2 und Patu 8988s weisen dagegen einen hohen Gehalt an Galektin-3 auf.

Galektin-8 konnte im Immunblotverfahren als Doppelbande nachgewiesen werden. Diese Banden wurden zunächst einzeln quantifiziert und anschließend der Gesamtgehalt berechnet. Die obere Tabelle zeigt den Gehalt an Galektin-8 long und Galektin-8 short im RIPA-

Gesamtlysat in den verschiedenen Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass der Galektin-8 long-Gehalt in den Zellen immer kleiner ist als der Galektin-8 short-Gehalt. In den Zellen der BxPC-3-Zelllinie konnte kein Galektin-8 long nachgewiesen werden. Die HEK 293-Nierenzellen enthalten weder Galektin-8 long noch Galektin-8 short.

Die Quantifizierung der einzelnen Banden, die im Immunblotverfahren nachgewiesen werden konnten, hat wichtige Informationen über die Verteilung der drei untersuchten Galektine gebracht. Gezeigt werden konnte, dass einige Zelllinien sowohl Galektin-1, Galektin-3 als auch Galektin-8 long und Galektin-8 short exprimieren, während andere Zellen nur zwei der drei Galektine enthalten. In den embryonalen Nierenzellen HEK 293 konnte weder Galektin-1, Galektin-3 noch Galektin-8 long oder Galektin-8 short nachgewiesen werden.

3.2 Analyse der kodierenden DNA des Galektin-8 mittels PCR in unterschiedlichen Zelllinien

Da Galektin-8 im Immunblotverfahren als Doppelbande nachgewiesen werden konnte, die auf Spleiß-Varianten oder unterschiedlich modifizierte Formen des Proteins hindeuteten, war das Ziel der nächsten Versuche die Galektin-8 cDNA mittels PCR zu analysieren, um einen Hinweis über die Identität dieser zwei Galektin-8-Banden zu erhalten.

Für die cDNA-Analyse des Galektin-8 wurden 5 Pankreaskarzinomzelllinien ausgewählt. Die drei Zelllinien PANC-1, MiaPaCa-2 und Patu 8988t weisen im Immunblotverfahren eine deutliche Expression der zwei Galektin-8-Proteine, Galektin-8 long und Galektin-8 short auf. In Lysaten von AsPc-1- und Patu 8902-Zellen konnten nur geringe Mengen Galektin-8 long nachgewiesen werden. Galektin-8 short konnte in allen 5 Pankreaskarzinomzellen im Immunblotverfahren identifiziert werden. Zusätzlich wurde auch die Kolonkarzinomzellen SW480, die im Immunblotverfahren eine Galektin-8-Doppelbande aufweisen, in die Versuchsreihe eingeschlossen.

Um nachweisen zu können, ob es sich hier um zwei verschiedene Isoformen des Galektin-8 handelt, wurden mittels PCR die cDNAs vom Galektin-8 amplifiziert. Das Galektin-8-Gen befindet sich auf Chromosom 1(1q42-q43). Nach der Isolierung von mRNA und der Umschreibung der mRNA in cDNA, wurden die zwei Primer, Galektin-8 RT-PCR KL1 und KL2 für die PCR verwendet. Das Enzym DNA-Polymerase amplifiziert in Gegenwart von Desoxynukleotiden (dNTPs) ein definiertes DNA-Segment, das durch die Bindung von zwei Primern an komplementäre Sequenzen begrenzt wird. Um Kontaminationen der Lösungen mit

Fremd-DNA auszuschließen, wurde bei jeder durchgeführten PCR eine Negativ-Kontrolle ohne cDNA mitgeführt (nicht abgebildet). Nach Beendigung der PCR wurden die Ansätze in einem 1 %igen (m/V) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die amplifizierten DNA-Fragmente unter UV-Beleuchtung analysiert.

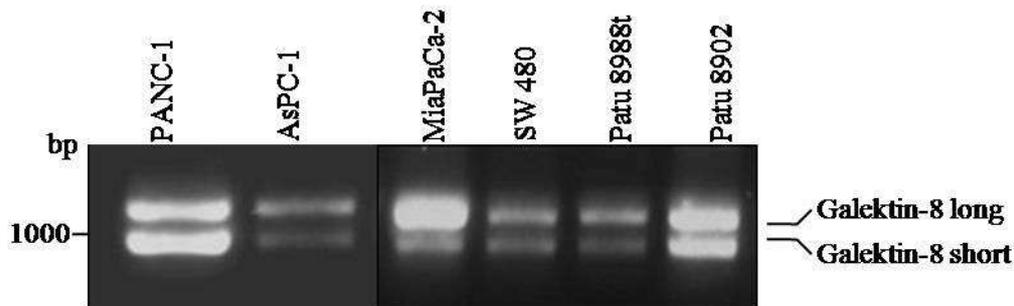


Abb. 16: Amplifizierung der kodierenden DNA des Galektin-8 in 5 verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien und SW480 Kolonkarzinomzellen: Die cDNA der untersuchten Karzinomzellen (von links nach rechts: PANC-1, AsPc-1, MiaPaCa-2, SW480 Patu 8988t und Patu 8902) wurde mittels PCR amplifiziert. Nach Beendigung der PCRs wurde 1/5 der PCR-Ansätze in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Beleuchtung analysiert. Ein DNA-Standard wurde links markiert. (Abkürzungen: bp = Basenpaare)

Die Abbildung 16 zeigt einen Ausschnitt aus einem exemplarischen Agarosegel in dem die durch PCR erhaltene DNA-Produkte, mit einer Größe von ca. 980 bp und 1100 bp, aufgetrennt wurden. In den 6 Zelllinien konnten zwei Galektin-8-cDNAs nachgewiesen werden. Um die cDNAs weiter zu analysieren, wurden die Banden der einzelnen Galektin-8-Varianten aus dem Agarosegel extrahiert. Zur Identifizierung der Identität der zwei Banden wurde die Sequenz der Galektin-8 cDNA-Varianten bestimmt.

Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit Sequenzen in den Nukleotiden-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) und publizierten Sequenzen (Su *et al.*, 1996; Cueni und Detmar, 2009) konnten zwei Varianten des Galektin-8 identifiziert werden. Die zwei Varianten des Galektin-8 entsprechen der Transkriptvariante 1 für die lange Galektin-8 long Isoform (NCIB Referenzsequenz NM_006499.3) und der Transkriptvariante 2 für die kurze Galektin-8 short Isoform (NCIB Referenzsequenz NM_201543.1). In allen 6 untersuchten Zelllinien konnten dieselben Transkriptvarianten 1 und 2 identifiziert werden.

Die Galektin-8 long-cDNA (NCIB Referenzsequenz NM_006499.3) besteht vom ATG-Translationsstart bis zum TAG Stopp-Codon aus 1145 Basenpaaren, die für 359 Aminosäuren kodieren. Im Anhang wurde die Nukleotidsequenz der Galektin-8 long-cDNA dargestellt.

Die Galektin-8 short-cDNA (NCIB Referenzsequenz NM_201543.1) besteht vom ATG-Translationsstart bis zum TAG Stopp-Codon aus 956 Basenpaaren, die für 317 Aminosäuren kodieren. Die Nukelotidsequenz der Galektin-8 short-cDNA wurde im Kapitel 7.1 dargestellt. Die Abbildung 17 zeigt die Proteinsequenzen von Galektin-8 long und Galektin-8 short im Vergleich.

```

mmlslnnlqn iiynpvipfv gtipdqldpg tlvirghvp sdadrfqvdl qngssvkpra
mmlslnnlqn iiynpvipfv gtipdqldpg tlvirghvp sdadrfqvdl qngssmkpra

dvafhfnprf kragcivcnt linekwgree itydtpfkre ksfeivimvl kdkfqvavng
dvafhfnprf kragcivcnt linekwgree itydtpfkre ksfeivimvl kdkfqvavng

khtllyghri gpekidtlgi ygvnihsig fsfssdlqst qassleltei srenvpksgt
khtllyghri gpekidtlgi ygvnihsig fsfssdlqst qassleltei srenvpksgt

pqlpsnrggd iskiaprtvy tkskdstvnh tltctkippm nyvskslpfa arlntpmgpg
pql----- ----- ----- -----rlpfa arlntpmgpg

rtvvvkgevn anaksfnvdl lagkskdial hlnprlnika fvrnsflqes wgeeernits
rtvvvkgevn anaksfnvdl lagkskdial hlnprlnika fvrnsflqes wgeeernits

fpfspgmyfe miicydvref kvavngvhs l eykhrfkels sidtleingd ihllevrsw
fpfspgmyfe miicydvref kvavngvhs l eykhrfkels sidtleingd ihllevrsw

```

Abb. 17: Vergleich der Aminosäuresequenz von Galektin-8 long und Galektin-8 short: Galektin-8 long (jeweils die obere Zeile - rote Schrift) ist aus 359 Aminosäuren gebildet. Das Galektin-8 short dagegen besteht nur aus 317 Aminosäuren (jeweils die untere Zeile - schwarze Schrift). Der Unterschied zwischen den beiden Sequenzen befindet sich zwischen der Aminosäure 112 und 153 in der Sequenz des Galektin-8 long (grüne Schrift), die in der Aminosäuresequenz von Galektin-8 short fehlt. Die gelbe Markierung weist auf den Aminosäureaustausch hin. Die Proteinsequenz von Galektin-8 long unterscheidet sich von der publizierten Proteinsequenzen nur durch zwei Aminosäureaustausche: an Position 56 wurde Valin durch Methionin und an Position 229 wurde Serin durch Arginin ersetzt. Galektin-8 short zeigt keinen Unterschied im Vergleich zu den publizierten Sequenzen.

Vergleicht man die Aminosäuresequenz von Galektin-8 long und mit Galektin-8 short kommt man zu folgenden Erkenntnissen. Galektin-8 long ist um 42 Aminosäuren länger als Galektin-8 short. Die fehlenden Aminosäuren in der Proteinsequenz des Galektin-8 short befinden sich zwischen Aminosäure 186 und Aminosäure 228 der Galektin-8 long-

Proteinsequenz. Weitere Unterschiede in der Proteinsequenz des Galektin-8 long short sind einzelne Aminosäureaustausche. Das Valin an Position 56 des Galektin-8 long wird in Galektin-8 short durch Methionin ersetzt. Das Serin an Position 229 in Galektin-8 long ist in Galektin-8 short durch ein Arginin ausgetauscht. Die Proteinsequenz von Galektin-8 short entspricht den publizierten Sequenzen und weist keine Unterschiede auf. Die Aminosäureaustausche in Galektin-8 long deuten entweder auf Punktmutation oder einen Fehler bei der Sequenzierung hin. Da die unter der NCIB Referenzsequenz NM_006499.3 publizierten Galektin-8 long-Proteinsequenz an der 56-ten Stelle ein Methionin und an der 226-ten Stelle ein Arginin aufweisen, handelt es sich bei den festgestellten Veränderungen vermutlich um Fehler bei der Amplifizierung oder Sequenzierung der Galektin-8 long cDNA-Sequenzen.

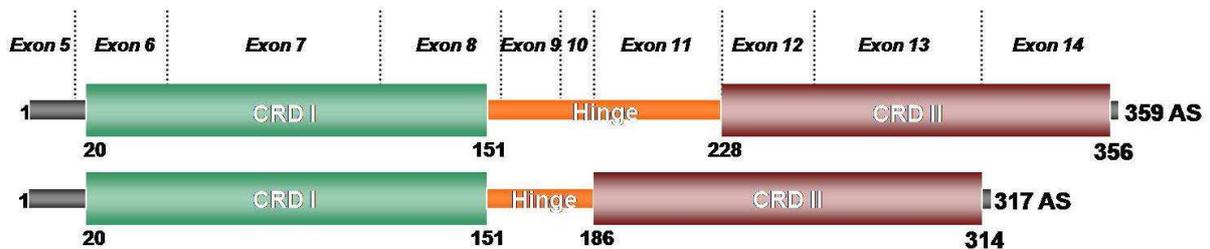


Abb. 18: Schematische Darstellung der Protein- und cDNA-Struktur von Galektin-8 long und Galektin-8 short: Galektin-8 besteht aus zwei CRDs (*carbohydrate-recognition domains*) (grün: CRDI; violett: CRDII) verbunden durch eine aus 77 (für Galektin-8 long, obere Darstellung) bzw. 35 (für Galektin-8 short, untere Darstellung) Aminosäuren bestehenden Aminosäurekette (*Hinge*: orange dargestellt). Die fehlenden Aminosäuren in der Sequenz des Galektin-8 short befinden sich zwischen den Aminosäuren 186 und 228 in der Sequenz des Galektin-8 long. Auf cDNA-Ebene entspricht diese Aminosäurekette dem Exon 11.

Die Abbildung 18 zeigt die schematische Darstellung der Protein- bzw. cDNA-Struktur der zwei Galektin-8-Isoformen bzw. -Genvarianten. Das Galektin-8 gehört zu der Gruppe der *tandem repeat*-Galektine und ist aus zwei CRDs (*carbohydrate-recognition domains*) verbunden durch eine aus 77 Aminosäure bestehenden Polypeptidkette für Galektin-8 long und einer 35 Aminosäure langen Aminosäurekette für Galektin-8 short, gebildet. Die zwei CRDs bestehen aus 131 bzw. 128 Aminosäuren. Der Unterschied in der Proteinstruktur der zwei Galektin-8-Isoformen liegt im Bereich der Verbindungskette zwischen den zwei CRDs. In der Primärstruktur des Galektin-8 short fehlen 42 Aminosäuren zwischen den Aminosäuren 186 und 228 des Galektin-8 long. Auf cDNA-Ebene entspricht dieses einem Verlust von

Exon 11 (Basenpaare 550-698) bei Galektin-8 short im Vergleich zur Galektin-8 long-Variante.

Durch die cDNA-Analyse mittels PCR konnte die Identität der im Immunblot nachgewiesenen Doppelbanden des Galektin-8 bestimmt werden. Die untersuchten Pankreaskarzinom- bzw. Kolonkarzinomzelllinien enthalten zwei Isoformen des Galektin-8-Proteins. Die lange Isoform, die aus 359 Aminosäuren besteht entspricht der Transkriptvariante 1 (NCIB Referenzsequenz NM_006499.3) und wurde in dieser Arbeit mit Galektin-8 long benannt. Die kurze, 317 Aminosäuren lange, Isoform, entsprechend der Transkriptvariante 2 (NCIB Referenzsequenz NM_201543.1) der wurde Galektin-8 short genannt.

3.3 Klonierung von pcDNA3/Galektin-8 long und pcDNA3/Galektin-8 short

3.3.1 Klonierung von pCR 2.1/Galektin-8 long und pCR 2.1/Galektin-8 short

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die cDNAs der humanen Galektin-8-Varianten aus PANC-1-Zellen in dem Vektor pcDNA3 kloniert. Ziel dieser Klonierung war ein Galektin-8-Plasmid das, nach Transfektion in unterschiedlichen Zellen, zu einer Überexpression des Galektin-8 führen würde.

Mittels PCR wurden die cDNA-Sequenzen der humanen Galektin-8-Varianten 1 und 2 aus der cDNA von PANC-1 Pankreaskarzinomzellen amplifiziert. Beide Varianten wurden anschließend in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und separat extrahiert. Die extrahierten PCR-Fragmente wurden durch Ligation in dem Vektor pCR[®]2.1 TOPO inseriert und die Plasmide in *E. coli* amplifiziert. Anschließend wurden zur Kontrolle der Ligation die Plasmide pCR[®]2.1 TOPO/Galektin-8 long und pCR[®]2.1 TOPO /Galektin-8 short mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* geschnitten und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Zusätzlich wurden die inserierten Galektin-8 Sequenzen durch Sequenzierung kontrolliert. Die Sequenzierung zeigte eine korrekte Ligation der PCR-Produkte in dem Vektor pCR[®]2.1 TOPO. Außerdem konnte die Nukleotidensequenz des Galektin-8 long und Galektin-8 short mit den publizierten Sequenzen verglichen werden (NCIB Referenzsequenz NM_006499.3 - Transkriptvariante 1, entsprechend der langen Galektin-8-Isoform und NCIB

Referenzsequenz NM_201543.1 - Transkriptvariante 2 für die kurze Isoform des Galektin-8). Die sequenzierten Nukleotidsequenzen der PCR-Produkte entsprechen der publizierten Galektin-8-Sequenzen.

Das pCR 2.1/Galektin-8 long- und pCR 2.1/Galektin-8 short-Plasmid wurden für weitere Versuche in dieser Arbeit verwendet.

3.3.2 Klonierung von pcDNA 3.1 (-)/Galektin-8 long und pcDNA 3.1 (-)/Galektin-8 short

Zur Klonierung der Galektin-8 long- und Galektin-8 short-cDNA aus dem Vektor pCR[®] 2.1 TOPO in den Expressionsvektor pcDNA 3.1(-) wurden die Plasmide mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *KpnI* hydrolysiert. Der ebenfalls mit *EcoRV* und *KpnI* hydrolysiert Vektor pcDNA 3.1 und die Galektin-8-Fragmente wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und aus diesem extrahiert. Anschließend wurden die Galektin-8 Fragmente mittels Ligation in den pcDNA 3.1(-) Vektor inseriert. Die Insertion der cDNA Fragmente in pcDNA3.1(-) wurde durch Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* und Agarosegelelektrophorese und durch Sequenzierung überprüft. Die Darstellung des Agarosegels in Abbildung 19 zeigt die Spaltung der Plasmide pcDNA 3.1 (-)/Galektin-8 long (A) und pcDNA 3.1 (-)/Galektin-8 short (B) durch die Restriktionsenzymen *EcoRI* bzw. *BamHI*. Die zwei Spuren in Abbildung 10 (A) zeigen die Spaltungsprodukten pcDNA 3.1 (-)/Galektin-8 long/*EcoRI* bzw. pcDNA 3.1 (-)/Galektin-8 long/*BamHI* nach der Auftrennung im Agarosegel. Das Agarosegel (B) in Abbildung m zeigt die, nach Behandlung mit den Restriktionsenzym *EcoRI* bzw. *BamHI* erhaltenen pcDNA 3.1 (-)/Galektin-8 short-Fragmenten. Jeweils zwei Spaltungsfragmente konnten in den zwei Agarosegele (A, B) nachgewiesen werde: der Vektor pcDNA 3.1 (-) (jeweils die obere Bande, ca. 5,4 kb) und die cDNA des Galektin-8 long (untere Banden im Agarosegel (A), ca. 1100 bp) bzw. Galektin-8 short (untere Banden im Agarosegel (B), ca. 950 bp). Die Spaltung der zwei Plasmide ergab, dass diese die zwei Galektin-8-Varianten enthalten und somit die Klonierung richtig erfolgt war.

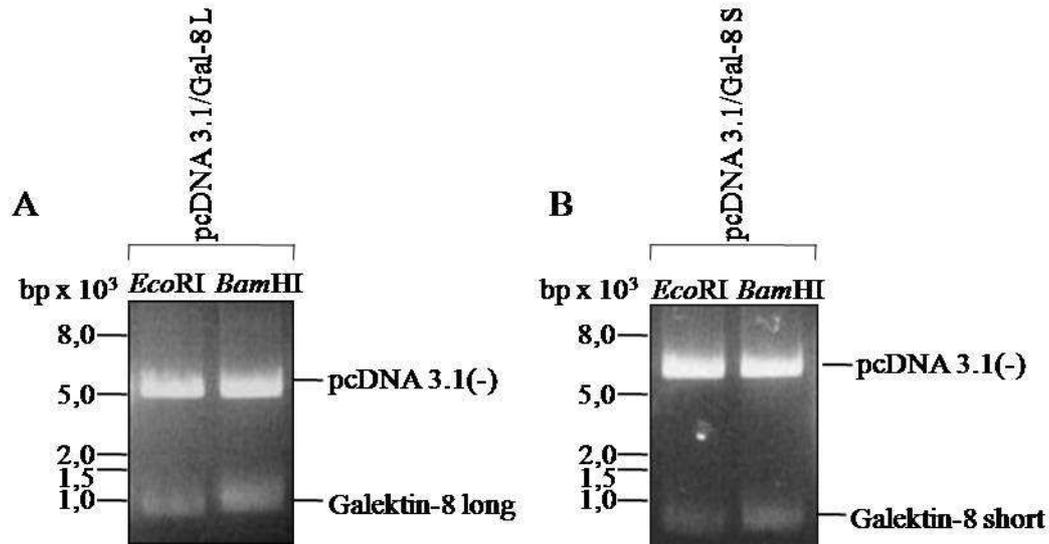


Abb. 19: Restriktionsanalyse der Plasmide pcDNA 3.1 (-)/Galektin-8 long (Gal-8 L) (A) und pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 short (Gal-8 S) (B): Die zwei Agarosegele zeigen die Spaltprodukte der Plasmide pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 long (A) und pcDNA3.1(-)/Galektin-8 short (B) nach Hydrolyse mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* bzw. *BamHI*. Durch Spaltung von pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 long (A) bzw. pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 short (B) entstehen jeweils zwei Spaltprodukte: der Vektor pcDNA 3.1(-) (ca. 5,4 kb) und Galektin-8 long (ca. 1100 bp) bzw. Galektin-8 short (ca. 950 bp). Ein DNA-Standard wurde jeweils links markiert. (Abkürzungen: kb= kilo Basenpaare; bp = Basenpaare; Gal-8L = Galektin-8 long; Gal-8S = Galektin-8 short).

Die Sequenzierung bestätigte anschließend die erfolgreiche Klonierung der Plasmiden pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 long und pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 short.

3.3.3 Ektope Expression von Galektin-8 long und Galektin-8 short in HEK 293-Nierenzellen

Im Rahmen der nächsten Versuche sollten Galektin-8 long und Galektin-8 short ektope in HEK 293-Nierenzellen exprimiert werden. Für diese Experimente wurden die HEK 293-Nierenzellen, die im Immunblotverfahren keinen Galektin-8 aufweisen, ausgesucht. Dazu wurde in Zellen jeweils mit pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 long und pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 short Plasmid transfiziert. Die HEK 293-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 50-70 % mit je 4 µg pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 long und pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 short transfiziert. Zur Kontrolle wurden nicht-transfizierte HEK 293-Zellen und mit dem Vektor pcDNA 3.1(-) transfizierte Zellen verwendet. Die transfizierten Zellen wurden für 48 h bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator inkubiert und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. Von den erhaltenen Lysaten wurden jeweils 50 µg in einem 12,5 %igen

SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Expression von Galektin-8 im Immunoblot-Verfahren nachgewiesen.

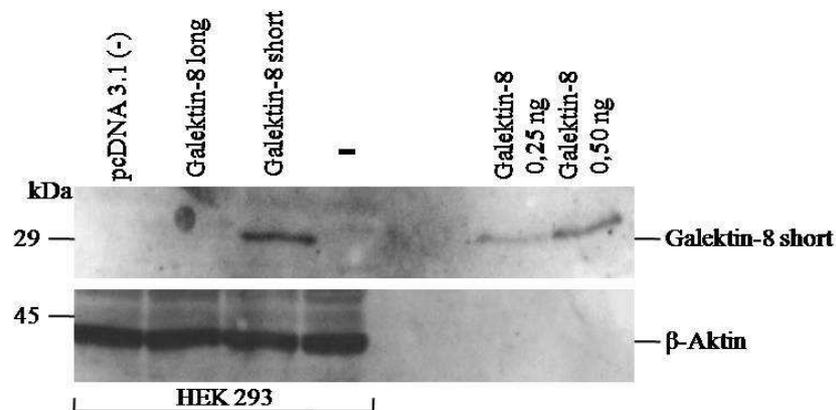


Abb. 20: Die ektote Expression der Galektin-8 Isoformen in den HEK 293-Zellen: Die mit je 4 μg pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 long und pcDNA 3.1(-)/Galektin-8 short transfizierten 2×10^5 Zellen wurden 48 h nach Transfektion bei einer Konfluenz von 60-80% in RIPA-Puffer lysiert. Je 50 μg vom RIPA-Lysat wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der obere Blot zeigt den Galektin-8-Nachweis in den transfizierten HEK 293-Zellen (Spur 1-3) und nicht-transfizierten HEK 293 Zellen (Spur 4). Die erste und vierte Spur enthalten die zwei Transfektionskontrollen: das HEK 293/pcDNA 3.1 (-)-Zelllysate und das Zelllysate der nicht-transfizierten HEK 293-Zellen. In Spur 2 und 3 sind RIPA-Lysate von HEK 293-Zellen aufgetrennt, die mit pcDNA 3.1 (-)/Galektin-8 long bzw. pcDNA 3.1 (-)/Galektin-8 short transfiziert worden waren. Zur Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-8-Antikörpers wurden die letzten zwei Spuren des SDS-Acrylamidgels mit 0,25 ng bzw. 0,50 ng vom humanen rekombinanten Galektin-8 beladen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörper (1:1000 verdünnt) behandelt. Durch die anschließende Behandlung mit einem entsprechenden HRP-gebundenen Maus-Antikörper (1:10000 verdünnt) und Detektion mit ECL *Advance* wurde der Immunoblot entwickelt. In den beiden Kontrolllysaten konnte kein Galektin-8 nachgewiesen werden. Die Spur 2 weist keine Galektin-8 long-Bande auf und in Spur 3 konnte Galektin-8 short nachgewiesen werden. Anschließend wurde der Immunoblot mit einem β -Aktin-Antikörper (1:6000 verdünnt) und Detektion durch einem entsprechenden HRP-gebundenen zweiten Maus-Antikörper (1:2000 verdünnt) erneut entwickelt (untere Blot). Vorausgesetzt, dass alle RIPA-Lysate der transfizierten bzw. nicht-transfizierten Zellen gleiche Mengen β -Aktin enthalten, kann von einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Gele ausgegangen werden. Ein Proteinstandard wurde links markiert.

Die Blots in Abbildung 20 zeigen, dass Galektin-8 long nach transients Transfektion nicht in HEK 293-Zellen exprimiert werden konnte (Spur 2), Galektin-8 short (Spur 3) hingegen gut exprimiert wurde. Die RIPA-Lysate der Kontrollen zeigen im Immunoblotverfahren keinen Galektin-8-Nachweis. Da HEK 293-Nierenzellen endogen keine Galektin-8 Proteine

enthalten, kann durch den Galektin-8 Nachweis im Immunblotverfahren die Expressionspotenz der zwei Plasmide dargestellt werden. In allen durchgeführten transienten Transfektionen und anschließenden Galektin-8 Nachweisen (n = 3) konnte nur die Expression von Galektin-8 short nicht aber von Galektin-8 long nachgewiesen werden.

3.3.4 Klonierung von Galektin-8 long und Galektin-8 short in pcDNA3 mit Kozak-Sequenz

Um eine stärkere transiente Expression zu ermöglichen, wurde vor das Translationsstart-Kodon der Galektin-8-Sequenzen eine Kozak-Sequenz GCCACC mittels PCR eingeführt und das PCR-Produkt in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert.

Für die Klonierung wurden zunächst die cDNA Sequenzen der beiden Galektin-8-Isoformen mittels PCR amplifiziert. Als *template* diente die Plasmide pcDNA3.1/Galektin-8 long und pcDNA3.1/Galektin-8 short sowie der Primer Galektin 8-Kozak-5' Primer und Galektin 8-Kozak-3' Primer. Die Primersequenzen sind im Kapitel 2.10 beschrieben. Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert. Zur Klonierung der Kozak-Galektin-8 long und Kozak-Galektin-8 short-PCR-Produkte in dem Vektor pcDNA3 wurde sowohl das extrahierte PCR-Produkte als auch der Vektor mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *KpnI* behandelt. Mittels Ligation wurde die geschnittene und gereinigten Galektin-8 DNA-Fragmente in dem Vektor pcDNA3 inseriert. Anschließend wurden die in *E.coli* amplifizierten Plasmide zur Kontrolle mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *EcoRV* geschnitten und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

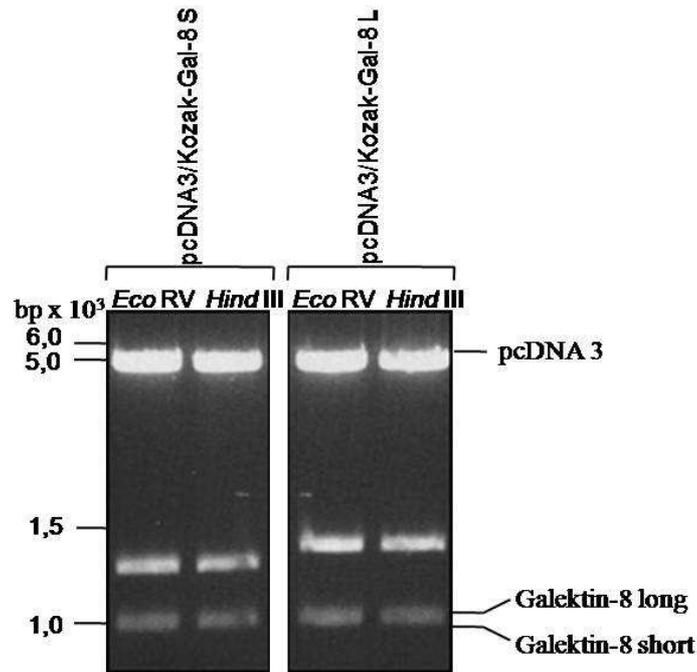


Abb. 21: Restriktionsanalyse der Plasmide pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long: Die Plasmide, pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *EcoRV* behandelt. Anschließend wurden die Spaltungsprodukte in einem 1% igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht ausgewertet. Die Spuren 1 und 2 zeigen die Spaltungsprodukte nach Hydrolyse des Plasmids pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short. Die Spaltungsprodukte der Hydrolyse des Plasmids pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long zeigen die Spuren 3 und 4. Jeweils drei Banden konnten identifiziert werden. Die obere Bande entspricht dem pcDNA3-Vektor der ca. 5000 Basenpaare enthält (Spur 1-4). Die untere Bande (Spur 1 und 2) entspricht dem Galektin-8 short (ca. 950 bp) bzw. dem Galektin-8 long (ca. 1100 bp) (Spur 3 und 4). Die mittlere Bande jeweils auf der Spur 1-4 entspricht einem Restfragment von ca. 1300 bp, entstanden bei der Spaltung von pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short bzw. ca. 1500 bp, nach der Spaltung von pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long. Ein DNA-Standard wurde links markiert.

Das obere Agarosegel in Abbildung 21 zeigt die Spaltung der pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short-Plasmide mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *EcoRV* und Nachweis von je drei Spaltungsprodukte: der Vektor mit einer Größe von ca. 5000 bp, Galektin-8 long, mit 1100 bp bzw. Galektin-8 short mit ca. 950 bp und einen kleineren Rest von 1300-1500 Basenpaare. Die korrekte Insertion der Galektin-8 Fragmente in den Expressionsvektor wurde anschließend durch Sequenzierung überprüft.

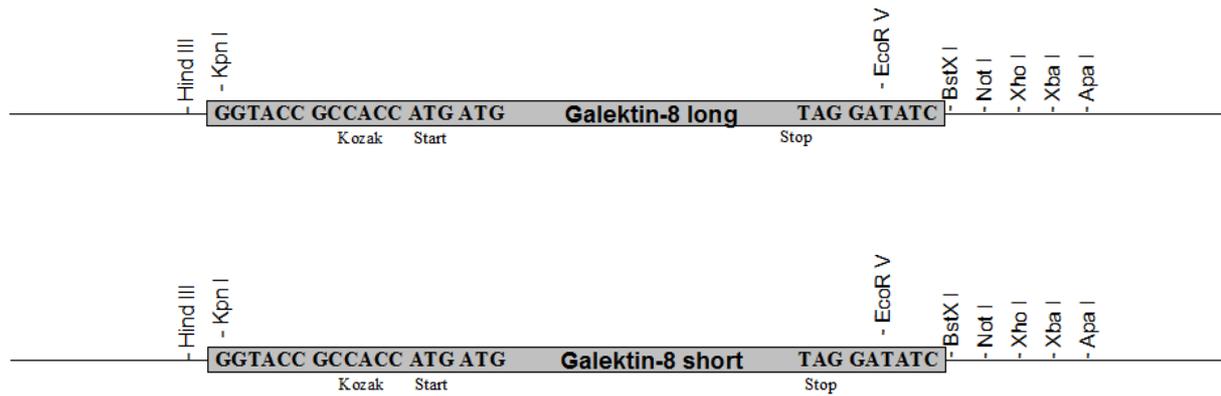


Abb. 22: Schematische Darstellung der Basensequenz der pcDNA3/Galektin-8 long- und short-Plasmide: Die Kozak-Sequenz GCCACC wurde mittels PCR vor das Translationsstart-Kodon der Galektin-8 long- bzw. Galektin-8 short-Sequenz eingeführt und das PCR-Produkt in den Expressionvektor pcDNA 3 kloniert.

3.3.5 Expression von Galektin-8 long und Galektin-8 short in PANC-1-Zellen

Im Rahmen der nächsten Versuchsreihe sollte die Expressionseffizienz von Galektin-8 long und Galektin-8 short nach Transfektion der zwei Plasmiden, pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short, in PANC-1-Zellen, die endogen Galektin-8 aufweisen, untersucht werden. Zum Nachweis der Expression der ektop exprimierten Galektin-8-Isoformen wurden die PANC-1-Zellen (2×10^6) bei einer Konfluenz von etwa 70 % mit jeweils 5 μg pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short transfiziert. Die Zellen wurden für 48 h bei 37 °C, 10 % CO_2 und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem CO_2 -Inkubator inkubiert und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. Von den Lysaten wurden jeweils 50 μg Protein in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

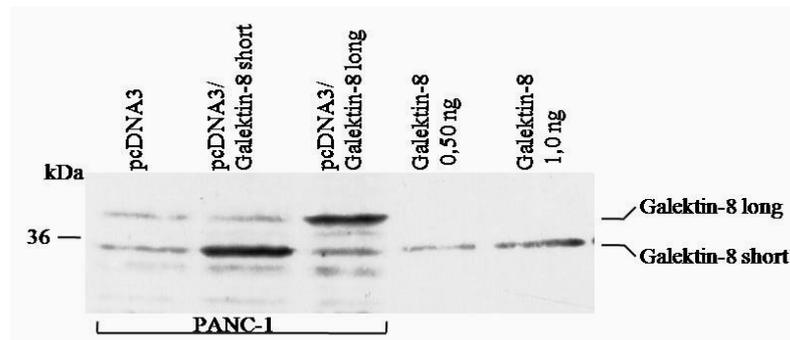


Abb. 23: Expression der Galektin-8 Isoformen in den PANC-1-Zellen: Die transfizierten PANC-1-Zellen wurden 48 h nach Transfektion bei einer Konfluenz von 60-80% geerntet und in RIPA-Puffer lysiert. Je 50 µg RIPA-Lysat wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen anti-Galektin-8-Antikörper behandelt. Durch die anschließende Behandlung mit einem entsprechenden HRP-gebundenen Ziegen-Antikörper und Detektion mit ECL *Advance* wurde das Blot entwickelt. Die Spur 1 wurde als Transfektionskontrolle mit dem Zelllysat der pcDNA3-exprimierenden PANC-1 Zellen beladen. Auf dieser Spur konnte eine geringe Menge Galektin-8 als Doppelbande nachgewiesen werden. Die Spuren 2 und 3 enthalten das Zelllysat der mit pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long transfizierten PANC-1-Zellen. Auf diesen beiden Spuren konnte Galektin-8 ebenfalls als Doppelbande nachgewiesen werden, wobei das Zelllysat der Spur 2 einen höheren Gehalt an Galektin-8 short aufweist, während das Zelllysat der Spur 3 einen höheren Gehalt an Galektin-8 long aufweist. Zur Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-8-Antikörpers wurden die letzten zwei Spuren des SDS-Polyacrylamidgels mit 0,50 ng bzw. 1,0 ng vom humanen rekombinanten Galektin-8 beladen. Ein Proteinstandard wurde links markiert. (Abkürzungen: kDa = Kilodalton)

Der Immunblot in Abbildung 23 zeigt den Nachweis der Galektin-8 Isoformen in den transfizierten PANC-1-Zellen. Da die PANC-1-Pankreaskarzinomzellen endogen beide Galektin-8-Proteine exprimieren, können auch in der ersten Spur, die mit dem Kontrolllysat der PANC-1-Zellen beladen wurde, Galektin-8 long und Galektin-8 short nachgewiesen werden. Die Spur 2 im Gel wurde mit dem Lysat der pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short-exprimierenden PANC-1-Zellen beladen. Hier konnte das ektopt exprimierte Galektin-8 short nachgewiesen werden. Die Bande auf der Spur 3 zeigt das in den PANC-1-Zellen ektopt exprimierte Galektin-8 long.

Zur Kontrolle der Spezifität des polyklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers wurden in demselben SDS-Polyacrylamidgel 0,5 ng bzw. 1,0 ng vom rekombinanten Galektin-8 aufgetrennt (Spur 4 und 5).

Zusammenfassend zeigen die erzielten Ergebnisse, dass mit den Expressionsplasmiden pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short beide Galektin-8 Isoformen effizient exprimiert werden konnten.

3.4. Co-Expression von Galektin-8 long und Galektin-8 short und Ras-Isoformen in PANC-1- und HEK 293-Zellen

Mit der nächsten Versuchsreihe sollte die Interaktion von Galektin-8 long und Galektin-8 short mit Ras-Isomeren in PANC-1 Pankreaskarzinomzellen und HEK 293 embryonalen Nierenzellen untersucht werden. Dafür wurden Zelllysate aus PANC-1- bzw. HEK 293-Zellen, die jeweils mit einer Galektin-8-Isoform und einer Ras-Isoform co-transfiziert wurden, präpariert. Anschließend wurde durch *in vitro*-Bindungsanalysen die Interaktion von Galektin-8 long und Galektin-8 short mit den Ras-Isoformen untersucht.

3.4.1 Nachweis der ektopten Expression von Galektin-8 long und Galektin-8 short in PANC-1- bzw. HEK 293-Zellen

Um die im Kapitel 4.4 beschriebene Co-Expression von Galektin-8 long und Galektin-8 short und je eine Ras-Isoform in HEK 293- bzw. PANC-1-Zellen nachweisen zu können wurden je 50 µg der jeweiligen Lysate in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Blots in Abbildung 24 zeigen die Überexpression von Galektin-8 long (A) und Galektin-8 short (B) und je einer Ras-Isoform in PANC-1-Zellen. Zur Kontrolle der Transfektion wurden zwei Ansätze mit PANC-1-Zellen, die mit den Vektor pcDNA3 und EGFP-K-Ras(G12V) bzw. EGFP und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long oder pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short transfiziert worden waren, mitgeführt (Spur 3 und 8). In allen Lysaten können die beiden endogen exprimierten Galektin-8-Isoformen auf Höhe von 36 kDa (Galektin-8 short) und 40 kDa (Galektin-8 long) nachgewiesen werden, da die PANC-1-Zellen endogen Galektin-8 synthetisieren. Abbildung 24 (A), in dem die Ergebnisse der transienten Expression von Galektin-8 long dargestellt sind, zeigt eine höhere Expression des Galektin-8 long im Vergleich zum endogenen Galektin-8 im Kontrolllysat in Spur 8.

Die Abbildung 24 (B) zeigt die Ergebnisse der transienten Expression von Galektin-8 short und jeweils eine Ras-Isoform in den PANC-1-Zellen. Die Expression des Galektin-8 short in den transfizierten Zellen ist höher im Vergleich zum Kontrolllysat aus nicht-transfizierten PANC-1-Zellen, die nur das endogene Galektin-8 aufweisen.

Eine erfolgreiche Überexpression der zwei Galektin-8 Isoformen in den PANC-1-Zellen konnte somit nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der Spezifität des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers wurden jeweils in den ersten zwei Spuren 1,0 ng und 2,0 ng humanes rekombinantes Galektin-8 aufgetrennt.

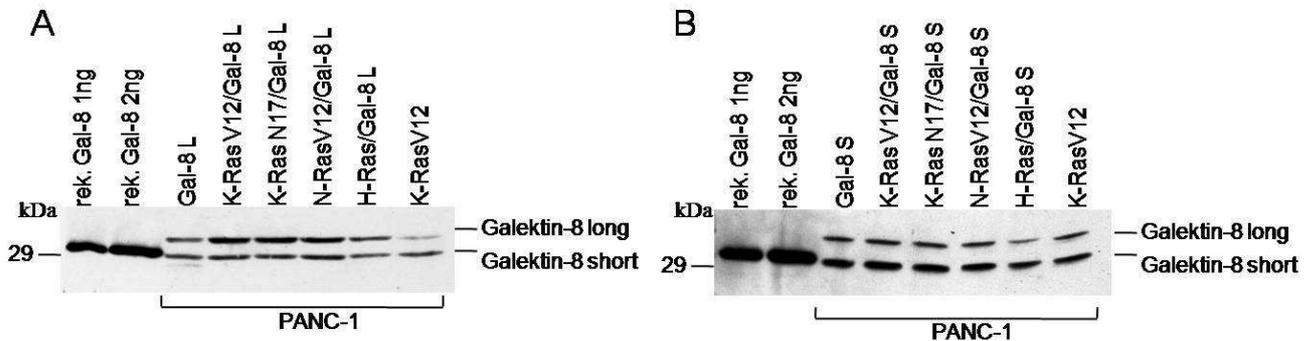


Abb. 24: Nachweis des ektopt exprimierten Galektin-8 long (A) und Galektin-8 short (B) in PANC-1-Zellen: PANC-1-Zellen ($2-3 \times 10^6/100$ mm Schale) wurden mit $10 \mu\text{g}$ pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long bzw. $10 \mu\text{g}$ pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short bzw. je $5 \mu\text{g}$ pEGFP/K-Ras(G12V), pEGFP/K-Ras(N17V), pEGFP/HA-N-Ras(G12V) und pEGFP/H-Ras(WT) transfiziert und nach 48 h in $500 \mu\text{l}$ Gold-Lysis-Puffer lysiert. Je $50 \mu\text{g}$ der Lysate wurden in einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörper behandelt. Durch die anschließende Behandlung mit dem entsprechenden HRP-gebundenen Maus-Antikörper und Detektion mit ECL-Advanced Lösung wurde der Blot entwickelt. Die ersten zwei Spuren wurden zur Kontrolle der Spezifität des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers mit 1 ng bzw. 2 ng humanem rekombinatem Galektin-8 beladen. Das nachgewiesene Galektin-8 erscheint im Immunblotverfahren als Doppelbande auf der Höhe von 40 bzw. 36 kDa. Die Kontrolle der Transfektion erfolgte durch zwei Ansätze die mit den Vektor pcDNA3 und EGFP-K-Ras(G12V) bzw. EGFP und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long oder pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short transfiziert wurden (Spur 8 und 3 - Reihenfolge wie beschrieben). Ein Proteinstandard wurde links markiert. (Abkürzungen: rek. Gal-8: rekombinante Galektin-8; Gal-8L: Galektin-8 long; Gal-8S: Galektin-8 short, kDa: Kilodalton)

Als nächstes wurde die transiente Expression des Galektin-8-Isoformen und der Ras-Isoformen in den embryonalen Nierenzellen HEK 293 untersucht. Dazu wurden, wie oben für die PANC-1-Zellen beschrieben, jeweils $50 \mu\text{g}$ vom Lysat der Zellen in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Die Blots in Abbildung 25 zeigen das Ergebnis der Untersuchung der Co-Expression von pEGFP/K-Ras(G12V), pEGFP/K-Ras(N17V), pEGFP/HA-N-Ras(G12V) und pEGFP/H-Ras(WT) und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long bzw. pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short in den HEK 293-Nierenzellen. Da im Immunblotverfahren in den HEK 293-Zellen keine endogenen

exprimierten Galektin-8-Isoformen nachweisen werden konnte, wurde das transient exprimierte Galektin-8 long bzw. Galektin-8 short in diesen Versuchen als Einzelbande nachgewiesen. Zur Kontrolle der Transfektion wurden zwei Ansätze mit HEK 293-Zellen, die mit den Vektor pcDNA3 und EGFP-K-Ras(G12V) bzw. EGFP und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long oder pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short transfiziert wurden, mitgeführt (Spur 3 und 8). Das Lysat der mit pcDNA3 und EGFP/K-Ras(G12V) enthält somit kein Galektin-8, da die HEK 293-Zellen endogen kein Galektin-8 synthetisieren (Spur 8). Die HEK 293-Zellen, die mit pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short transfiziert wurden weisen im Immunblotverfahren eine Bande auf der Höhe von 36 kDa bzw. 40 kDa, die dem Galektin-8 short und Galektin-8 long entsprechen (Abb. 25 (A), (B): Spur 3-7). Eine erfolgreiche ektope Expression der zwei Galektin-8 Isoformen in den HEK 293-Nierenzellen konnte somit nachgewiesen werden.

Die Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-8-Antikörpers erfolgt durch die elektrophoretische Auftrennung von 1,0 bzw. 2,0 ng rekombinanten Galektin-8 im selben Gel. Da das rekombinante Galektin-8 eine Molekularmasse von ca. 36 kDa hat und das Galektin-8 long von 40 kDa, verlaufen die im Immunblot nachgewiesenen Galektin-8-Banden auf unterschiedlicher Höhe. Die Galektin-8 long-Bande ist im Immunblotverfahren höher als die rekombinante Galektin-8-Bande. Das rekombinante Galektin-8 läuft dagegen im Immunblot höher als das Galektin-8 short. Dieses veränderte Laufverhalten kann vermutlich auf eine unterschiedlichen Konformation oder eine posttranslationale Modifikation des Galektin-8 short in den Zellen zurückzuführen sein.

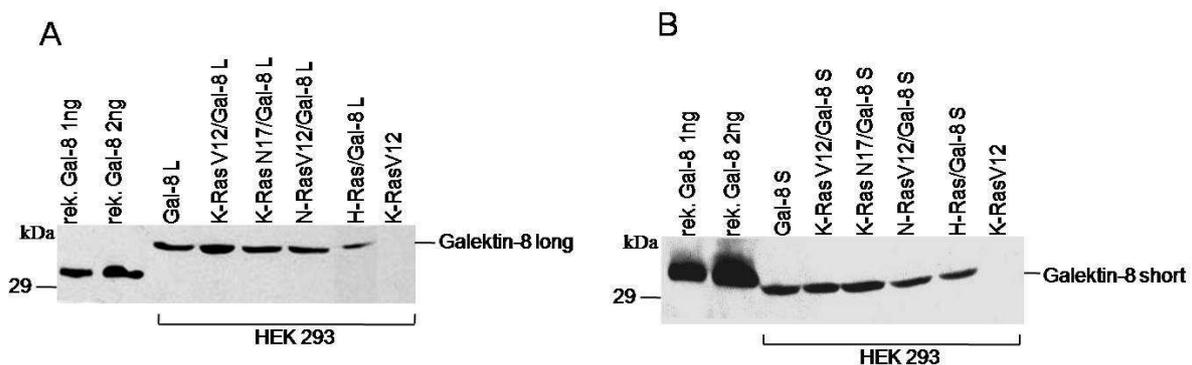


Abb. 25: Nachweis der ektope Expression von Galektin-8 long (A) und Galektin-8 short (B) in HEK-293-Zellen: HEK 293-Zellen ($2-3 \times 10^6$ /100 mm Schale) wurden mit $10 \mu\text{g}$ pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long und $10 \mu\text{g}$ pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short bzw. je $5 \mu\text{g}$ pEGFP/K-Ras(G12V), pEGFP/K-Ras(N17V), pEGFP/HA-N-Ras(G12V) und pEGFP/H-Ras(WT) transfiziert und nach 48 h in $500 \mu\text{l}$ Gold-Lysis-Puffer lysiert. Je $50 \mu\text{g}$ der Lysate wurden in einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion des Galektin-8 erfolgte mit einem monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörper. Durch die anschließende Behandlung mit dem entsprechenden HRP-gebundenen Maus-

Antikörper und Detektion mit ECL-*Advanced Lösung* wurde der Blot entwickelt. Die ersten zwei Spuren wurden zur Kontrolle der Spezifität des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers mit 1 ng bzw. 2 ng humanem rekombinantem Galektin-8 beladen. Das nachgewiesene Galektin-8 erscheint im Immunblotverfahren als Einzelbande auf der Höhe von 40 bzw. 36 kDa. Die Kontrolle der Transfektion erfolgte durch zwei Ansätze die mit den Vektor pcDNA3 und EGFP-K-Ras(G12V) bzw. EGFP und pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long oder pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short transfiziert wurden (Spur 8 und 3). Die mit EGFP/K-Ras(G12V) und pcDNA3 transfizierten HEK 293-Zellen enthalten kein Galektin-8 (jeweils Spur 8). Ein Proteinstandard wurde links markiert. (Abkürzungen: rek. Gal-8: rekombinante Galektin-8; Gal-8L: Galektin-8 long; Gal-8S: Galektin-8 short, kDa: Kilodalton)

3.5 Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Galektin-8 long und Galektin-8 short an Ras-Isoformen durch *in vitro*-Bindungsstudien

Um eine mögliche die Bindung der Galektin-8 Isoformen an Ras-Isoformen zu untersuchen, wurden Co-Immunpräzitationsstudien durchgeführt. Hierzu wurden zwei Methoden eingesetzt: die Co-Immunpräzitation durch Bindung an Protein G-gebundene anti-GFP-Antikörper und die Co-Immunpräzitation mit μ MACS anti-GFP *MicroBeads*.

Die Co-immunpräzitation von Proteinen mittels spezifischer Antikörper ermöglicht die selektive Anreicherung eines Proteins bzw. Proteinkomplexes aus einem Zelllysate. Dieses wird durch Bindung spezifischer Antikörper, hier der anti-GFP-Antikörper, an Immunglobulin-Fc-Bindungsstellen von Protein G erreicht. Die verwendeten Protein G-Moleküle sind an *Agarose-beads* gekoppelt und können somit aus der Proteinlösung über Zentrifugation sedimentiert werden.

Die Co-Immunpräzitation mit μ MACS anti-GFP *MicroBeads* ermöglicht ebenfalls die Isolierung von Proteinkomplexen aus einem Zelllysate. Bei diesem System werden Proteinkomplexe mit Hilfe von anti-GFP-Antikörper-haltigen, magnetischen *MicroBeads* in einem magnetischen Feld aus Zelllysaten immunpräzipitiert. Da die Co-Immunpräzitationsmethode mit Hilfe von Protein G-anti-GFP-Antikörperkomplexen zu keinen eindeutigen Ergebnissen führte (Daten nicht gezeigt), wurden die folgenden Analysen mit Hilfe des μ MACS *Epitope Tagged Protein Isolation*-System durchgeführt.

Für die nächsten Untersuchungen wurden die Plasmide pEGFP/K-Ras(G12V), pEGFP/K-Ras(S17N), pEGFP/HA-N-Ras(G12V) und pEGFP/H-Ras (WT) verwendet. Durch den EGFP-Fusionsanteil könnten die Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie durch Anregung

bei einer Wellenlänge um 488 nm und Emission um 507 nm detektiert werden. Das N-Ras wurde zusätzlich zwischen dem EGFP- und dem N-Ras-Anteil mit einem Hämagglutinin (HA)-Epitop versehen. Ras-Proteine, die mit diesem System ekto in eukaryontischen Zellen exprimiert werden, sind posttranslational modifiziert. Die posttranslationale Modifikation ist entscheidend für die Lokalisation der Ras-Proteine in der Zelle und damit entscheidend für die Funktion von Ras.

3.5.1 Angleich der Ras-Proteinmengen in co-transfizierten HEK 293- und PANC-1-Zellen

Um aussagekräftige Ergebnisse über die Bindungsfähigkeit der Galektin-8 Isoformen an die Ras-Isoformen K-Ras, N-Ras und H-Ras zu erhalten, musste die zu analysierende Gesamtproteinmenge der co-transfizierten HEK 293- und PANC-1-Zellen eine gleichmäßige Verteilung der Ras-Proteine aufweisen. Um die Menge der exprimierten EGFP-Ras-Isoformen in den Lysaten zu vergleichen wurden 50 µg vom jeweiligen Lysat in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Expression der EGFP-Ras-Proteine anschließend im Immunoblotverfahren mit einem monoklonalen HRP-gekoppelten GFP-Antikörper nachgewiesen. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse eines exemplarischen Experimentes gezeigt: HEK 293-Zellen, die mit pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long + pEGFP, pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long + pEGFP/K-Ras(G12V), pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long + pEGFP/K-Ras(S17N), pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long + pEGFP/HA-N-Ras(G12V), pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long + pEGFP/H-Ras(WT) und pEGFP/-K-Ras(G12V) + pcDNA3.1 co-transfiziert wurden. Die erste und letzte Spur wurde mit den Transfektionskontrollen, dem Vektor pEGFP + pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long und dem Vektor pcDNA3.1 + pEGFP/K-Ras(G12V), beladen. Die Spuren 2-5 zeigen den Nachweis der EGFP-Ras-Proteine in den co-transfizierten Zellen wie folgt: pEGFP/K-Ras(G12V), pEGFP/K-Ras(S17N), pEGFP/HA-N-Ras(G12V) und pEGFP/H-Ras (WT), jeweils mit pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long transfiziert. Die Intensität der EGFP-Ras-Banden wurde verglichen und die Lysatmengen so variiert, dass in allen Ansätzen gleiche Mengen EGFP-Ras nachweisbar waren. Der obere Immunoblot (A) in Abb. 26 zeigt den Nachweis der Ras-Proteine in 50 µg Gesamtlusat. Im unteren Blot (B) wurden die Lysatmengen so angeglichen, dass die nachgewiesenen Ras-Banden gleichmäßig verteilt sind. Für die nachfolgenden Co-

Immunpräzipitationsexperimente wurden die in diesen Experimenten ermittelten Lysatmengen eingesetzt.

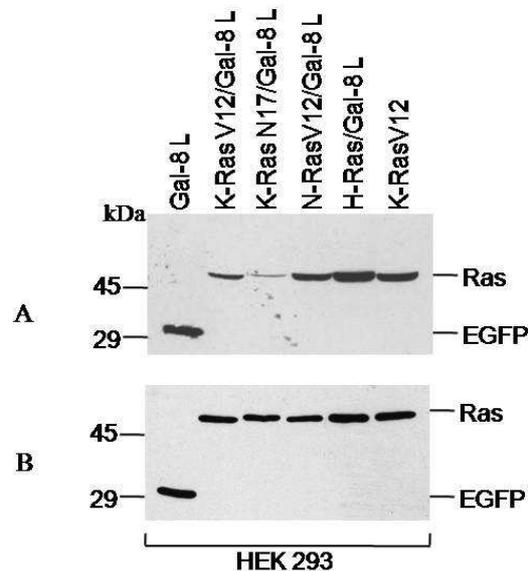


Abb. 26: Nachweis der EGFP-Ras-Expression in den mit pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long und jeweils einem pEGFP/Ras Plasmid co-transfizierten HEK 293-Zellen und Angleich der EGFP-Ras-Mengen: (A): Nachweis der EGFP-Ras-Expression in den pEGFP/pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long-, pEGFP-K-Ras(G12V) + pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long-, pEGFP-K-Ras(S17N) + pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long-, pEGFP-HA-N-Ras(G12V) + pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long-, pEGFP-H-Ras(WT) + pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long- und pcDNA3 + pEGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden HEK 293-Zellen (Spur 1-6). Die co-transfizierten HEK 293-Zellen wurden für 24-48 h in DMEM ohne Zusätze kultiviert, anschließend in Gold-Lysis-Puffer lysiert und 50 µg vom jeweiligen Gesamtlysat wurden in einem 12,5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis der EGFP-Ras-Proteine erfolgt mit einem monoklonalen HRP-GFP-Antikörper und ECL-Detektion. (B): Anschließend wurden die Lysatmengen so aneinander angeglichen, dass die nachgewiesenen Ras-Banden eine vergleichbare Intensität. Ein Proteinstandard wurde links markiert.

3.5.2 Co-Immunpräzipitation mit µMACS™ anti-GFP MicroBeads zur Analyse von Galektin-8 long- bzw. Galektin-8 short-Ras-Proteinkomplexe in PANC-1- und HEK 293-Zellen

Die Versuche, die in diesem Kapitel beschrieben sind, dienen der Untersuchung von Galektin-8/EGFP-Ras-Proteinkomplexe in *in vitro*-Bindungsanalysen. Grundlage war die Hypothese, dass die untersuchten Galektin-8-Isoformen unterschiedlich stark mit Ras-Isoformen interagieren. Um die Bindungsfähigkeit von Galektin-8 long bzw. Galektin-8 short jeweils an EGFP-K-Ras(G12V), EGFP-K-Ras(S17N), EGFP-HA-N-Ras(G12V) und EGFP-

H-Ras Wildtyp zu analysieren, wurden jeweils Galektin-8 long und Galektin-8 short zusammen mit einer der vier Ras-Isoformen in den PANC-1- bzw. HEK 293-Zellen überexprimiert.

Für die Co-Immunpräzipitationsuntersuchung wurden die subkonfluenten PANC-1- bzw. HEK 293-Zellen mit jeweils 10 µg pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long- und 10 µg pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short-Plasmid und jeweils 5 µg pEGFP/Ras- Plasmid pro 100 mm Schale transfiziert. Bei einer Konfluenz von etwa 70 % wurden die Zellen 48 h nach Transfektion in 500 µl Gold-Lysis-Puffer lysiert. Jeweils 500 - 1000 µg vom Gesamtlisat, je nach EGFP-Ras-Expression, der Galektin-8-/EGFP-Ras-Isoformen exprimierenden Zellen wurden mit je 40 µl µMACS anti-GFP *MicroBeads* inkubiert und so Galektin-8-EGFP-Ras-Komplexe isoliert. Zur Kontrolle der Immunpräzipitation und der im Lysate enthaltenen Proteinmenge wurden je Versuch PANC-1- und HEK 293-Zellysate im selben Polyacrylamidgel aufgetrennt und untersucht.

3.5.2.1 Analyse der Galektin-8 long-EGFP-Ras -Proteinkomplexe in PANC-1-Zellen

In den im Folgenden dargestellten Versuchen wurde zunächst die Bindung der Ras-Proteine an Galektin-8 long untersucht. Da PANC-1-Zellen endogen Galektin-8 long und Galektin-8 short exprimieren, würden beide Isoformen an den Ras-Proteinen binden und somit im Immunblotverfahren als Galektin-8-Doppelbande nachweisbar sein.

Der Blot in Abbildung 27 (A) zeigt sowohl den Nachweis des co-immunpräzipitierten, in den PANC-1-Zellen ektop und endogen exprimierten Galektin-8 long und des endogen exprimierten Galektin-8 short (IP) als auch der Nachweis der Galektin-8-Isoformen im Gold-Lysis-Lysat der Zellen (Lysat). Die Abbildung zeigt außerdem den Nachweis der Ras-Proteine in den untersuchten Zellysate (B).

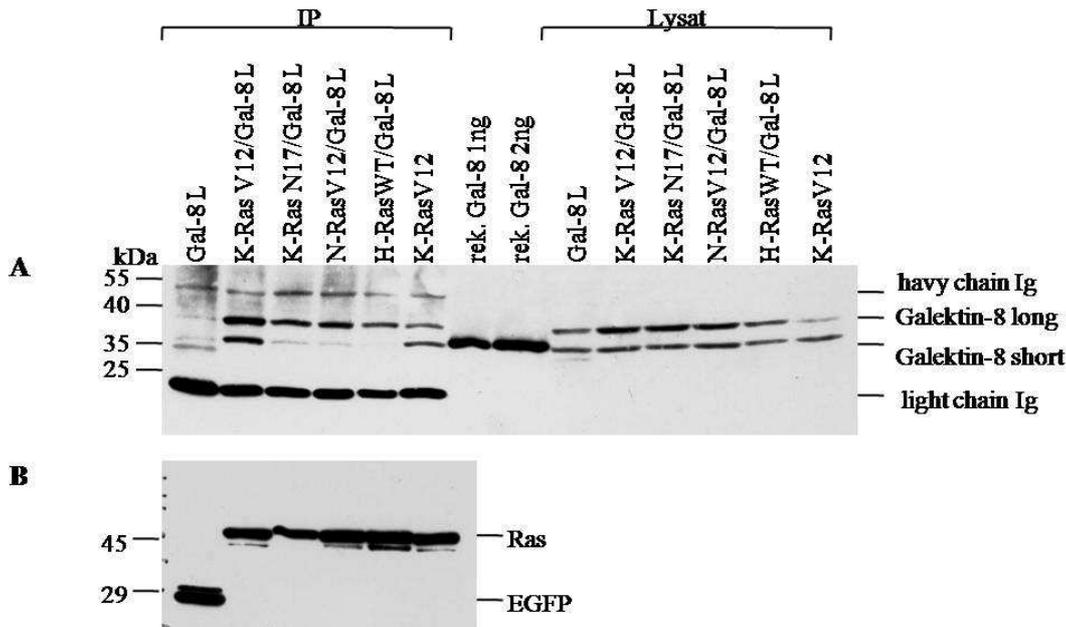


Abb. 27: Interaktion vom endogenen Galektin-8 short und überexprimierten Galektin-8 long mit EGF-Ras-Isoformen in den PANC-1-Zellen: Die PANC-1-Zellen wurden jeweils mit pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long und je einem pEGFP-Ras-Plasmid (EGFP-K-Ras(G12V), EGFP-K-Ras(S17N), EGFP-HA-N-Ras(G12V) und EGFP-H-Ras Wildtyp) transfiziert. Im Co-Immunpräzipitationsverfahren mit anti-GFP *Microbeads* wurden EGFP-Ras und Galektin-8 präzipitiert ((A) und (B), Spur 2-5)). Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen wurden zwei Ansätze mit EGFP/Galektin-8 long- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierende PANC-1-Zellen im selben Versuch untersucht (Spur 1 und 6). Außerdem wurden die Lysate der co-transfizierten Zellen im selben Acrylamidgel aufgetrennt und dargestellt ((A), Spur 9-14, *Lysat*). Je nach EGFP-Ras-Expression (Kapitel 4.5.1) wurden für den Versuch zwischen 250 µg und 1000 µg vom Gesamtlisat eingesetzt mit je 40 µl µMACS™ anti-GFP *MicroBeads* inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden mit Hilfe des µMACS *Epitope Tagged Protein Isolation Kit* isoliert. Die eluierten Proteine wurden auf zwei Ansätze mit 4/5 der Menge (Nachweis von Galektin-8 (IP)) und 1/5 der Menge (Nachweis von EGFP, (B)) verteilt und jeweils in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Zusätzlich wurden 30 µg PANC-1 Lysat aufgetrennt (Spuren 9-14, *Lysat*). Der Nachweis des co-präzipitierten Galektin-8-Isoformen erfolgt durch Anwendung eines monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörper (1:2000 verdünnt) und anschließender Behandlung mit einem zweiten Maus-Antikörper in der Verdünnung 1:10000 und Entwicklung mit ECL-*Advance* Lösung. Die Spuren 7 und 8 enthalten zur Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-8-Antikörpers 1,0 bzw. 2,0 ng humanes rekombinantes Galektin-8. In dem unteren Blot (B) wurden je 1/5 der Eluate in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Behandeln mit einem monoklonaler HRP-konjugierter anti-GFP-Antikörper in der Verdünnung 1:2000 wurden die Blot mit ECL entwickelt. Ein Proteinstandard wurde links markiert. (Abkürzungen: rek. Gal-8: rekombinanten Galektin-8; Gal-8L: Galektin-8 long; Gal-8S: Galektin-8 short; kDa: Kilodalton).

Um eine Aussage über die Bindungsfähigkeit der zwei Galektin-8-Isoformen an den Ras-Proteine machen zu können müssen zwei Bedingungen erfüllt werden: Die für die

Bindungsstudien untersuchte Ras-Menge in den Lysaten muss vergleichbar sein und es müssen gleiche Mengen anti-GFP *MicroBeads* in den Ansätzen enthalten sein. Der untere Blot in Abbildung 27 (B) zeigt die Verteilung der präzipitierten Ras-Proteine in den Zellen. Die Analyse der einzelnen Banden zeigt eine vergleichbare Menge der Ras-Proteine. Lediglich die EGFP-K-Ras(S17N)/Galektin-8 long- (Spur 3) und die EGFP-H-Ras-Galektin-8 long (Spur 5)-überexprimierten PANC-1-Zellen zeigen weniger immunpräzipitiertes EGFP-Ras als die anderen PANC-1-Zellen. Anhand der Menge der leichten Kette der IgG-anti GFP-Antikörper (*light chain IgG*) zeigt sich eine gleichmäßige Beladung der Ansätze mit μ MACS™ anti-GFP *MicroBeads* ((A), Spur 1-6).

Zur Kontrolle der Spezifität des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers wurde im selben SDS-Polyacrylamidgel 1,0 ng bzw. 2,0 ng vom humanen rekombinanten Galektin-8 elektrophoretisch Auftrennt. Dieser hat eine Molekularmasse von 36 kDa und erscheint im Immunblotverfahren als Band auf der gleichen Höhe wie das Galektin-8 short.

Der Versuch ergab folgende Ergebnisse: Das in den PANC-1 überexprimierte Galektin-8 long bzw. das endogene Galektin-8 short interagiert in unterschiedlichem Maß mit den vier untersuchten Ras-Isoformen. Galektin-8 long und Galektin-8 short binden am stärksten an K-Ras(G12V). Weniger stark binden die Galektin-8-Isoformen an HA-N-Ras(G12V) und H-RasWildtyp, wobei die Proteininteraktion am schwächsten mit der H-Ras-Isoform ist. Galektin-8 long und Galektin-8 short binden stärker an K-Ras(S17N) im Vergleich zu HA-N-Ras(G12V) und H-RasWildtyp, dennoch schwächer als an K-Ras(G12V). Die Bindungsfähigkeit der Galektin-8-Isoformen an die Ras-Proteine kann wie folgt in absteigender Reihenfolge dargestellt werden: K-Ras(G12V) > K-Ras(G17N) > HA-N-Ras(G12V) > H-RasWildtyp.

Da in den untersuchten Zellen das Galektin-8 long durch Transfektion überexprimiert wurde, konnte eine größere Menge der langen Isoform des Galektin-8, im Vergleich zur kurzen Isoform, im Komplex mit den Ras-Isoformen nachgewiesen werden,

3.5.2.2 Analyse der Galektin-8 long-Ras-Proteinkomplexe in HEK 293-Zellen

Um die Bindung des Galektin-8 an die unterschiedlichen Ras-Isoformen und -Mutanten weiter zu analysieren wurden anschließend *in vitro*-Bindungsstudien mit transient transfizierten HEK 293-Zellen durchgeführt, die ektope Galektin-8 und je eine der vier untersuchten Ras-Isoformen exprimieren. Hierzu wurden die gleichen Methoden und Bedingungen angewendet wie für die transient transfizierten PANC-1-Zellen. Die HEK 293-

Zellen wurden mit 10 µg pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long- und jeweils mit 5 µg pEGFP/K-Ras(G12V)-, pEGFP/K-Ras(S17N)-, pEGFP/HA-N-Ras(G12V)- und pEGFP/H-Ras(WT)-Plasmid pro 100 mm Schale transfiziert. Die HEK 293-Zellen weisen, im Vergleich zu den PANC-1-Zellen, im Immunblotverfahren keine endogene Galektin-8 Isoformen auf, sodass in diesen Versuchen nur die Interaktion zwischen Galektin-8 long und den EGFP-Ras-Formen nachweisbar ist.

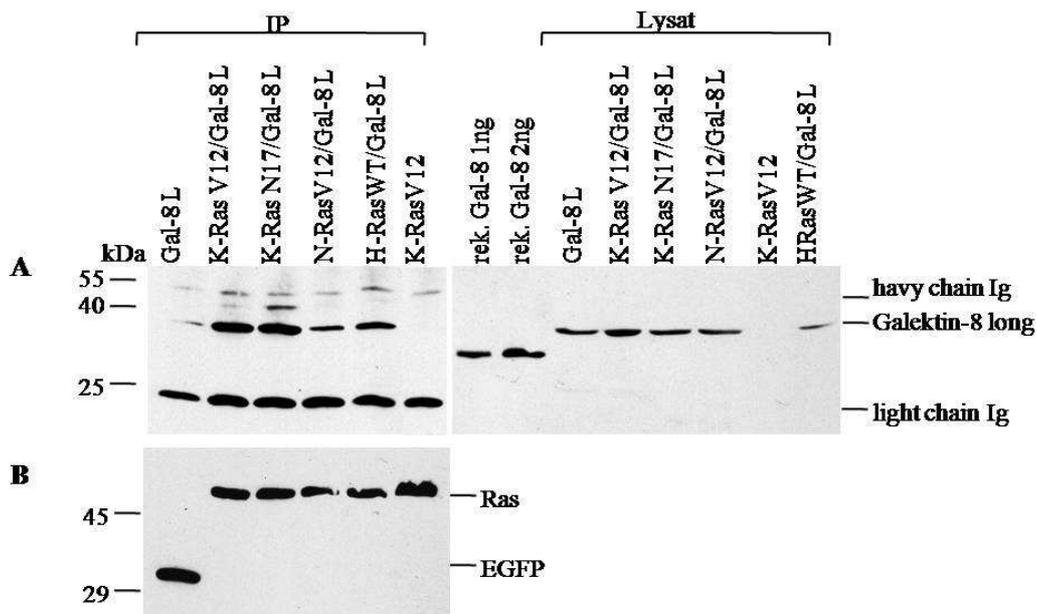


Abb. 28: Interaktion vom ektop exprimierten Galektin-8 long mit EGFP-Ras-Isoformen in HEK 293-Zellen: HEK 293-Zellen wurden jeweils mit pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long und je einem pEGFP-Ras-Plasmid (pEGFP-K-Ras(G12V), pEGFP-K-Ras(S17N), pEGFP-HA-N-Ras(G12V) und pEGFP-H-Ras WT) transfiziert. Galektin-8 wurde im Komplex mit EGFP-Ras durch Co-Immunpräzitationsverfahren präzipitiert ((A) und (B), Spur 2-5)). Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen wurden zwei Ansätze mit EGFP/Galektin-8 long- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierende HEK 293-1-Zellen im selben Versuch untersucht (Spur 1 und 6). Im selben Polyacrylamidgel wurden außerdem je 75 µg Aliquots der Lysate der co-transfizierten Zellen aufgetrennt und dargestellt ((A), Spur 9-14, *Lysat*). Je nach EGFP-Ras-Expression (Kapitel 4.5.1) wurden für den Versuch zwischen 250 µg und 1000 µg vom Gesamtlisat mit je 40 µl µMACS™ anti-GFP *MicroBeads*, inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden mit Hilfe des µMACS *Epitope Tagged Protein Isolation Kit* isoliert. Die eluierten Proteine wurden abschließend auf zwei Ansätze mit 4/5 der Menge (Nachweis von Galektin-8) (A) und 1/5 der Menge (Nachweis von EGFP) (B) verteilt und jeweils in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis des co-präzipitierten Galektin-8-Isoformen erfolgt durch einen monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörper (1:2000 verdünnt) und anschließend durch Behandlung mit einem zweiten Maus-Antikörper in der Verdünnung 1:10000 und Entwicklung mit ECL-*Advance* Lösung. Die Spuren 7 und 8 enthalten zur Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-8-Antikörpers 1,0 bzw. 2,0 ng humanes rekombinantes Galektin-8. In dem unteren Blot (B) wurden je 1/5 der Eluate in einem 12,5 %igen SDS-Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Behandeln mit einem monoklonaler Peroxidase-konjugierter anti-GFP-Antikörper in der Verdünnung 1:2000 wurden die Blot

mit ECL entwickelt. Ein Proteinstandard ist links markiert. (Abkürzungen: rek. Gal-8: rekombinante Galektin-8; Gal-8L: Galektin-8 long; Gal-8S: Galektin-8 short; kDa: Kilodalton)

Der obere Blot in Abbildung 28 ((A), Spur 1-6) stellt den Nachweis des mit EGFP-Ras co-präzipitierten Galektin-8 long, dar. Das in HEK 293-Zellen ekto exprimierte Galektin-8 erscheint im Immunblotverfahren als Einzelbande, entsprechende dem Galektin-8 long. Eine Aussage über die Bindungsfähigkeit von Galektin-8 und EGFP/Ras-Isoformen setzt eine vergleichbare Menge der Ras-Proteine in den immunpräzipitierten Eluate und eine gleiche Menge μ MACS™ anti-GFP *MicroBeads* für die Analyse der Proteinkomplexe voraus. Der untere Blot in Abbildung 28 zeigt (B) eine gleichmäßige Verteilung der Ras-Proteine in den präzipitierten Eluate. Der den Versuche verwendete anti-GFP Antikörper ist in jedem Ansatz in vergleichbaren Mengen (light chain IgG) vorhanden (Abb. 28, (A)).

Im gleichen Acrylamidgel wurden außerdem jeweils 75 μ g vom Gesamtlysat der ekto Galektin-8 long und Ras-Isoformen exprimierenden HEK 293-Zellen elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 28 (A) Spur 9-14). Galektin-8 long erscheint in der Immunblotanalyse als Einzelbande auf der gleichen Höhe wie das immunpräzipitierte Galektin-8 long.

Sowohl zur Kontrolle der ekto Expression des Galektin-8 long und der Ras-Isoformen in den HEK 293-Zellen als auch zur Kontrolle der Immunpräzipitation wurden je ein Ansatz, der mit 10 μ g pcDNA3/Kozak-Galektin-8 long + pEGFP bzw. mit 5 μ g pEGFP/K-Ras(G12V) + pcDNA3 transfiziert worden war, untersucht. Die Menge des an den EGFP-Ras-Isoformen gebundene Galektin-8 long in diesen Zellen wurde anschließend im selben Acrylamidgel durch Co-Immunpräzipitationsanalyse untersucht (Abb. 28 (A)). In Spur 1, die das Eluat der EGFP-Galektin-8 long-exprimierenden HEK 293-Zellen enthält, konnte kein Galektin-8 long nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass Galektin-8 long nicht mit EGFP interagiert. In Spur 6 ist das Immunpräzipitat EGFP/K-Ras(G12V)-exprimierenden Zellen aufgetrennt. Auch hier konnte kein Galektin-8 long nachgewiesen werden, da die Zellen kein Galektin-8 exprimieren.

Die Co-Immunpräzipitationsanalyse der Galektin-8 long-Ras-Komplexe aus den HEK 293-Zellen ergab entsprechende Ergebnisse wie die Versuche mit den PANC-1-Zellen. Die konstitutiv aktive Mutante EGFP-K-Ras(G12V) bindet am stärksten an Galektin-8 long. Die schwächste Bindung weist wildtypisches EGFP-H-Ras auf. Die dominant negative Mutante EGFP-K-Ras(S17N) bindet schwächer als K-Ras(G12V) an Galektin-8 long. Die Bindungsfähigkeit der Ras-Isoformen an Galektin-8 long kann wie folgt in absteigender Reihenfolge dargestellt werden: EGFP-K-Ras(G12V) > EGFP-K-Ras(S17N) > EGFP-HA-N-

Ras(G12V) > EGFP-H-RasWildtyp. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Bindungsanalyse des Galektin-8 long mit den vier Ras-Mutanten in den PANC-1-Zellen überein.

Durch *in vitro*-Bindungsanalysen konnte gezeigt werden dass, Galektin-8 unterschiedlich mit den EGFP-Ras-Mutanten interagiert. Sowohl in den PANC-1-Zellen die Galektin-8 endogen exprimierenden als auch in den HEK 293-Zellen, die keine Galektin-8-Isoformen enthalten und in denen Galektin-8 long ektop exprimiert wurde, konnte die Interaktion zwischen Galektin-8 und den Ras-Isoformen nachgewiesen werden. Galektin-8 long bindet am stärksten an EGFP/K-Ras(G12V). Die schwächste Bindung konnte dagegen an H-RasWildtyp gezeigt werden.

3.5.2.3 Analyse der Galektin-8-short-Ras-Komplexe in PANC-1-Zellen

Um zu analysieren ob auch die kurze Isoform von Galektin-8 differentiell mit Ras-Isoformen interagiert, wurden nun die in dem Kapitel 4.5.2.1 beschriebenen Versuche auch für die kurze Isoform des Galektin-8 durchgeführt. Hierzu wurden die gleichen Methoden und Bedingungen angewendet wie für Galektin-8 long dargestellt. PANC-1-Zellen wurden mit 10 µg pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short- und jeweils mit 5 µg pEGFP/K-Ras(G12V)-, pEGFP/K-Ras(S17N)-, pEGFP/HA-N-Ras(G12V)- und pEGFP/K-Ras(WT)-Plasmid pro 100 mm Schale transfiziert. Anschließend wurden durch Co-Immunpräzipitation der EGFP-Ras-Proteine die Galektin-8-long-Ras-Isoformen-Komplexe in einem 12,5 %igen SDS-Acrylamidgel analysiert.

Der untere Blot in Abbildung 29 (A) zeigt sowohl den Nachweis des immunpräzipitierten, in den PANC-1-Zellen überexprimierten und endogenen Galektin-8 short und des endogen vorhandenen Galektin-8 long (IP) als auch der Nachweis der Galektin-8-Isoformen in den Gold-Lysis-Lysat der Zellen (Lysat). Außerdem wurden die Proteinkomplexe aus 1/5 des jeweiligen Präzipitats in einem 12,5 %igen SDS-Acrylamidgel aufgetrennt um die gleichmäßige Verteilung der präzipitierten Ras-Mengen zu untersuchen (B). Galektin-8 konnte in diesem Versuch als Doppelbande nachgewiesen werden.

Zur Kontrolle der Spezifität der Co-Immunpräzipitation wurden zwei weitere Ansätze untersucht. Lysate von PANC-1-Zellen, die mit dem pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short + pEGFP transfiziert (Abb. 29 (A), Spur 1) und Lysate die mit pEGFP/K-Ras(G12V) + pcDNA3 (Abb. 29 (A), Spur 6) transfiziert worden waren. Da die PANC-1-Zellen endogen

die beiden Galektin-8 Isoformen aufweisen konnte auch in dem Lysat dieser Zellen, Galektin-8 long und Galektin-8 short nachgewiesen werden.

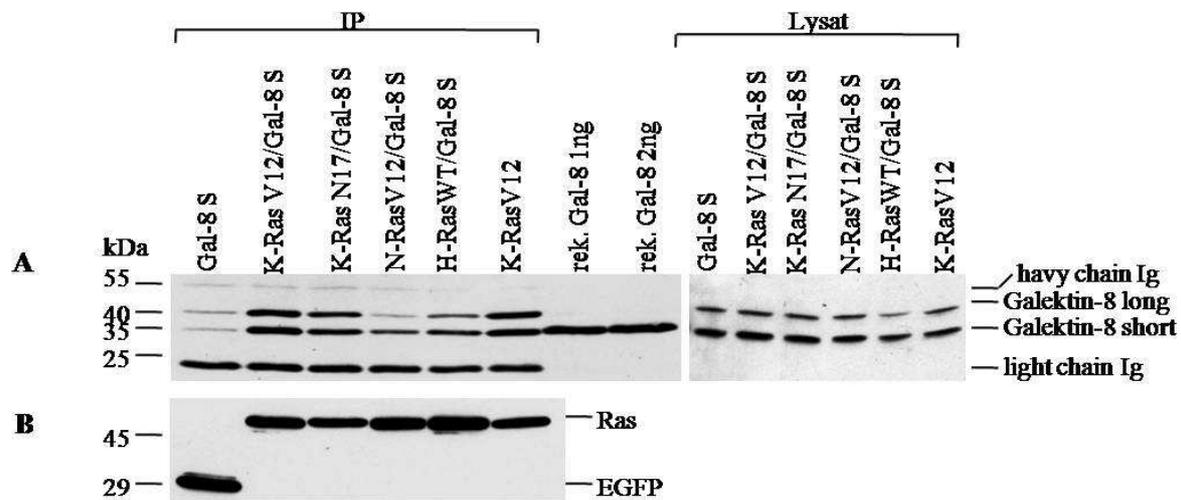


Abb. 29: Interaktion ektop exprimierten und endogenen Galektin-8 short und von endogenem Galektin-8 long und EGFP-Ras-Isoformen in PANC-1-Zellen: Die PANC-1-Zellen wurden mit 10 µg pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short bzw. je 5 µg von den pEGFP/Ras-Plasmiden ((A) Spur 2-5: EGFP/K-Ras(G12V), EGFP-K-Ras(S17N), EGFP/HA-N-Ras(G12V) und EGFP/H-RasWT) transfiziert. Bei einer Konfluenz von 60 - 80 % wurden die Zellen geerntet und in Gold-Lysis-Puffer lysiert. Abhängig von der EGFP-Ras-Expression wurden 500 µg - 1000 µg des Gesamtlisates mit je 40 µl µMACS™ anti-GFP inkubiert. Zwei Ansätze mit EGFP + Galektin-8 short und EGFP/K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1-Zellen wurden zur Kontrolle der Immunpräzipitation ebenso untersucht ((A), Spur 1 und 6). Die Proteinkomplexe wurden mit Hilfe des µMACS *Epitope Tagged Protein Isolation Kit* isoliert. Die eluierten Proteine wurden auf zwei Ansätze mit 4/5 der Menge (Nachweis von Galektin-8) (A) und 1/5 der Menge (Nachweis von EGFP) (B) verteilt und jeweils in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Im selben Gel wurden zusätzlich jeweils 40 µg PANC-1-Lysat der co-transfizierten Zellen aufgetrennt (Spuren 9-14). Der Nachweis des Galektin-8 erfolgt durch Anwendung eines monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers, 1:2000 verdünnt und anschließender Behandlung mit einem zweiten Maus-Antikörper in der Verdünnung 1:10000 und Entwicklung mit ECL-Advance Lösung. Zur Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-8-Antikörpers wurden im Gel 1,0 bzw. 2,0 ng des humanen rekombinanten Galektin-8 elektrophoretisch aufgetrennt (Spur 7 und 8). In dem unteren Blot (B) wurden je 1/5 der Eluate im SDS-Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Behandeln mit einem monoklonaler Peroxidase-konjugierter anti-GFP-Antikörper in der Verdünnung 1:2000 wurden die Blot mit ECL entwickelt. Ein Proteinstandard wurde links markiert. (Abkürzungen: rek. Gal-8: rekombinanten Galektin-8; Gal-8L: Galektin-8 long; Gal-8S: Galektin-8 short; kDa: Kilodalton)

Der untere Blot in Abbildung 29 (B) zeigt die Verteilung der präzipitierten Ras-Proteine. Die Analyse der einzelnen Banden zeigt eine vergleichbare Menge der präzipitierten Ras-Proteine

in den unterschiedlichen Ansätzen. Lediglich die mit EGFP/pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short- (Spur 1) und EGFP/H-RasWildtyp/pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short- (Spur 5) überexprimierten PANC-1-Zellen zeigen einen höheren Gehalt an immunpräzipitierten EGFP-Ras-Isoformen als die anderen PANC-1-Zellen. Eine gleichmäßige Beladung der Ansätze mit μ MACS™ anti-GFP *MicroBeads* konnte anhand der Mengen der leichten Ketten der IgG-anti GFP-Antikörper (*light chain IgG*) bestätigt werden ((A), Spur 1-6).

Der Blot in Abbildung 29 (A) zeigt den Nachweis des an den Ras-Protein-Isoformen gebundenen, transient exprimierten Galektin-8 short und des endogenen Galektin-8 long und Galektin-8 short. Da in diesem Versuch die kurze Isoform des Galektin-8 in den PANC-1-Zellen überexprimiert wurde, bindet folglich mehr Galektin-8 short an die EGFP-Ras-Mutanten als Galektin-8 long.

Die Co-Immünpräzipitationsversuche und die anschließende Immunblotuntersuchungen ergaben folgende Ergebnisse: Das in den PANC-1 endogene und überexprimierte Galektin-8 short bzw. das endogene Galektin-8 long interagiert unterschiedlich mit den vier untersuchten EGFP-Ras-Mutanten. Galektin-8 short interagiert am stärksten mit dem konstitutiv aktiven EGFP-K-Ras(G12V). Geringere Mengen Galektin-8 short konnten bei der Präzipitation von EGFP-HA-N-Ras(G12V) und EGFP-H-RasWildtyp nachgewiesen werden, wobei EGFP-H-Ras Wildtyp am wenigsten von den vier untersuchten Ras-Proteine mit Galektin-8 short interagiert. Die gleiche differentielle Interaktion mit den Ras-Isoformen konnte auch für das endogen vorhandene Galektin-8 long festgestellt werden. Die dominant negative Mutante EGFP-K-Ras(S17N) bindet stärker an die Galektin-8-Isoformen als EGFP-HA-N-Ras(G12V) und EGFP-H-RasWildtyp aber schwächer als EGFP-K-Ras(G12V). In den nur mit pEGFP/K-Ras(G12V) transfizierten Zellen konnte eine Interaktion sowohl des endogen vorhandenen Galektin-8 long als auch Galektin-8 short nachgewiesen werden. Hierbei scheint Galektin-8 long, dass im Lysat in geringerer Menge vorkommt als Galektin-8 short, stärker an EGFP-K-Ras(G12V) zu binden als Galektin-8 short.

3.5.2.4 Analyse der Galektin-8-short-Ras-Komplexe in HEK 293-Zellen

Analog zu den in Kapitel 4.5.2.2 beschriebenen Experimenten, wurde in den nächsten Versuchen die Bindungsfähigkeit der EGFP-Ras-Mutanten an Galektin-8 short in HEK 293-Zellen, in denen endogen kein Galektin-8 nachgewiesen werden konnte, untersucht. Die Experimente wurden unter den gleichen Bedingungen wie für Galektin-8 long durchgeführt.

Der Blot in Abbildung 30 (A) zeigt den Nachweis des ektop exprimierten und co-immunpräzipitierten Galektin-8 short in den HEK 293-Zellen (IP). Im selben SDS-Polyacrylamidgel wurden Aliquots der für die Immunpräzipitation verwendeten Zelllysate der co-transfizierten HEK 293-Zellen untersucht (Lysat). Zur Kontrolle der eingesetzten EGFP-Ras-Menge wurde 1/5 des Immunpräzipitationsansatzes in einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt (Abb. 30 (B)). Die Menge des EGFP-Ras ist in allen Ansätze gleichmäßig.

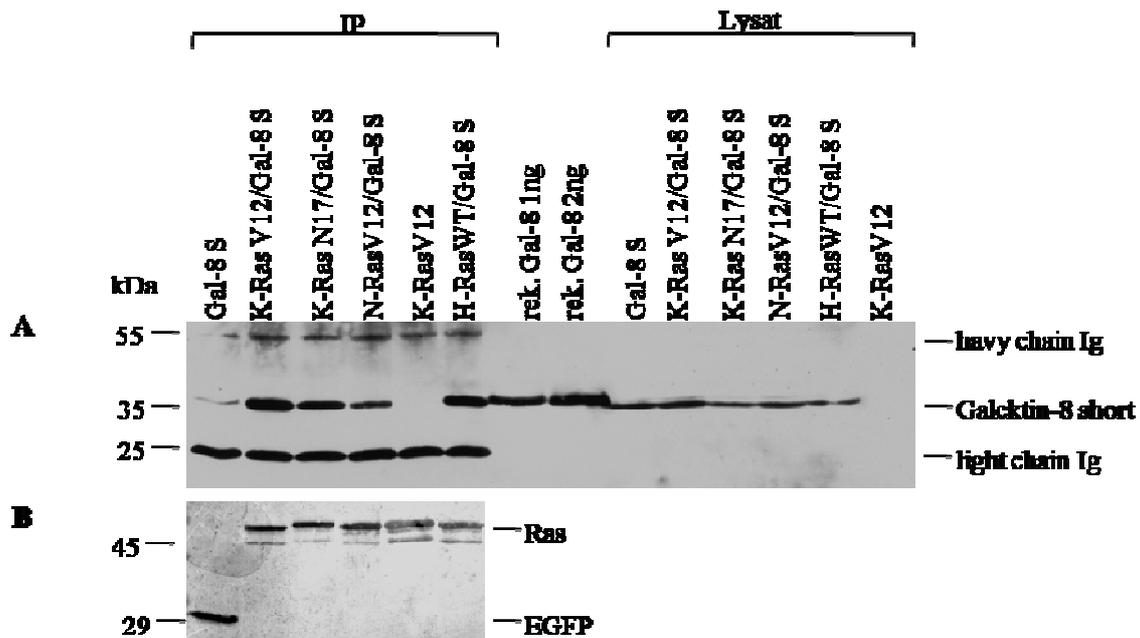


Abb. 30: Interaktion vom ektop exprimierten Galektin-8 short mit den EGFP-Ras-Isoformen in HEK 293-Zellen: HEK 293-Zellen wurden mit 10 µg pcDNA3/Kozak-Galektin-8 short bzw. je 5 µg von pEGFP/Ras-Plasmiden pEGFP/K-Ras(G12V), pEGFP-K-Ras(S17N), pEGFP/HA-N-Ras(G12V) und pEGFP/H-RasWildtyp ((A) Spur 2-4 und 6) transfiziert. Abhängig von der EGFP-Ras-Expression wurden 500 µg - 1000 µg von den Gesamtllysate mit je 40 µl µMACS™ anti-GFP inkubiert. Zwei Ansätze mit EGFP + -Galektin-8 short- und EGFP/K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1-Zellen wurden zur Kontrolle der Immunpräzipitation ebenso untersucht ((A), Spur 1 und 5). Die Proteinkomplexe wurden mit Hilfe des µMACS *Epitope Tagged Protein Isolation Kit* isoliert. Die eluierten Proteine wurden auf zwei Ansätze mit 4/5 (A) und 1/5 (B) der Gesamtmenge verteilt und behandelt. Die Spuren 9-14 im Gel (A) wurden mit jeweils 100 µg vom Lysat der co-transfizierten HEK 293-Zellen beladen. Zur Kontrolle der Spezifität des anti-Galektin-8-Antikörpers wurden im Gel 1,0 bzw. 2,0 ng des humanen rekombinanten Galektin-8 elektrophoretisch aufgetrennt (Spur 7 und 8). Der Nachweis des Galektin-8 erfolgt durch Anwendung eines monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörper, 1:2000 verdünnt und anschließender Behandlung mit einem zweiten Maus-Antikörper in der Verdünnung 1:10000 und Entwicklung mit ECL-Advance Lösung. In dem unteren Blot (B) wurden je 1/5 der Eluate im 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Behandeln mit einem monoklonaler Peroxidase-konjugierter anti-GFP-Antikörper in der Verdünnung 1:2000 wurden die Blot mit ECL entwickelt. Ein Proteinstandard ist links markiert. (Abkürzungen: rek. Gal-8: rekombinante Galektin-8; Gal-8L: Galektin-8 long; Gal-8S: Galektin-8 short; kDa: Kilodalton)

Da HEK 293-Zellen endogen keinen Galektin-8 long und Galektin-8 short exprimieren erscheint das extop exprimierte Galektin-8 short im Immunblotverfahren als Einzelbande.

Die Immunpräzipitationsanalyse der Galektin-8 short-Ras-Komplexe in den HEK 293-Zellen ergab vergleichbare Ergebnisse wie in den PANC-1-Zellen. Galektin-8 short bindet am stärksten an das konstitutiv aktive K-Ras(G12V). H-RasWildtyp bindet am schwächsten an die kurze Isoform des Galektin-8. Die Interaktion von Galektin-8 short an das dominant-negativ K-Ras(G17N) ist schwächer als an K-Ras(G12V). Die Bindungsfähigkeit der Ras-Isoformen an Galektin-8 short kann wie folgt in absteigender Reihenfolge dargestellt werden: K-Ras(G12V) >, K-Ras(S17N) > HA-N-Ras(G12V) > H-RasWT.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Bindungsanalyse des Galektin-8 short an die vier Ras-Isoformen in den PANC-1-Zellen überein (Kapitel 4.5.2.2).

Die in dem Kapitel 4.5.2 dargestellten Untersuchungen haben eine unterschiedliche Interaktion von Galektin-8 long und Galektin-8 short an die Ras-Isoformen EGFP-K-Ras, EGFP-N-Ras und EGFP-H-Ras bestätigt. Außerdem zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Galektin-8 Isoformen in ihrer Präferenz zu den unterschiedlichen Ras-Isoformen. Die gleichen Ergebnisse konnten auch durch Überexpression des Galektin-8 long oder Galektin-8 short in den PANC-1-Zellen, die diese zwei Isoformen auch endogen produzieren, erzielt werden.

Während das konstitutiv aktive EGFP-K-Ras(G12V) sowohl an Galektin-8 long als auch an Galektin-8 short am stärksten bindet, binden die anderen drei untersuchten Ras-Varianten geringer. Da das dominant negative K-Ras(S17N), das im Gegensatz zu EGFP-K-Ras(G12V) in der GDP-gebundenen Form vorliegt, schwächer mit Galektin-8 interagiert, könnte die Aktivität von Ras einen Einfluss auf die Bindung haben. H-RasWT bindet am schwächsten an die beiden Galektin-8-Isoformen. HA-N-Ras(G12V) bindet stärker als H-RasWildtyp und schwächer als K-Ras(G12V) und K-Ras(S17N) an Galektin-8 long bzw. Galektin-8 short.

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Ergebnisse erstmal eine differentielle Interaktion von Galektin-8 long und Galektin-8 short an den vier untersuchten Ras-Mutanten.

4. Diskussion

Das Pankreaskarzinom ist ein höchst aggressiver Tumor, der durch eine hohe Invasivität, hohe Metastasierungsrate und schlechte Prognose charakterisiert ist (Bardeesy und DePinho, 2002). Mittlerweile steht es in der globalen Krebsstodesstatistik an vierter Stelle, nach Bronchial-, Prostata- und Kolonkarzinom (American Cancer Society, Inc., Surveillance and Health Policy Research, 2009). Die neoplastische Transformation der Pankreaszelle wird ausgelöst durch eine kumulative Reihe von Ereignissen, die die Dysregulation der Zellwachstumsmechanismen, der Apoptose und des Zellzyklus, beinhaltet.

Die im Pankreaskarzinom am häufigsten beschriebenen genetischen Veränderungen betreffen das Protoonkogen *K-Ras* (Hruban *et al.*, 2000) und die Tumorsuppressorgene *p16* und *p53* (Huang *et al.*, 1996; DiGiuseppe *et al.*, 1994). Punktmutation im Kodon 12 der Protoonkogene *K-*, *N-* und *H-ras* führen zur Bildung von konstitutiv aktiven Onkogenen, die sich in vielen maligne Tumoren nachweisen lassen (Bos, 1988).

Die Forschungsgruppe um Elad-Sfadia konnten zeigen dass Mitglieder der Galektin-Familie selektiv an verschiedenen Ras-Isoformen binden und somit die Signaltransduktionswege in der maligne transformierten Zellen beeinflussen können (Elad-Sfadia *et al.*, 2002 und 2004). Galektine gehören zu der phylogenetisch konservierten Familie der Lektine, die spezifisch β -Galaktoside, meistens Glukokonjugate, die N-acetyl-Laktosamin-Reste enthalten, binden (Cooper, 2002; Lahm *et al.*, 2004; Liu und Rabinovich, 2005). Da Galektine an membranständigen Glykoproteinen binden können wird vermutet, dass diese Interaktionen die Adhäsion der Tumorzellen an andere Zellen und an die extrazelluläre Matrix modulieren. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass durch Hinzufügen von rekombinantem Galektin-1 oder -3 die Adhäsion von Tumorzellen, insbesondere von Harnröhrenkarzinomzellen an die extrazelluläre Matrix verhindert werden kann (Hughes *et al.*, 2001; Ochieng *et al.*, 2004; Kuwabara *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass lösliches Galektin-8 *in vitro* die Adhäsion von verschiedenen Zellen, unter anderem auch von Tumorzellen, wie zum Beispiel die nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzellen H1299, die Leberkarzinomzellen Fao und die Magenkarzinomzellen N87, an Zellkulturplatten nach zweistündiger Einwirkzeit inhibieren kann (Levy *et al.*, 2001). Hittellet und seine Arbeitsgruppe konnten nachweisen dass Galektine die Motilität von Kolonkarzinomzellen und die Tumordinvasion beeinflussen (Hittellet *et al.*, 2003).

Verschiedene Studien haben die Korrelation zwischen der Expression der Galektine in verschiedenen Tumorzellen und die Tumorprogression untersucht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Expression der Galektine vom Tumortyp abhängig ist (Lahm *et al.*, 2001; Satteli *et al.*, 2008).

Da die Galektine intra- und extrazellulär multiple und wichtige Funktionen aufweisen und oft in Tumorzellen überexprimiert werden (Oka *et al.*, 2004), wurden die Untersuchungen ihrer spezifischen Funktion in den Tumorzellen erweitert. Es konnte gezeigt werden, dass Galektine oft in Tumorzellen, meistens Zellen in denen physiologisch kein Galektin nachweisbar ist, überexprimiert werden und dieses häufig mit dem Ausmaß der Expression, der Tumorprogression und der Metastasierung korreliert. Xu und seine Arbeitsgruppe konnten bereits 1995 eine Korrelation zwischen der in den Schilddrüsenkarzinomzellen überexprimierte Galektin-1-Menge und den Tumorstadium des Karzinoms nachweisen (Xu *et al.*, 1995). Später konnte auch für das Uterussarkom, das Kolonkarzinom und das Gliom eine positive Korrelation nachgewiesen werden (Bresalier *et al.*, 1998; Schwarz *et al.*, 1999; Yamaoka *et al.*, 2001). Die Galektin-3-Expressionsanalyse in verschiedene Progressionsstadien von Karzinome zeigte eine positive Korrelation für das Magen-, Leber- und Schilddrüsenkarzinom (Lotan *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1999).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einige Galektine unterexprimiert werden, wenn der Tumor sich in einem fortgeschrittenen Stadium befindet oder bereits Metastasen nachgewiesen werden können. Dies gilt hauptsächlich für Zellen, die physiologisch eine hohe Galektin-Menge aufweisen (van den Brule *et al.*, 2004). So konnte gezeigt werden, dass die Galektin-1-Menge in Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region, die in einem höheren Stadium diagnostiziert wurden, geringer ist als in den frühen Stadien und im gesunden Gewebe. Die gleiche negative Korrelation gilt auch für Galektin-3 in den Zellen vom Uterus-, Brust- und Pankreaskarzinom (Castronovo *et al.*, 1996; Schwarz *et al.*, 1999; Shimamura *et al.*, 2002)

Galektin-1 und Galektin-3 und deren Expression in den Tumorzellen können als Prognosefaktor und Marker für einen Therapieerfolg in einigen Karzinomarten benutzt werden (van den Brule *et al.*, 2004). Satteli und seine Arbeitsgruppe schlagen 2008 Galektin-3 als Tumormarker für das Brust- und Kolonkarzinom vor (Satteli *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit wurde die Expression von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8-Isoformen in verschiedenen Pankreaskarzinomzellen, einer Brustkarzinom-, einer Kolonkarzinom-, und

einer embryonalen Nierenzelllinie untersucht. Des Weiteren wurde durch ektope Expression der Proteine die Interaktion der drei Ras-Isoformen H-Ras, K-Ras und N-Ras, und der Galektin-8-Isoformen in PANC-1-Zellen und HEK 293-Zellen untersucht, um die Bedeutung dieser Galektine für das Pankreaskarzinom weiter zu analysieren.

4.1 Quantifizierung der Expression der Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8-Isoformen in verschiedenen Pankreaskarzinomzellen

Die spezifisch β -Galaktosid-bindenden Galektine gehören zu der Familie der Lektine (Cooper, 2002; Lahm *et al.*, 2004; Liu und Rabinovich, 2005). Galektine enthalten eine oder zwei identische Domänen (130 Aminosäuren), die für diese Carbohydratbindung verantwortlich sind und die CRD's (*carbohydrate-recognition domains*) genannt werden. Galektin-1 gehört zur Gruppe der Galektin-Prototypen mit einem CRD, Galektin-3 zu der Gruppe der chimären-Galektine, mit nur einer CRD-gebunden an einer prolin-, glyzin-, und tyrosinreichen Kette (120 Aminosäuren), und Galektin-8 enthält zwei CRD's und bildet die Gruppe der *tandem repeat*-Galektine (Liu und Rabinovich, 2005).

Mitglieder der Galektin-Familie konnten sowohl in verschiedene Gewebe der Säugetiere als auch in Schwämmen, Nematoden, Insekten, Fischen und Vögeln nachgewiesen werden. Da Galektine während der Evolution erhalten blieben und eine ubiquitäre Verbreitung im Tierreich aufweisen, kann man vermuten, dass diese unentbehrlich für das Überleben sind (Cooper, 2002).

In dieser Arbeit wurde die Proteinexpression der zwei Galektine, Galektin-1 und Galektin-3 sowie der Galektin-8-Isoformen mittels Immunblotverfahren im RIPA-Gesamtlysat von 12 Zelllinien - neun Pankreaskarzinom- (PANC-1, AsPc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, Patu 8902, Patu 8988s und Patu 8988t), eine Mammakarzinom- (MCF-7), eine Kolonkarzinom- (SW480) und eine embryonale Nierenzelllinie (HEK 293)- untersucht. Außerdem wurde die subzelluläre Verteilung der drei Galektine in der membranären und zytosolischen Fraktion der Zellen analysiert.

Die Untersuchungen zeigten dass Galektin-1 in den meisten untersuchten Zelllinien exprimiert wird. Die Ausnahme machen die Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie Patu 8988s

und der embryonalen Nierenzelllinien HEK 293, in denen kein Galektin-1 nachgewiesen werden konnte. Hohe Mengen an Galektin-1 exprimierten die Pankreaskarzinomzellen PANC-1, MiaPaCa-2 und Patu 8898t und die SW480-Kolonkarzinomzellen. Dagegen konnte in den anderen Zelllinien eine geringere Menge Galektin-1 nachgewiesen werden. Dazu gehören die Zelllinien Capan-1 und -2 und Patu 8902. Durch die densitometrische Analyse der einzelnen Banden im Immunblot konnte gezeigt werden, dass die MiaPaCa-2 Pankreaskarzinomzellen die größte Menge Galektin-1 (0,851 ng/ μ g RIPA-Lysat) aufweisen. Die Expression von Galektin-1 in den SW480-Kolonkarzinomzellen konnte auch von der Arbeitsgruppe um Lahm nachgewiesen werden (Lahm *et al.*, 2001), eine Analyse der Galektin-1-Expression in Pankreaskarzinomzellen ist bisher nicht dokumentiert.

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung von Galektin-1 wurden die Zelllysate mittels Ultrazentrifugation in eine zytosolhaltigen und eine membranhaltigen Fraktion getrennt. Mittels Immunblotverfahren konnte gezeigt werden, dass Galektin-1 ausschließlich in der membranhaltigen Fraktion lokalisiert ist. In den Patu 8898s- und HEK 293-Zellen konnte wiederum kein Galektin-1 nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Sato konnte 1993 Galektin-1 und -3 ausschließlich im Zytosol von Zellen, die aus einer Hamsterniere stammten, nachweisen (Sato *et al.*, 1993). Erst etwa 10 Jahre später konnte gezeigt werden, dass sich die subzelluläre Lokalisation der Galektine, insbesondere von Galektin-1 und -3 während der Umwandlung vom normalen zum malignen Phänotyp (zum Beispiel von einer zytosolischen in eine membranäre Lokalisation) ändert. Diese Lokalisationsänderung könnte tumorspezifisch sein (van den Brule *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurden ausschließlich Tumorzellen untersucht. Lediglich die HEK 293-Zelllinie stammt aus einer embryonalen Niere. Für die HEK 293-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese weder Galektin-1, noch Galektin-3 oder Galektin-8 exprimieren.

Die Ergebnisse zur Lokalisation des Galektin-1 in den Karzinomzellen der untersuchten Zelllinien stimmen mit den publizierten Daten überein.

Hahn und seine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Galektin-1 die Apoptose, durch Bindung an mitochondrialen Enzymen, wie zum Beispiel an der Endonuklease G und Aktivierung von apoptotischen Signalwege, induzieren kann (Hahn *et al.*, 2004). Eine positive Korrelation zwischen der Galektin-1-Expression und dem Tumorstadium konnte die Arbeitsgruppe von Bresalier für das Kolonkarzinom aufzeigen (Bresalier *et al.*, 1998). Außerdem konnte in verschiedenen Studien die Überexpression des Galektin-1 in Tumorzellen, wie zum Beispiel in Schilddrüsen- und Uteruskarzinomzellen nachgewiesen werden. Quantitativ korreliert die

Stärke der Galektin-1-Expression sowohl mit einem späten Stadium dieser Karzinome als auch mit einer frühen Metastasierung und einer schlechteren Prognose (Liu und Rabinovich, 2005; Camby *et al.*, 2006). Ob diese Korrelation auch für das Pankreaskarzinom zutrifft, muss in weiteren Studien durch die Analyse von primärem Pankreaskarzinomproben geklärt werden.

Des Weiteren wurde die Expression von Galektin-3 im RIPA-Gesamtlysat der Zelllinien im Verlauf der vorliegenden Arbeit untersucht. Mittels Immunblotverfahren und densitometrische Analyse der einzelnen Banden konnte gezeigt werden, dass die Pankreaskarzinomzellen AsPc-1 (0,419 ng/µg RIA-Lysat) und Capan-2 (0,476 ng/µg RIA-Lysat) und die Mammakarzinomzellen MCF-7 (0,383 ng/µg RIA-Lysat) die größte Menge Galektin-3 aufweisen. Geringere und ungefähr gleiche Mengen Galektin-3 sind in den Zellen MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1, Patu 8902, Patu 8988s und SW480 nachweisbar. Galektin-3 konnte in den Pankreaskarzinomzellen PANC-1 und die embryonalen Nierenzellen HEK 293 nicht nachgewiesen werden.

Die Analyse der subzellulären Verteilung des Galektin-3 in den untersuchten Zelllinien brachte unterschiedliche Ergebnisse. Eine membranäre Lokalisation für Galektin-3 konnte in den Patu 8902- und BxPC-3-Zellen nachgewiesen werden. In Patu 8988s- und SW480-Karzinomzellen konnten auch in der zytosolischen Fraktion kleine Mengen Galektin-3 nachgewiesen werden. Eine gleichmäßige Verteilung von Galektin-3 in der membranären und zytosolischen Fraktion zeigen die Pankreaskarzinomzelllinien AsPc-1, MiaPaCa-2, Capan-1 und-2 und die Mammakarzinomzelllinie MCF-7.

Galektin-3 gehört zur sogenannten Gruppe der chimären Galektine. Eine der wichtigsten Funktionen des Galektin-3 ist die anti-apoptotische Eigenschaft. Der Mechanismus durch den das intrazelluläre Galektin-3 die Apoptose der Zelle verhindern kann, konnte bis heute noch nicht erklärt werden. Man vermutet eine Interaktion mit Regulatoren der Apoptose, einschließlich derer, die in den Mitochondrien lokalisiert sind. Die anti-apoptotische Eigenschaft des Galektin-3 ist sehr wahrscheinlich von der Phosphorylierung des Ser6 abhängig (Hsu *et al.*, 2006). Die Wirkung von Galektin-3 auf die Apoptose wird interessanterweise von dessen zellulären Lokalisation bestimmt. Befindet sich Galektin-3 im Zytoplasma übt es eine anti-apoptotische Wirkung aus. Im Nukleus vermittelt Galektin-3 einen apoptotischen Effekt. Diese Studien belegen, dass Galektin-3 in Abhängigkeit von seiner Lokalisation in der Zelle, unterschiedliche Funktionen ausüben kann (van den Brule *et al.*,

2004). Liu und seine Arbeitsgruppe konnte 2005 zeigen, dass die Expression von Galektin-3 für die Transformation der Zellen zu einem malignen Phänotyp und für das Tumorwachstum unverzichtbar ist (Liu und Rabinovich, 2005). Eine negative Korrelation mit dem Tumorstadium von Pankreaskarziomzellen konnte 2002 in der Arbeitsgruppe von Shimamura nachgewiesen werden (Shimamura *et al.*, 2002). Kontroverse Ergebnisse im Bezug auf eine Korrelation zwischen der Galektin-3-Expression und Kolonkarzinomstadium zeigten verschiedene Studien (Lotz *et al.*, 1993; Schoeppner *et al.*, 1995, Ma und Geng, 2002), sodass hier keine eindeutige Aussage möglich ist.

Die dritte Galektin-Isoform, die im Rahmen dieser Arbeit näher analysiert wurde ist Galektin-8, das im Immunblotverfahren als Doppelbande nachgewiesen wurde. Die zwei immunreaktiven Proteine haben ein apparentes Molekulargewicht von 36 kDa und 40 kDa und wurden als Galektin-8 short bzw. Galektin-8 long bezeichnet. Durch densitometrische Analysen konnte gezeigt werden, dass Galektin-8 long und short besonders in den Pankreaskarzinomzellen PANC-1 (0,017 ng/ μ g RIPA-Lysat) exprimiert werden. AsPc-1- und Capan-1-Zellen enthalten nur geringe Mengen Galektin-8. Die embryonalen Nierenzellen HEK 293 exprimieren kein Galektin-8. Die Expression von Galektin-8 in den SW480-Kolonkarzinomzellen konnte auch von der Arbeitsgruppe um Lahm nachgewiesen werden (Lahm *et al.*, 2001).

Durch die Analyse der subzellulären Verteilung in den Zellen konnte gezeigt werden, dass die Galektin-8-Isoformen prädominant in der membranhaltigen Fraktion lokalisiert sind. Die zytosolhaltige Fraktion enthält wenig bis kein endogenes Galektin-8. Während die BxPC-3-Zellen kein Galektin-8 long aufweisen, konnte in den anderen Zelllinien sowohl Galektin-8 long als auch die kurze Isoform Galektin-8 short nachgewiesen werden. Die Galektin-8-Analyse zeigt des Weiteren dass die untersuchten Zellen stärker Galektin-8 short als Galektin-8 long exprimieren.

Die Funktion von Galektin-8 wurde intensiv in verschiedene Studien untersucht. Galektin-8 spielt eine wichtige Rolle im Tumorwachstum und Metastasierung des Kolonkarzinoms. Dieses konnte in Kolonkarzinomzellen durch exogen zugefügtes Galektin-8 *in vitro* nachgewiesen werden. In diesem experimentellen Ansatz führte das exogene Galektin-8 zu einer Suppression der Tumorzellmigration. Eine starke Expression von Galektin-8 korreliert mit einem niedrigeren Tumorstadium des Kolonkarzinoms (Nagy *et al.*, 2002). Als ein

mögliche Mechanismus kann die Bindungsfähigkeit von Galektin-8 an Integrine angesehen werden, die die Zelladhäsion und die Apoptose der Tumorzellen regulieren (Zick *et al.*, 2004). Galektin-8 konnte bereits 1997 im Zytosol von nicht-maligne transformierten Zellen identifiziert werden (Cooper *et al.*, 1997). In den Zellen eines Plattenepithelkarzinoms der Lunge konnte nachgewiesen werden, dass Galektin-8 nach 48-stündiger Kulturanzüchtung hauptsächlich in der membranären Fraktion und nach 96 Stunden im Nukleus nachweisbar ist (Bidon *et al.*, 2001). Diese Erkenntnisse führen zu der Annahme dass Galektin-8 abhängig von der subzellulären Lokalisation unterschiedliche Funktionen in der maligne transformierten Zellen ausüben kann. Die Änderung der Lokalisation könnte Galektin-8 neue Funktionen in der malignen Zelle verleihen und somit einen Einfluss auf die Tumorprogression haben.

4.2 Analyse der Galektin-8 cDNA und Identifizierung der zwei Isoformen – Galektin-8 long und Galektin-8 short

Da Galektin-8 im Immunblotverfahren als Doppelbande identifiziert werden konnte, wurde, um einen Hinweis auf die Identität dieser zwei Galektin-8-Banden zu erhalten deren cDNA mittels PCR amplifiziert und durch Sequenzierung identifiziert. Für diese Untersuchungen wurden sechs Zelllinien ausgesucht (PANC-1, AsPc-1, MiaPaCa-2, SW480, Patu 8988t und Patu 8902). Bereits 2001 konnte Bidon mehrere Galektin-8 mRNAs identifizieren, die durch alternatives Spleißen des Galektin-8-Transkripts entstehen (Bidon *et al.*, 2001). Diese mRNAs kodieren für mindestens sechs Galektin-8 Isoformen: drei Formen, die zwei CRDs und drei Formen, die nur eine CRD enthalten (Bidon-Wagner *et al.*, 2004). Durch den Vergleich der in dieser Arbeit identifizierten Sequenzen mit denen in den Nukleotiden-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) vorhandenen und publizierten Sequenzen (Su *et al.*, 1996; Cueni und Detmar, 2009) konnten zwei Varianten des Galektin-8 identifiziert werden. Die zwei Varianten des Galektin-8 entsprechen der Transkriptvariante 1 für die lange (long) Galektin-8-Isoform (NCIB Referenzsequenz NM_006499.3) und der Transkriptvariante 2 für die kurze (short) Galektin-8-Isoform (NCIB Referenzsequenz NM_201543.1).

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Galektin-8 long-cDNA besteht vom ATG-Translationsstart bis zum TAG Stopp-Codon aus 1145 Basenpaaren, die für 359 Aminosäuren kodieren (siehe Abbildung 17 und 18). Die Galektin-8 short-cDNA besteht vom ATG-Translationsstart bis zum TAG Stopp-Codon aus 956 Basenpaaren, die für 317 Aminosäuren kodieren. Die Unterschiede dieser zwei Varianten konnten sowohl auf Basenpaar- als auch

auf Proteinebene identifiziert werden. Die Aminosäuresequenz des Galektin-8 long ist um 42 Aminosäuren, die dem Exon 11 zwischen den Basenpaare 550 und 698 auf cDNA-Ebene entsprechen, länger als die des Galektin-8 short.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die sechs untersuchten Zelllinien die oben beschriebenen Galektin-8-Isoformen exprimieren. Zur Identifikation der zwei Galektin-8-Isoformen wurden drei unterschiedliche Primer für die PCR-Analyse verwendet. Durch die Verwendung dieser Primer konnte keine weitere Galektin-8-Isoform identifiziert werden. Die Frage, ob die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien neben den zwei Galektin-8-Isoformen weitere Transkripte aufweisen oder ob die hier verwendeten Primer nicht geeignet waren, um weitere Isoformen zu identifizieren, kann nur durch weitere Untersuchungen unter Verwendung von anderen Primerpaaren beantwortet werden. Der Nachweis von nur zwei Isoformen im Immunblot deutet allerdings nur auf die Translation von zwei Transkriptvarianten hin.

4.3 Identifizierung von Galektin-8 als Interaktionspartner von Ras-Isoformen

Ras-Proteine gehören zur Gruppe der membranassoziierten Guaninnukleotid-bindenden Proteine. Ihre Funktion ist die Transduktion von Signalen membranständiger Rezeptoren an intrazellulären Signalkaskaden, indem sie als molekulare Schalter zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen und einer aktiven GTP-gebundenen Konformation wechseln (Giehl, 2005). Ras wirkt als Bindeglied zwischen membranständigen Rezeptoren wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), und nachgeschalteten zellulären Signalkaskaden (Giehl *et al.*, 2000; Janssen, 2003). Drei *ras*-Gene, die auf unterschiedlichen Genloci lokalisiert sind, wurden im menschlichen Genom identifiziert: *H-ras* (Chromosom 11 – 11p15-p15.5), *N-ras* (Chromosom 1 – 1p22-p32) und *K-ras* (Chromosom 12 – 12p12.1-pter) (Barbacid, 1987). Letzteres wird in zwei alternative Varianten gespleißt: K-Ras4A und K-Ras4B, die sich in den letzten, durch Exon 4 kodierten, 25 Aminosäuren unterscheiden (Barbacid, 1987; Koshravi-Far *et al.*, 1998). Die *ras*-Gene sind hoch konserviert und werden ubiquitär exprimiert. Da K-Ras4A in humanen Zellen nur in sehr geringem Maße exprimiert wird (Shimizu *et al.*, 1983), wird in dieser Arbeit der Begriff „K-Ras“ als Synonym für K-Ras4B verwendet.

Die Ras-Isoformen weisen multiple Unterschiede, sowohl auf Aminosäuresequenzebene als auch in deren subzellulären Lokalisation auf. Hinweise auf die unterschiedliche Funktion der

vier Ras-Isoformen ergaben Studien zur Lokalisation in der Plasmamembran. So konnte gezeigt werden, dass K-Ras4B in den *non-raft*-Domänen lokalisiert ist, während sich H-Ras sowohl in den *lipid-rafts*- als auch in den *non-rafts*-Domänen befindet (Prior *et al.*, 2001). Diese und weitere Befunde führten zu der Annahme, dass die Ras-Isoformen unterschiedliche Funktionen haben. Des Weiteren interagieren die vier Ras-Isoformen mit verschiedenen Bindungspartnern. So konnte Paz 2001 und Elad-Sfadia 2002 und 2004 die differentielle Interaktion der Ras-Proteine mit Galektin-1 und Galektin-3 identifizieren. Durch diese Interaktion können Galektine Einfluss auf die Signaltransduktion der Zellen haben (Rabinovich, 1999). Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass Galektin-3 selektiv an K-Ras-GTP bindet und dadurch die Aktivität von K-Ras und PI3-K verlängern kann (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Für Galektin-1 konnte die Bindung an GTP-gebundenes H-Ras(G12V) und K-Ras(G12V) nachgewiesen werden, was zur Steigerung der Aktivität von c-Raf und ERK1/2 führt (Elad-Sfadia *et al.*, 2002; Paz *et al.*, 2001).

Da bereits in der publizierten Literatur die Interaktion zwischen Ras und Galektin-1 bzw. Galektin-3 nachgewiesen wurde, war ein Ziel dieser Arbeit eine mögliche Interaktion zwischen Galektin-8 und Ras-Isoformen zu untersuchen.

Die Interaktion des Galektin-8 mit K-Ras(G12V) in den PANC-1-Zellen wurde in unserer Arbeitsgruppe von Monika Unger in ihrer Dissertation („Charakterisierung des Einflusses von konstitutiv aktivem K-Ras(G12V) auf die Signaltransduktion und die Migration von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen“, Universität Ulm, 2004) beschrieben. Mit Hilfe von *in vitro*-Bindungsstudien unter Verwendung von rekombinanten, HA-Epitop-markierten Ras-Proteinen und PANC-1-Lysaten konnte sie Galektin-8 als bisher unbekannter, Isoform-spezifischer Interaktionspartner von konstitutiv aktivem K-Ras(G12V) identifizieren. Die Bindung von Galektin-8 an HA-K-Ras(G12V) konnte sowohl durch die massenspektrometrischen Analysen als auch mit spezifischen Antikörpern im Immunblotverfahren nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde die Bindungsfähigkeit der zwei Galektin-8-Isoformen, Galektin-8 long und Galektin-8 short an die vier Ras-Isoformen bzw. Mutanten K-Ras(G12V), K-Ras(S17N), HA-N-Ras(G12V) und H-Ras Wildtyp (WT) untersucht, die als EGFP-Fusionsproteine in PANC-1- und in HEK 293-Zellen in Kombination mit jeweils einer Galektin-8-Isoform ektop exprimiert wurden. Zum Nachweis der Bindung wurden Co-immunpräzipitationsuntersuchungen durchgeführt, die die Isolierung der Ras-Galektin-8-

Komplexe aus einem Zelllysat mit Hilfe von anti-GFP-Antikörper-haltigen, magnetischen *MicroBeads* ermöglichten.

Die Untersuchungen zeigten eine unterschiedliche Bindungsfähigkeit der Galektin-8-Isoformen an die vier Ras-Isoformen. Während das GTP-gebundene konstitutiv-aktive K-Ras(G12V) sowohl an Galektin-8 long als auch an Galektin-8 short stark bindet, bindet das GDP-gebundene dominant-negative K-Ras(S17N) schwächer an diese beiden Isoformen. Am schwächsten bindet wildtypisches H-Ras an die Galektin-8-Isoformen. HA-N-Ras(G12V) bindet stärker als H-RasWT, jedoch schwächer als HA-K-Ras(G12V). Außerdem ist hervorzuheben, dass kein Unterschied in der Bindung der Ras-Isoformen an die unterschiedlichen zwei Galektin-8-Isoformen Galektin-8 long und Galektin-8 short beobachtet werden konnte. Des Weiteren konnten keine zelltypspezifischen Unterschiede in der Bindungsfähigkeit von Galektin-8 an Ras durch Überexpression in den PANC-1 und durch die ektope Expression in den HEK 293-Zellen festgestellt werden. Sowohl das ektope überexprimierte als auch das endogen exprimierte Galektin-8 long bzw. Galektin-8 short interagiert in gleichem Maße differentiell mit den vier Ras-Isoformen.

Verschiedene Hypothesen können im Bezug auf die Bedeutung und Funktion dieser Interaktion aufgestellt werden. Da Galektin-8 sowohl in der löslichen als auch in der partikulären und damit membranären Fraktion der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage wo der Ras-Galektin-8-Komplex lokalisiert ist. Eine Möglichkeit besteht darin, dass das zytosolische Galektin-8 durch die Bindung an die Ras-Proteine das onkogene Ras im Zytosol hält und somit dessen Funktionen in der Signaltransduktion inaktiviert. Um diese Hypothese überprüfen zu können, könnte man durch *in vitro*-Bindungsstudien die Galektin-8-K-Ras-Komplexe aus der löslichen und partikulären Fraktion präzipitieren und durch spezifische anti-Galektin-8-Antikörper im Immunblotverfahren nachweisen. Andererseits könnte ein membranärer Galektin-8-Ras-Komplex zu einer verstärkten oder verlängerten Aktivierung von Ras- insbesondere K-Ras-abhängigen Signaltransduktionswegen führen. Da Galektin-3 durch Bindung an K-Ras-GTP die Aktivität von K-Ras und nachfolgend der PI3-K verlängert (Elad-Sfadia *et al.*, 2004) und Galektin-1 durch Bindung an H-Ras(G12V) und K-Ras(G12V) die Aktivität von Raf und ERK1/2 steigert (Elad-Sfadia *et al.*, 2002; Paz *et al.*, 2001), kann man die Hypothese stellen, dass der Galektin-8-K-Ras-Komplex möglicherweise auch diese Signaltransduktionswege beeinflusst. Um eine mögliche Beeinflussung von Signaltransduktionswegen zu untersuchen,

sollte die Aktivität von Ras und Ras-abhängigen Signaltransduktionsproteine und Kaskaden nach Expression bzw. Inhibition der Expression der Ras-Isoformen, bzw. der Galektion-8-Isoformen bestimmt werden. Hierzu könnten sowohl transiente Transfektionen mit Expressionsplasmiden als auch mit spezifische Ras- und Galektin siRNA Oligonukleotiden durchgeführt werden.

Die Arbeitsgruppe um Paz konnte 2001 Galektin-1 als Bindungspartner für H-Ras(G12V) identifizieren. Dieser neue Bindungspartner für H-Ras(G12V) konnte sowohl durch Isolierung des H-Ras(G12V)-Galektin-1-Komplexes und anschließender MonoQ Chromatography-Analysen als auch durch die in dieser Arbeit durchgeführten Co-Immunpräzipitation-Verfahren nachgewiesen werden (Paz *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass diese Interaktion intrazellulär unabhängig von der Eigenschaft β -Galaktoside zu binden, stattfindet. Interessanterweise konnte Paz und seine Arbeitsgruppe beweisen, dass H-Ras(G12V) an Galektin-1 bindet und nicht umgekehrt. Die Entstehung des H-Ras(G12V)-Galektin-1-Komplexes ist essentiell für die Bindung von H-Ras(G12V) an die Zellmembran und somit auch für die Transformation und Umwandlung der Zelle in einem malignen Phänotyp (Paz *et al.*, 2001; Hancock *et al.*, 2003).

Drei Jahre später, 2004, untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe, die Bindungsfähigkeit eines anderen Lektin, Galektin-3, an Ras-Proteinen. Die Untersuchungen zeigten auch in diesem Fall dass eins der Ras-Proteine, K-Ras(G12V), spezifisch mit Galektin-3 interagiert. Darüber hinaus beeinflusst diese Bindung die Ras-inizierten Signaltransduktionswege, indem es die Aktivität von ERK dämpft und die des PI3-K verlängert (Elad-Sfadia *et al.*, 2004).

Die Rolle der Interaktion zwischen Ras, insbesondere K-Ras und Galektin-8-Isoformen sollte in weiteren Analysen untersucht werden. Da K-Ras-Proteine verschiedene Signaltransduktionswege, die in der Tumorentstehung und Metastasierung eine entscheidende Rolle spielen, beeinflussen, sollten weitere Untersuchungen den Einfluss des Proteinkomplexes K-Ras-Galektin-8 auf diese Signaltransduktionswege aufklären. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Galektin-8 eine wichtige Rolle im Tumorwachstum und Metastasierung, besonders des Kolonkarzinoms (Nagy *et al.*, 2002) spielt. Interessant wäre zu erfahren, ob der Proteinkomplex K-Ras-Galektin-8 verantwortlich für diese Funktion des Galektin-8 ist und ob dieses auch auf Pankreaskarzinomzellen zutrifft. Dazu könnte man nach Überexpression des Galektin-8 in Karzinomzellen, die Migration, Proliferation und Adhäsion im Vergleich zu Karzinomzellen, die Galektin-8 nicht enthalten analysieren.

Des Weiteren könnte man durch Inhibition der Galektin-8 Expression mittels spezifischer siRNAs in Zellen die endogen Galektin-8 enthalten, den Einfluss von Galektin-8 auf die Migration, Proliferation und Adhäsion der Zellen untersuchen.

Paz und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Menge an H-Ras(G12V), die an Galektin-1 binden kann, der Menge entspricht, die von den Zellen exprimierten H-Ras(G12V). Dagegen bindet nicht das gesamte exprimierte Galektin-1 an H-Ras(G12V) (Paz *et al.*, 2001). Da aufgrund der publizierten Daten davon ausgegangen werden kann, dass sowohl Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 an K-Ras binden können, konkurrieren vermutlich die drei Galektine um die Bindung an K-Ras. Um diese Hypothese zu überprüfen müsste der K-Ras-Galektin-8-Komplex in verschiedenen humanen Tumorzellen, die unterschiedliche Mengen Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 enthalten untersucht werden. Außerdem könnten durch Verdrängungsstudien mittels Überexpression der verschiedenen Ras-Isoformen bzw. Galektin-Isoformen Präferenzen in der Interaktion bestimmt werden.

Da HEK 293-Zellen endogen weder Galektin-1 noch Galektin-3 oder Galektin-8 aufweisen, könnte man vermuten, dass hier die Ras-Proteine unabhängig von diesen ihre Funktion ausüben. Die ektope Expression des Galektin-8 in den HEK 293-Zellen führt zu der Bildung des Galektin-8-Ras-Komplexes. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die Ras-Proteine mit dem ektop exprimierten Galektin-8 auch in Zellen, die dieses Protein endogen nicht produzieren interagieren. Ob durch die ektope Expression des Galektin-8 in den HEK 293-Zellen und die Bildung des Galektin-8-Ras-Komplexes das endogene Ras in seiner Aktivität und damit Funktion beeinflusst wird, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Welche Rolle Galektin-8 und die Bildung des Galektin-8-K-Ras-Komplexes für die Entstehung und die Progression von Pankreaskarzinomen spielt, konnte bis heute noch nicht aufgeklärt werden. Um eine mögliche Korrelation zwischen der Expression von Galektin-8 bzw. der Stärke der Galektin-8-Ras-Interaktion und der Progression des Pankreaskarzinom zu finden, könnte die Expression und die Ras-Interaktion des Galektin-8 in verschiedenen Stadien der Tumorgenese des Pankreaskarzinoms untersucht werden. Bereits 2005 deutete Stillman und Mitarbeiter auf die Rolle der Galektine als Tumormarker und deren therapeutische Bedeutung hin (Stillman *et al.*, 2005). Ob in Zukunft Galektine und insbesondere Galektin-1, Galektin-3 oder Galektin-8 durch deren Synthesehemmung oder –stimulierung zur wertvollen Therapieoption der Tumorerkrankungen werden, müssen weitere Experimente und Studien zeigen.

Die vorliegende Arbeit bringt neue Hinweise auf die Funktion des Galektin-8 in der Tumorgenese und könnte dazu beitragen, die komplexen molekularen Mechanismen die zur Entstehung des malignen Phänotyps der Pankreaszellen führen zu klären.

5. Zusammenfassung

Das duktales Pankreaskarzinom zählt heutzutage zu der aggressivsten Tumorart des menschlichen Organismus. Sowohl die rasche Wachstumsrate und die frühe Metastasierung als auch der Mangel an Früherkennungsmethoden und Therapiemöglichkeiten führen zu einer hohen Mortalität. Aktivierende Mutationen im *K-ras*-Gen zählen zu den häufigsten genetischen Veränderungen der Pankreaskarzinomzellen. Die Rolle der aktivierten K-Ras-Proteine konnte bis heute nur teilweise erklärt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Lektine Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8, die multiple Funktionen in der Tumorentstehung und Metastasierung verschiedener Tumorentitäten aufweisen, in Pankreaskarzinomzellen charakterisiert. Hierzu wurde die Expression von Galektin-1, -3 und -8 in Gesamtlysaten und subzellulären Fraktionen von neun verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien, einer Kolonkarzinom-, einer Brustkarzinom- und einer embryonale Nierenzelllinien analysiert und quantifiziert. Die Untersuchungen ergaben unterschiedliche Galektin-Expressionsmengen in den verschiedenen Zelllinien. Während in der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 eine hohe Menge Galektin-1 und -8, aber kein Galektin-3 nachweisbar war, konnten in anderen Pankreaskarzinomzelllinien alle drei untersuchten Galektine nachgewiesen werden. In den embryonalen Nierenzellen HEK 293 konnten weder Galektin-1 noch Galektin-3 oder -8 auf Proteinebene detektiert werden. Da Galektin-8 im Immunblotverfahren als Doppelbande identifiziert werden konnte, wurde die Identität dieser zwei Banden näher charakterisiert. Durch Analyse der kodierenden Desoxyribonukleinsäure des Galektin-8 mittels Polymerase-Kettenreaktion-Verfahren in verschiedenen Zelllinien und dem Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit Sequenzen in den Nukleotiden-Datenbanken und publizierten Sequenzen konnten die zwei Galektin-8-Isoformen Galektin-8 long und Galektin-8 short identifiziert werden. Diese beiden Galektin-8-Isoformen unterscheiden sich in der Expression von Exon 11, zwischen den Basenpaare 550 und 698, wodurch sie einen Unterschied von 42 Aminosäuren aufweisen.

Um zu analysieren, ob die zwei Galektin-8-Isoformen mit den vier Ras-Proteinen K-Ras(G12V), K-Ras(G17N), HA-N-Ras(G12V) und H-Ras (Wildtyp) interagieren, wurden beide Galektin-8 Isoformen in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 kloniert und in PANC-1- und HEK 293-Zellen exprimiert. Durch Co-Immunpräzipitationsanalysen konnte anschließend im Immunblotverfahren die Interaktion der Galektin-8 Isoformen mit den Ras-Isoformen dargestellt werden. Hierbei zeigte sich, dass die Galektin-8-Isoformen unterschiedlich mit den vier Ras-Proteinen interagieren. Während Guanosintriphosphat-

gebundenes konstitutiv-aktives K-Ras(G12V) sowohl an Galektin-8 long als auch an Galektin-8 short stark bindet, interagiert GDP-gebundenes dominant-negatives K-Ras(S17N) schwächer mit diesen beiden Isoformen. HA-N-Ras(G12V) bindet stärker als wildtypisches H-Ras, jedoch schwächer als K-Ras(G12V). Am schwächsten bindet wildtypisches H-Ras an die Galektin-8-Isoformen. Die Untersuchungen zeigten außerdem, dass die zwei Isoformen Galektin-8 long und Galektin-8 short in gleichem Maße mit den vier Ras-Isoformen interagieren. Des Weiteren konnten keine zelltypspezifischen Unterschiede in der Bindungsfähigkeit von Galektin-8 an Ras durch Überexpression in PANC-1 und durch die ektope Expression in den HEK 293-Zellen festgestellt werden. Sowohl das ektope überexprimierte als auch das endogen exprimierte Galektin-8 long bzw. Galektin-8 short interagiert in gleichem Maße differentiell mit den vier Ras-Proteinen.

In dieser Arbeit konnte Galektin-8 mit zwei Isoformen in Pankreaskarzinomzellen identifiziert und seine Expression und subzelluläre Lokalisation quantifiziert werden. Die Galektin-8 Isoformen interagieren differentiell mit Ras-Proteinen, wobei eine präferentielle Bindung an K-Ras4B beschrieben werden konnte. Die dargestellten Ergebnisse bieten einen neuen Ansatzpunkt in der Aufklärung der komplexen molekularen Mechanismen, die zu einem malignen Phänotyp der Pankreaszelle führen und könnten zur Entwicklung von spezifisch wirksamen Arzneistoffen in der Tumorthherapie beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Adsay N.V.: Pathological classification of cystic neoplasma of the pancreas. In: Von Hoff D.D., Evans D.B., Hruban R.H. Pancreatic cancer, Jones and Bartlett Publishers, *Sudbury MA*: 716-756 (2005)
2. Almoguerra, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N. und Perucho, M.: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53, 549-554 (1998)
3. Andralojc K.M., Mercalli A., Nowak K.W., Albarello L., Calcagno R.: Ghrelin-producing Epsilon Cells in the Developing and Adult Human Pancreas. *Diabetologia* 52:486-493 (2009)
4. Aoki K., Yoshida T., Matsumoto N., Ide H., Sugimura T., Terada M.: Suppression of Ki-ras p21 levels leading to growth inhibition of pancreatic cancer cell lines with Ki-ras mutation but not those without K-ras mutation. *Mol. Carcinog.* 20: 251-258 (2007)
5. Ashery U., Yizhar O., Rotblat B., Elad-Sfadia G., Barkan B., haklai R., Kloog Y.: Spatiotemporal organization of ras signaling rasosomes and the galectin switch. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26: 471-495 (2006)
6. Avni O., Pur Z., Yefenio E., Baniyash M.: Complement receptor 3 of macrophages is associated with Galectin-1-like protein. *J. Immunol* 160: 6151-6158 (1998)
7. Barbacid M.: Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 779-827 (1987)
8. Bardeesy N., DePinho R.A.: Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat. Rev. Cancer* 2: 897-909 (2002)
9. Barondes S.H., Castronovo V., Cooper D.N.W., Cummings R.D., Drickamer K., Feizi T., Gitt M.A., Hirabayashi J., Hughes R.C., Kasai K., Leffler K., Liu F.T., Lotan R., Mercurio A.M., Monsigny M., Pillai S., Poirier F., Raz A., Rigby P., Rini J.M.,

- Wang J.L.: Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76, 597-598 (1994)
10. Bartsch D.K., Sina-Frey M., Lanbg S.: CDN2A germline mutations in familial pancreatic cancer. *Ann. Surg.* 236: 730-737 (2002)
 11. Berrozpe G., Schaeffer J., Peinado M.A., Real F.X., Perucho M. (1994): Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer.* 58: 185-191 (1994)
 12. Bidon N., Brichory F., Hanash S., Bourguet P., Dazord L., Le Pennec J.P.: Two messenger RNAs and five isoforms for Po66-CBP, a galectin-8 homolog in a human lung carcinoma cell line. *Gene* 274: 253-262 (2001)
 13. Bidon-Wagner N., Le Pennec J.-P.: Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconj. J.* 19: 557-563 (2004)
 14. Bos J. L.: The *ras* family in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 195: 255-271(1988)
 15. Bos J. L.: Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49: 4682-4689 (1989)
 16. Brand R.E., Lynch H.T.: Hereditary pancreatic adenocarcinoma.. A clinical perspectiv. *Med. Clin. North. Am.* 84: 665-675 (2000)
 17. Bresalier R.S., Yan P.S., Byrd J.C., Lotan R., Raz A.: Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system. *Cancer* 80: 776-787 (1997)
 18. Bresalier R.S., Mazurek N., Sternberg L.R., Byrd J.C., Yunker C.K., Nangia-Makker P., Raz A.: Metastasis of human cancer is related by modifying expression of the beta-galactoside-binding protein galectin-3. *Gastroenterology* 115: 287-296 (1998)

19. Brewer C.F. Miceli M.C., Baum L.G.: Clusters, bundles, arrays and lattices: Novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 616-623 (2002)
20. van den Brule F., Califice S., Castronovo V.: Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj. J.* 19: 537-542 (2004)
21. Caldas C., Hahn S.A., Hruban R.H., Redston M.S., Yeo C.J., Kern S.E.: Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res.* 54: 3568-3573 (1994)
22. Camby I. Le Mercier M., Lefranc F., Kiss R.: Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 16: 137R-157R (2006)
23. Castronovo V. van den Brule F.A., Jackers P., Clausse N., Liu F.T., Gillet C., Sobel M.E.: Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J. Pathol.* 179: 43-48 (1996)
24. Chan J.M., Wang F., Holly E.A.: Vegetable and fruit intake and pancreatic cancer in a population-based-case-control study in the San Francisco bay area. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 14: 2093-7 (2005)
25. Cherfils J., and Chardin P.: GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 24: 306-311 (1999)
26. Chiu V.K., Bivona T., Hach A., Sajous J.B., Silletti J., Wiener H., Johnson R.L. 2nd, Cox A.D., Philips M.R.: Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat. Cell Biol.* 4: 343-350 (2002)
27. Choufani G., Nagy N. Saussez S., Marchant H. Bisschop P., Burchert M., Danguy A., Louryan S. Salmon I., Gabius H.J., Kiss R., Hassid S.: The levels of expression of galectin-1, galectin-3 and the Thomsen-Freidenreich antigen and their binding sites decrease as clinical aggressiveness increases in head and neck cancers. *Cancer* 86: 2353-2363 (1999)

28. Cleves A.E., Cooper D.N., Barondes S.H., Kelly R.B.: A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 133: 1017-1026 (1996)
29. Cooper D.N.: Galectin-1: secretion and modulation of cell interactions with laminin. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 9:57-67 (1997)
30. Cooper D.N.: Galectinomics: finding the themes in complexity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1572: 209-231 (2002)
31. Cueni L.N., Detmar M.: Galectin-8 interacts with podoplanin and modulates lymphatic endothelial cell functions. *Exp. Cell. Res.* 315: 1715-23 (2009)
32. Cummings R.D., Liu F.T.: Galectins. *Essentials of Glycobiology*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 33 (2009)
33. Day J., DiGiuseppe J.A., Yeo C.J., Loi-Goldman M., Anderson S., Kern S.E., Hruban R.H.: Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum. Pathol.* 27: 119-124 (1996)
34. Dhillon S., Meikle S., Yazici Z., Eulitz M., and Kolch W.: Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *European Molecular Biology Organization J.* 21: 64-71 (2002)
35. Diaz-Meco M.T., Lozano J., Municio M.M., Berra E., Frutos S., Sanz L., Moscat J.: Evidence for the *in vitro* and *in vivo* interaction of Ras with protein-kinase C zeta. *J. Biol. Chem.* 269, 31706-31710 (1994)
36. DiGiuseppe J. A., Hruban R. H., Goodman S. N., Polak M., van den Berg F. M., Allison D. C., Cameron J. L., Offerhaus G. J.: Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am. J. Clin. Pathol.* 101: 684-688 (1994)
37. Donovan S., Shannon K.M., Bollag G.: GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1602: 23-45 (2002)

38. Downward J.: New exchange, new target. *Nature* 396: 416-417 (1998)
39. Dreissigacker U., Mueller M.S., Unger M., Siegert P., Genze F., Gierschik P., Giehl K.: Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. *Cell Signal.* 18: 1156-68 (2005)
40. Edlund H.: Pancreatic organogenesis - developmental mechanisms and implications for the therapy. *Nat. Genet.* 3: 524-532 (2002)
41. Ehrhardt A., Ehrhardt G.R., Guo X., Schrader J.W.: Ras and relatives-job sharing and networking keep an old family together. *Exp. Hematol.* 30, 1089-1106 (2002)
42. Elad-Sfadia G., Haklai R., Balan E., Gabius H.J., Kloog Y.: Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 277: 37169-37175 (2002)
43. Elad-Sfadia G., Haklai R., Balan E., Kloog Y.: Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J. Biol. Chem.* 279: 34922-34930 (2004)
44. Ellis C.A., Clark G.: The importance of being K-Ras. *Cell Signal.* 12: 425-434 (2000)
45. Elola M.T.: Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration and survival. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 1679-1700 (2007)
46. Elsässer H.P., MacDonald R., Dienst M., Kern H.F.: Characterization of a transglutaminase expressed in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Eur. J. Cell. Biol.* 61: 321-328 (1993)
47. Esteban L.M., Vicario-Abejon C., Fernandez-Salguero P., Fernandez-Medarde A., Swaminathan N., Yienger K., Lopez E., Malumbres M., McKay R., Ward J.M., Pellicer A., Santos E.: Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol. Cell. Biol.* 21: 1444-1452 (2001)

48. Everhart J., Wright D.: Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association* 273: 1605-1609 (1995)
49. Farmer J.L., Burghardt R.C., Jousan F.D., Hansen P.J., Bazer F.W., Spencer T.E.: Galectin 15 (LGALS15) functions in trophectoderm migration and attachment. *Federation of American Societies of Experimental Biology J.* 22: 548-60 (2008)
50. Felgner P. L.: Improvements in cationic liposomes for in vivo gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 7: 1791-1793 (1996)
51. Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M.: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7417 (1987)
52. Forrester K., Almoguera C., Han K., Grizzle W.E., Perucho M.: Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature.* 327: 298-303 (1987)
53. Fujita J., Krauss M.H., Onoue H., Srivastava S.K., Ebi Y., Kitamura Y., Rhim J.S.: Activated H-ras oncogenes in human kidney tumors. *Cancer Res.* 48: 5251-5255 (1988)
54. Gabius H.J.: Animal lectins. *Eur. J. Biochem.* 243: 543-576 (1997)
55. Genkinger J.M., Spiegelman D., Anderson K.E.: Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers Prevention* 18: 765-76 (2009)
56. Ghaneh P., Costello E., Neoptolemos JP.: Biology and management of pancreatic cancer. *Gut* 56: 1134-52 (2007)
57. Giehl K.: Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol. Chem.* 386: 193-205 (2005)

58. Giehl K., Skripczynski B., Mansard A., Menke A., Gierschik P.: Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-ERK-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)

59. Goggins M., Hruban R.H., Kern S.E.: BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am. J. Pathol.* 156: 1767-1771 (2000)

60. Gonzalez-Garcia A., Pritchard C.A., Paterson H.F., Mavria G., Stamp G., Marshall C.J.: RalGDS is required for tumor transformation in a model of skin carcinogenesis. *Cancer Cell* 7: 219-226 (2005)

61. Graham F.L., Smiley J., Russel W.C., Nairn R.: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59-74 (1977)

62. Gruber S.B., Entius M.M., Petersen G.M.: Pathogenesis of adenocarcinoma in Peutz-Jeghers syndrome. *Cancer Res.* 58: 5267-5270 (1998)

63. Gu M., Wang W., Song W.K., Cooper D.N., Kaufman S.J.: Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. *J. Cell. Sci.* 107: 175-181 (1994)

64. Hadari Y.R., Arbel-Goren R., Levy Y., Amsterdam A., Alon R., Zakut R., Zick Y.: Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J. Cell. Sci.* 113: 2385-2397 (2000)

65. Hahn S.A., Greenhalf B., Ellis I.: BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J. Nat. Cancer. Inst.* 95: 214-221 (2004)

66. Haller D.: New perspectives in the management of pancreas cancer.: *Semin. Oncol.* 30, 3-10 (2003)

67. Hamad N.M., Elconin J.H., Karnoub A.E., Bai W., Rich J.N., Abraham R.T., Der C.J., Counter C.M.: Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev.* 16: 2045-2057 (2002)
68. Han L., Colicelli J.: A human protein selected for interference with Ras function interacts directly with Ras and competes with Raf1. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1318-1323 (1995)
69. Hancock J.F.: Ras proteins: different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4: 373-384 (2003)
70. Harada T., Okita K., Shiraishi K., Kusano N., Kondoh S., Sasaki K.: Interglandular cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 62: 835-9 (2002)
71. Hermanek P.: Staging of exocrine pancreatic carcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* 17: 167-72 (1991)
72. Herrmann C.: Ras-effector interactions: after one decade. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13: 122-129 (2003)
73. Hezel A.F., Kimmelman A.C., Stanger B.Z., Bardeesy N., Dephino R.: Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Dev.* 20: 1218-1249 (2006)
74. Hittelet A.: Upregulation of galectin-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. *Int. J. Cancer* 103: 370-379 (2003)
75. Holland E.C., Celestino J., Dai C., Schaefer L., Sawaya R.E., Fuller G.N.: Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat. Genet.* 25: 55-57 (2000)
76. Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J. und Kern, S.E.: Progression model for pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 6: 2969-2972 (2000)

77. Hsu D.K., Dowling C.A., Jeng K.C., Chen J.T., Yang R.Y., Liu F.T.: Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 81: 519-526 (1999)
78. Hsu D.K., Yang R.Y., Liu F.T.: Galectins in apoptosis. *Methods Enzymol* 417, 256-273 (2006)
79. Huang L., Goodrow T. L., Zhang S. Y., Klein-Szanto A. J., Chang H., Ruggeri B. A.: Deletion and mutation analyses of the *P16/MTS-1* tumor-suppressor gene in human ductal pancreatic cancer reveals a higher frequency of abnormalities in tumor-derived cell lines than in primary ductal adenocarcinomas. *Cancer Res.* 56: 1137-1141 (1996)
80. Hughes R.C.: Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 6: 1473: 172-85 (1999)
81. Hughes R.C.: Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochemie* 83: 667-676 (2001)
82. Huguet E.L., McMahon J.A., McMahan A.P., Bicknell R., Harris A.L.: Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4 and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res.* 15:54: 2615-21 (1994)
83. Iglesias M.M., Rabinovich G.A., Ambrosio A.L., Castagna L.F., Sotomayor C.E., Wolfenstein-Todel C.W.: Purification of galectin-3 from ovine placenta: developmentally regulates expression and immunological relevance. *Glycobiology* 8: 59-65 (1998a)
84. Iglesias M.M., Rabinovich G.A., Ivanovic V., Sotomayor C.E., Wolfenstein-Todel C.W.: Galectin-1 from ovine placenta: amino-acid sequence, physicochemical properties and implications in T-cell death. *Eur. J. Biochem.* 252: 400-407 (1998b)
85. Iodice S., Gandini S., Maisonneuve P., Lowenfels AB.: Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's Archives of Surgery* 393: 535-45 (2008)

86. Janssen J.W.G., Steenvoorden A.C.M., Lyons J., Anger B., Böhlke J.U., Bos J.L., Seliger H., Bartram C.R.: Preferential and novel activation of H-ras in human bladder carcinomas. *Oncogene Res.* 3: 77-86 (1987)
87. Janssen K.-P.: Murine models of colorectal cancer: studying the role of oncogenic K-ras. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 495-506 (2003)
88. Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Thun M.J.: Cancer statistics 2007. *CA Cancer J. Clin.* 57: 43-66 (2007)
89. Jemal A., Siegel R., Ward E.: Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J. Clin.* 2008, 58: 71-96 (2008)
90. John J., Frech M., Feuerstein J., Goody R.S., Wittinghofer A.: Guanine-Nucleotide-Binding Proteins, *Plenum, New York* 209-214 (1989)
91. Jones M.K., Jackson J.H.: Ras-GRF activates Ha-Ras, but not N-Ras or K-Ras4B, protein in vivo. *J. Biol. Chem.* 273: 1782-1787 (1998)
92. Kalthoff H., Schmiereg W., Roeder C., Kasche D., Schmidt A., Lauer G., Thiele H.G., Honold G., Pantel K., Riethmüller G., Scherer E., Maurer J., Maacke H., Deppert W.: p53 and K-Ras alterations in pancreatic epithelial cell lesions. *Oncogene.* 8: 289-298 (1993)
93. Kaltner H., Stierstorfer B.: Animal lectins as cell adhesion molecules. *Acta. Anat. (Basel)* 161: 162-179 (1998)
94. Karsten U.: Novel alphaGalNAc containing glycans on cytokeratins are recognized in vivo by galectins with type II carbohydrate recognition domains. *J. Cell. Sci.* 110: 1585-1596 (1997)
95. Kelley G.G., Reks S.E., Ondrako J.M., Smrcka A.V.: Phospholipase C (epsilon): a novel Ras effector. *European Molecular Biology Organization J.* 20, 743-754 (2001)

96. Khalid A.: Differentiating neoplastic from benign lesions of the pancreas: translational techniques. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 7 (11 Suppl): S55-8 (2009)
97. Khosravi-Far R., White M.A., Westwick J.K., Soliski P.A., Chrzanowska Wodnicka M., Van Aelst L., Wigler M.H., Der C.J.: Oncogenic Ras activation of Raf/mitogen-activated protein kinase-independent pathways is sufficient to cause tumorigenic transformation *Mol. Cell. Biol.* 16: 3923-3933 (1996)
98. Kloog Y., Cox A.D.: Prenyl-binding domains: potential targets for Ras inhibitors and anti-cancer drugs. *Semin. Cancer Biol.* 14: 253-61 (2004)
99. 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)
100. Krebs in Deutschland, *Krebsregister: 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe.* Saarbrücken: Robert Koch-Institut und GEKID 2006: 36-8 (2006)
101. Kuriyama M., Harada N., Kuroda S., Yamamotu T., Nakafuku M., Iwamatsu A., Yamamoto D., Prasad R., Croce C., Canaani E., Kaibuchi K.: Identification of AF-6 and canoe as putative targets for Ras. *J. Biol. Chem.* 271: 607-610 (1996)
102. Kuwabara I., Sano H., Liu F.T.: Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj. J.* 19: 527-535 (2004)
103. Laghi L., Orbetegli O., Bianchi P., Zerbit A., Di Carlo V., Boland C.R., Malesi A.: Common occurrence of multiple K-Ras mutations in pancreatic cancers with associated precursor lesions and in biliary cancers. *Oncogene* 21: 4301-4306 (2002)
104. Lahm H., Andre S., Hoefflich A., Fischer J.R., Sordat B., Kaltner H., Wolf E., Gabius H.-J.: Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127: 375-386 (2001)

105. Lahm H., Andre S., Hoeflich A., Kaltner H., Siebert H.-C., Sordat B., von der Leith C.-W., Wolf E., Gabius H.-J.: Tumor galectinology: Insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj. J.* 20: 227-238 (2004)
106. Lange-Carter C.A., Johnson G.L.: Ras-dependent growth factor regulation of MEK kinase in PC12 cells. *Science* 265, 1458-1461 (1994)
107. Leffler H.: Galectins structure and function - A synopsis. *Results Probl. Cell. Differ.* 33: 57-83 (2001)
108. Levy G., Tarraba-Hazdai R., Teichberg V.I.: Prevention and therapy with electrolectin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits. *Eur. J. Immunol.* 13: 500-507 (1983)
109. Levy Y.: Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 267: 31285-31295 (2001)
110. Liao D.I.: Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1428-1432 (1994)
111. Lieber M., Mazzetta 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)
112. Liu F.T., Patterson R.J., Wang J.L.: Intracellular functions of galectins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1572: 263-273 (2002)
113. Liu F.T., Rabinovich G.A.: Galectins as modulators of tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.* 5: 29-41 (2005)
114. Lotan R., Ito H., Yasui W., Yakozaki H., Lotan D., Tahara E.: Expression of a 31-kDa lactoside-binding lectin in normal human gastric mucosa and in primary and metastatic gastric carcinomas. *Int. J. Cancer* 56: 474-480 (1994)

115. Lotz M.M., Andrews C.W. Jr., Korzelius C.A., Lee E.C., Steele G.D. Jr., Clarke A., Mercurio A.M.: Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3466-3479 (1993)
116. Lowenfels A.B., Maisonneuve P., Cavallini G.: Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N. Engl. J. Med.* 328: 1433-1437 (1993)
117. Ma Y.Q., Geng J.G.: Obligatory requirement of sulfation for P-selectin binding human salivary gland carcinoma Acc-M cells and breast carcinoma ZR-75-30 cells. *J. Immunol.* 168: 1690-1696 (2002)
118. Martin K.A., Blenis J.: Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways. *Adv. Cancer Res.* 86: 1-39 (2002)
119. Michaud de Gonzalez A., Sweetland S., Spencer E.: A meta-analysis of obesity and risk of pancreatic cancer. *The Journal of the American Medical Association* 286: 921-9 (2001)
120. Murphy K.M., Brune K.A., Griffin C.: Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B and BRCA2 in familiar pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res.* 62: 3789-3793 (2002)
121. Muscat J., Stellman S., Hoffmann D., Wynder E.L.: Smoking and pancreatic cancer in men and women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 6: 15-9 (1997)
122. Nagy N., Bronckart Y., Camby L., Legendre H., Lahm H., Kartner H., Hadari Y, Van Ham P., Yeaton P., Pector J.C., Zick Y., Salmon I., Danguy A., Kiss R., Gabius H.J.: Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor. *Gut* 50: 392-401 (2002)

123. Niedergethmann M., Rexin M., Knob M., Hartel M., Sturm J.W., Richter A., Post S.: Detektion von Mikrometastasen nach kurativer Resektion duktaler Adenokarzinome des Pankreas. *Zentralbl. Chir.* 126: 917-921 (2001)
124. Niv H., Gutmann O., Kloog Y., Henis Y.: 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)
125. Ochieng J.: Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 289: 845-850 (2001)
126. Ochieng J., Furtak V., Lukyanov P.: Extracellular functions of galectin-3. *Glycocony. J.* 19: 527-535 (2004)
127. Offner H., Celnik B., Bringman T., Casentini-Borocz D., Nedwin G.E., Vandebark A.: Recombinant human beta-galactoside-binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 22: 177-184 (1990)
128. Ohannesian D.W., Lotan D., Lotan R.: Concomitant increases in galectin-1 and its glycoconjugate ligands in cultured human colon carcinoma cells by sodium butyrate. *Cancer Res.* 54: 5992-6000 (1994)
129. Ohannesian D.W., Lotan D., Thomas P., Jessup J.M., Fukuda M., Gabius H.J., Lotan R.: Carcinoembryonic antigen and other glycoconjugates act as a ligands for galectin-3 in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 55: 2191-2199 (1995)
130. Oka N., Takenaka Y., Raz A.: Galectins and Urological Cancer. *J. Cell. Biochem.* 91: 118-24 (2004)
131. Orita S., Kaibuchi K., Kuroda S., Shimizu K., Nakanishi H., Takai Y.: Comparison of kinetic properties between two mammalian ras p21 GDP/GTP exchange proteins, ras guanine nucleotide-releasing factor and smg GDP dissociation stimulation. *J. Biol. Chem.* 268: 25542-25546 (1993)

132. Otto J.C., Kim E., Young S.G., Casey P.J.: Cloning and characterization of a mammalian prenyl protein-specific protease. *J. Biol. Chem.* 274: 8379-8382 (1999)
133. Park J.W., Voss P.G., Grabski S., Wang J.L., Patterson R.J.: Association of galectin-1 and galectin-3 with Germin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res.* 29: 3595-3602 (2001)
134. 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: 7486-7493 (2001)
135. Pellegata N.S., Sessa F., Renault B., Bonato M.S., Leone B.E., Solcia E., Ranzani G.N.: K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res.* 54: 1556-1560 (1994)
136. Percik R., Stumvoll M.: Obesity and cancer. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117:563-6 (2009)
137. Perillo N.L., Marcus M.E., Baum L.G.: Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J. Mol. Med.* 76: 402-412 (1998)
138. Perugini R. A., McDade T. P., Vittimberga F. J. Jr., Callery M. P.: The molecular and cellular biology of pancreatic cancer. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 8:377-393 (1998)
139. Poirier F., Timmons P.M., Chan C.-T., Guenet J.-L., Rigby P.: Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggest multiple roles during pre- and post-implantation development. *Development* 115: 143-155 (1992)
140. Pratt S.E., Pollak M.N.: Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin like growth factor-binding proteins in conditioned media. *Cancer Res.* 1:53: 5193-8 (1993)

141. Prior I.A., Harding A., Yan J., Sluimer J., Parton R.G., Hancock J.F.: GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat. Cell Biol.* 3: 368-375 (2001)
142. Prior I.A., Muncke C., Parton R.G., Hancock J.F.: Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell Biol.* 160: 165-170 (2003)
143. Probstmeier R., Montag D., Schachner M.: Galectin-3, a beta-galactoside-binding animal lectin, binds to neural recognition molecules. *J. Neurochem.* 64: 2465-2472 (1995)
144. Rabinovich G.A.: Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ.* 6: 711-721 (1999)
145. Rabinovich G.A., Baum L.G., Tinari N., Paganelli R., Natoli C., Liu F.-T., Iacobelli S.: Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? Review *Trends in Immunology* 23: 313-320 (2002)
146. Reiss Y., Goldstein J.L., Seabra M.C., Casey P.J., Brown M.S.: Inhibition of purified p21ras farnesyl protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell.* 62: 81-88 (1990)
147. Rodenhuis S., Slebos R.J., Boot A.J., Evers S.G., Mooi W.J., Wagenaar S.S., van Bodegom P.C., Bos J.L.: Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res.* 48: 5738-574 (1988)
148. Rodrigues N.R., Rowan A., Smith M.E., Kerr I.B., Bodmer W.F., Gannon J.V., Lane D.P.: p53 mutations in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 7555-9 (1990)
149. Rosenberg I., Cherayil B.J., Isselbacher K.J., Pillai S.: Mac-2-binding glycoproteins. Putative ligands for a cytosolic beta-galactoside lectin. *J. Biol. Chem.* 266: 18731-18736 (1991)

150. Rozenblum E., Schutte M., Goggins M., Hahn S.A., Panzer S., Zahurak M., Goodman S.N., Sohn T.A., Hruban R.H., Yeo C.J.: Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 57: 1731-4 (1997)
151. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: Molecular cloning: laboratory manual, 2. Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor* (1989)
152. Sato S., Hughes R.C.: Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylectosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J. Biol. Chem.* 267: 6983-6990 (1992)
153. Sato S., Burdett I., Highes R.C.: Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Exp. Cell Res.* 207: 8-18 (1993)
154. Satelli A., Rao P.S., Gupta P.K., Lockman P.R., Srivenugopal K.S., Subrahyeswara Rao U.: Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncology Reports* 19: 587-594 (2008)
155. Schoeppner H.L., Raz A., Ho S.B., Bresalier R.S.: Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. *Cancer* 75: 2818-2826 (1995)
156. Schwarz G Jr., Rimmelinck M., Decaestecker C., Gielen I., Budel V., Burchert M., Darro F., Danguy A., Gabius H.J., Salmon I., Kiss R.: Galectin fingerprinting in tumor diagnosis. Differential expression of galectin-3 and galectin-3 binding sites, but not galectin-1, in benign vs. malignant uterine smooth muscle tumor. *Am. J. Clin. Pathol.* 111: 623-631 (1999)
157. Seetharaman J., kanigsberg A., Slaaby R., Leffler H., Barondes S.H., Rini J.M.: X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 273: 13047-13052 (1998)

158. Shields J.M., Pruitt K., McFall A., Shaub A., Der CJ.: The *Saccharomyces cerevisiae* STE14 gene encodes a methyltransferase that mediates C-terminal methylation of a-factor and RAS proteins. *European Molecular Biology Organization J.* 10: 1699-1709 (2000)
159. Shimamura T., DSakamoto M., Ino Y., Shimada K., Kosuge T., Sato Y., Tanaka K., Sekihara H., Hirohashi S.: Clinicopathological significance of galectin-3 expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin. Cancer Res.* 8: 2570-2575 (2002)
160. Shimizu K., Goldfarb M., Suard Y., Perucho M., Li Y., Kamata T., Feramisco J., Stavnezer E., Fogh J., Wigler M.H.: Three human transforming genes are related to the viral *ras* oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 80: 2112-2116 (1983)
161. Shimura T., Takenaka Y., Tsutsumi S., Hogan V., Kikuchi A., Raz A.: Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res.* 64: 6363-6367 (2004)
162. Shimura T., Takenaka Y., Fukumori T., Tsutsumi S., Okada K., Hogan V., Kikuchi A., Kuwano H., Raz A.: Implications of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res.* 65: 3535-3537 (2005)
163. Shirakata Y., Ishii K., Yagita H., Okumura K., Taniguchi M., Takemori T.: Distinct subcellular localization and substrate specificity of extracellular signal-regulated kinase in B cells upon stimulation with IgM and CD40. *J. Immunol* 163: 6589-97 (1999)
164. Stillman B.N., Mischel P.S., Baum L.G.: New roles for galectins in brain tumors-from prognostic markers to therapeutic targets. *Brain Pathol.* 15: 124-132 (2005)
165. Su Z.Z., Lin J., Shen R., Fisher P.E., Goldstein N.I., Fisher P.B.: Surface-epitope masking and expression cloning identifies the human prostate carcinoma tumor antigen PCTA-1 a member of the galectin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 7252-7257 (1996)

166. Sugarman B.J., Aggarwal B.B., Hass P.E., Figari I.S., Palladino M.A. Jr, Shepard H.M.: Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*. 22:230: 943-5 (1985)
167. Symons A., Cooper D.N., Barclay A.N.: Characterization of the interaction between galectin-1 and lymphocyte glycoproteins CD45 and Thy-1. *Glycobiology* 10: 559-563 (2000)
168. Takahashi T., Ishikawa H., Kato H.: Intra-pancreatic, extratumoral perineural invasion. *Acta. Pathol. Jpn.* 42: 99-103 (1992)
169. Takai Y., Sasaki T., Matozaki T.: Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* 81: 154-172 (2001)
170. Tan M.H., Nowak N.J., Loo R., Ochi H., Sandberg A.A., Lopez C., Pickren J.W., Berjian R., Douglass H.O. Jr., Chu T.M.: Characterisation of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest.* 4: 15-23 (1986)
171. Tanaka M., Chari S., Adsay V., Fernandez-del Castillo C., Falconi M., Shimizu M., Yamaguchi K., Yamao K., Matsuno S.: International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreatol.* 6: 17-32 (2006)
172. Trainer D.L., Kline T., McCabe F.L., Faucette L.F., Feild J., Chaikin M., Anzano M., Rieman D., Hoffstein S., Li D.J.: Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* 41: 287-96 (1988)
173. Umanoff H., Edelmann W., Pellicer A., Kucherlpati R.: The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92: 1709-1713 (1995)
174. Unger M.: Charakterisierung des Einflusses von konstitutiv aktivem K-Ras(G12V) auf die signaltransduktion und die Migration von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen. Biol. Dissertation, Universität Ulm (2004)

175. Vavvas D., Li X., Avruch J., Zhang X.F.: Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J. Biol. Chem.* 273: 5439-5442 (1998)
176. VisVanathan K.V., Pockock R.D., Summerhayes I.C.: Preferential and novel activation of H-ras in human bladder carcinomas. *Oncogene Res.* 3: 77-86 (1988)
177. Voice, J. K., Klemke, R. L., Le, A., Jackson, J. H.: Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J. Biol. Chem.* 274: 164-170 (1999)
178. Vos M.D., Ellis C.A., Elam C., Ülkü A.S., Taylor B.J., Clark G.J.: Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene.* 20: 7486-7493 (2003)
179. Weiss J., Schwechheimer K., Cavenee W.K., Herlyn M., Arden K.C.: Mutation and expression of the p53 gene in malignant melanoma cell lines. *Int. J. Cancer.* 19: 54: 693-9 (1993)
180. Wells A.: Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv. Cancer Res.* 78: 31-101 (2000)
181. Wennerberg K., Rossman K.L., Der C.J.: The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* 118: 843-846 (2005)
182. Wilentz R.E., Geradts J., Maynard R., Offerhaus G.J., Kang M., Gogins M., Yeo C.J., Kern S.E., Hruban R.H.: Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res.* 58: 4740-4744 (1998)
183. Wilentz R.E., Su G.H., Dai J.L., Sparks A.B., Argani P., Sohn T.A., Yeo C.J., Kern S.E., Hruban R.H.: Immunohistochemical labeling for p16 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas: a new marker of DPC4 inactivation. *Am. J. Pathol.* 156: 37-43 (2000)

184. Wintersperger B.J., Nikolau K., Becker C.R.: Multidetector-row CT angiography of the aorta and visceral arteries. *Semin. Ultrasound CT MR*; 25: 25-40 (2004)
185. Winter-Vann A.M., Casey P.J.: Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer*. 5: 405-412 (2005)
186. Wittekind C., Meyer H.J., Baetz E: TNM-Klassifikation maligner Tumoren (International Union against Cancer-UICC) Berlin, Heidelberg, New-York: Springer Verlag 2003; 86-8 (2003)
187. Wittinghofer A., Waldmann H.: Ras-ein molekularer Schalter bei der Tumorentstehung. *Angew. Chem.* 112: 4360-4383 (2000)
188. Wolthuis R.M., Zwartkruis F., Moen T.C., Bos J.L.: Ras-dependent activation of the small GTPase Ral. *Curr. Biol.* 8: 471-474 (1998)
189. Wymann M.P., Zvelebil M., Laffargue M.: Phosphoinositide 3-kinase signaling - which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 366-376 (2003)
190. Xu X.C., el-Naggar A.K., Lotar R.: Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am. J. Pathol.* 147: 815-822 (1995)
191. Yamaoka A., Kuwabara I., Frigeri L.G., Liu F.T.: A human lectin, galectin-3 stimulates superoxide production by neutrophils. *J. Immunol.* 154: 3479-3487 (1995)
192. Yamaoka K.: Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J. Neurosci. Res.* 59: 722-730 (2001)
193. Yan J., Roy S., Apolloni A., Lane A., Hancock J.F.: Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and Phosphoinositide 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 24052-24056 (1998)

194. Yang R.-Y., Hsu D.K., Liu F.T.: Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6737-6742 (1996)
195. Yang R.-Y., Rabinovich G.A., Liu F.-T.: Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Cambridge University Press* 10: e17 (2008)
196. Yeo T.P., Hruban R.H., Leach S.D., Wilentz R.E., Sohn T.A., Kern S.E., Iacobuzio-Donahie C.A., Maitra A., Goggins M., Canto M.I., Abrams R.A., Laheru D., Jaffee E.M., Hidalgo M., Yeo C.J.: Pancreatic cancer. *Curr. Probl. Cancer* 4: 176-275 (2002)
197. Yoshi T.: Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 18: 787-792 (2001)
198. Yu F., Finley R.L. Jr., Raz A., Kim H.R.: Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J. Biol. Chem.* 277:15819-15827 (2002)
199. Zhou Q., Cummings R.D.: L-14 lectin recognition of laminin and its promotion of in vitro cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 6-17 (1993)
200. Zick Y., Einstein M., Goren R.A., Hadari Y.R., Levy Y., Ronen D.: Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconj. J.* 19: 517-526 (2004)

Anhang

Nukleotidsequenz: Galektin-8 long

1 tggacttggg tccgaggcag acgaggaagc tgagaaaacc ctggcgttga ccccgaggac
61 ctgggcccgc cgggaaggcc agcgcttggc ccaggcaggc ggggcctgtg cggtgaccac
121 cctggctcctg aaaagtccca gccccgagcg cctcctctcc tagacctgga ggctggaac
181 agccagccgc ccacggacgc cagagccggg aaccctgacg gcacttagct gctgacaaa
241 aacctgctcc gtggagcgc tgaacacca gtctttgggg ccagtgcctc agtttcaatc
301 caggtaacct ttaaatgaaa cttgcctaaa atcttaggtc atacacagaa gagactccaa
361 tcgacaagaa gctggaaaag aatgatgttg tccttaaca acctacagaa tatcatctat
421 aaccggttaa tcccgtttgt tggcaccatt cctgatcagc tggatcctgg aactttgatt
481 gtgatacgtg ggcattgtcc tagtgacgca gacagattcc aggtggatct gcagaatggc
541 agcagcatga aacctcgagc cgatgtggcc tttcatttca atcctcgttt caaaagggcc
601 ggctgcattg tttgcaatac tttgataaat gaaaaatggg gacgggaaga gatcacctat
661 gacacgcctt tcaaaagaga aaagtctttt gagatcgtga ttatgggtgct gaaggacaaa
721 ttccaggtgg ctgtaaaggg aaaacatact ctgctctatg gccacaggat cggcccagag
781 aaaatagaca ctctgggcat ttatggcaaa gtgaatattc actcaattgg ttttagcttc
841 agctcggact tacaaagtac ccaagcatct agtctggaac tgacagagat aagtagagaa
901 aatgttccaa agtctggcac gccccagctt cctagtaata gaggaggaga catttctaaa
961 atcgcacca gaactgtcta caccaagagc aaagattcga ctgtcaatca cactttgact
1021 tgcacaaaaa taccacctat gaactatgtg tcaaagaggc tgccattcgc tgcaagggtg
1081 aacacccccca tgggcccctgg acgaactgtc gtcgttaaag gagaagtga tgcaaatgcc
1141 aaaagcttta atgttgacct actagcagga aatcaaagg atattgctct aacttgaac
1201 ccacgcctga atattaaagc atttgtaaga aattcttttc ttcaggagtc ctggggagaa
1261 gaagagagaa atattacctc tttcccattt agtcctggga tgtactttga gatgataatt
1321 tattgtgatg ttagagaatt caaggttgca gtaaattggc tacacagcct ggagtacaaa
1381 cacagattta aagagctcag cagtattgac acgctggaaa ttaatggaga catccactta
1441 ctggaagtaa ggagctggta gcctacctac acagctgcta caaaaaccaa aatacagaat
1501 ggcttctgtg atactggcct tgctgaaacg catctcactg tcattctatt gtttatattg
1561 ttaaaatgag cttgtgcacc attaggtcct gctgggtgtt ctcagtcctt gccatgaagt

1621 atgggtggtgt cttagcactga atggggaaac tgggggcagc aacacttata gccagttaaa
1681 gccactctgc cctctctcct actttggctg actcttcaag aatgccattc aacaagtatt
1741 tatggagtac ctactataat acagtagcta acatgtattg agcacagatt ttttttggtta
1801 aaactgtgaa gagctaggat atatacttgg tgaacaaaac cagtatgttc cctgttctct
1861 tgagcttcga ctcttctgtg cgctactgct ggcactgct ttttctacag gcattacatc
1921 aactcctaag gggtcctctg ggattagtta tgcagatatt aatcacccg aagacactaa
1981 cttacagaag acacaactcc ttccccagtg atcactgtca taaccagtgc tctaccgtat
2041 cccatcactg aggactgatg ttgactgaca tcattttctt tatcgtaata aacatgtggc
2101 tctattagct gcaagcttta ccaagtaatt ggcatgacat ctgagcacag aaattaaggc
2161 aaaaaaccaa agcaaaaacaa atacatgggtg ctgaaattaa cttgatgcca agcccaaggc
2221 agctgatttc tgtgtatttg aacttagggc aatcagagt ctacacagac gcctacagaa
2281 agtttcagga agaggcaaga tgcattcaat ttgaaagata tttatgggca acaaagtaag
2341 gtcaggatta gacttcaggc attcataagg caggcactat cagaaagtgt acgccaacta
2401 agggaccac aaagcaggca gaggtaatgc agaaatctgt tttgttcca tgaaatcacc
2461 aatcaaggcc tccgttcttc taaagattag tccatcatca ttagcaactg agatcaaagc
2521 actcttccac tttacgtgat taaaatcaaa cctgtatcag caagttaaat ggttccattt
2581 ctgtgatttt tctattattt gaggggagt ggagaagt ccatgtatat gggatcttta
2641 caggtcagat cttgttacag gaaatttcaa aggtttggga gtggggaggg aaaaaagctc
2701 agtcagtgag gatcatttta tcacattaga ctggggcaga actctgccag gatttaggaa
2761 tattttcaga acagatttta gatattattt ctatccatat attgaaaaga ataccattgt
2821 caatcttatt tttttaaag tactcagtgt agaaatcgct agcccttaat tcttttccag
2881 cttttcatat taatgtatgc agagtctcac caagctcaaa gacactgggt ggggggtggag
2941 ggtgccacag ggaaagctgt agaaggcaag aagactcgag aatccccag agttat

Nukleotidsequenz: Galektin-8 short

1 tggacttgga tccgaggcag acgaggaagc tgagaaaacc ctggcgttga ccccgtggac
61 ctgggcgccc cgggaaggcc agcgcttggc ccaggcaggc ggggcctgtg cgggtgaccac
121 cctggctctg aaaagtcca gccccgagcg cctccctcc tagacctgga ggctggaac
181 agccagccgc ccacggacgc cagagccggg aaccctgacg gcacttagct gctgacaaac
241 aacctgctcc gtggagcgcc tgaaacacca gtctttgggg ccagtgcctc agtttcaatc

301 caggtaacct ttaaatgaaa cttgcctaaa atcttaggtc atacacagaa gagactccaa
361 tcgacaagaa gctggaaaag aatgatgttg tccttaaaca acctacagaa tatcatctat
421 aaccggtaa tcccgtttgt tggcaccatt cctgatcagc tggatcctgg aactttgatt
481 gtgatacgtg ggcatgttcc tagtgacgca gacagattcc aggtggatct gcagaatggc
541 agcagcatga aacctcgagc cgatgtggcc tttcatttca atcctcgttt caaaagggcc
601 ggctgcattg tttgcaatac tttgataaat gaaaaatggg gacgggaaga gatcacctat
661 gacacgcctt tcaaaagaga aaagtctttt gagatcgtga ttatgggtgct gaaggacaaa
721 ttccaggtgg ctgtaaattg aaaacatact ctgctctatg gccacaggat cggcccagag
781 aaaaatagaca ctctgggcat ttatggcaaa gtgaatattc actcaattgg ttttagcttc
841 agctcggact taaaaagtac ccaagcatct agtctggaac tgacagagat aagtagagaa
901 aatgttccaa agtctggcac gcccagctt aggctgccat tcgctgcaag gttgaacacc
961 cccatgggccc ctggacgaac tgtcgtcgtt aaaggagaag tgaatgcaaa tgccaaaagc
1021 tttaatgttg acctactagc aggaaaatca aaggatattg ctctacactt gaaccacgc
1081 ctgaatatta aagcatttgt aagaaattct tttcttcagg agtcctgggg agaagaagag
1141 agaaatatta cctctttccc atttagtcct gggatgtact ttgagatgat aatttattgt
1201 gatgttagag aattcaaggc tgacgtaaat ggcgtacaca gcctggagta caaacacaga
1261 tttaaagagc tcagcagtat tgacacgctg gaaattaatg gagacatcca cttactggaa
1321 gtaaggagct ggtagcctac ctacacagct gctacaaaaa ccaaaataca gaatggcttc
1381 tgtgatactg gccttgctga aacgcctctc actgtcattc tattgtttat attgttaaaa
1441 tgagcttgty caccattagg tcctgctggg tgttctcagt ccttgccatg aagtatggty
1501 gtgtctagca ctgaatgggg aaactggggg cagcaacact tatagccagt taaagccact
1561 ctgccctctc tcctactttg gctgactctt caagaatgcc attcaacaag tatttatgga
1621 gtacctacta taatacagta gctaacatgt attgagcaca gatttttttt ggtaaaactg
1681 tgaagagcta ggatatatac ttggtgaaac aaaccagtat gttccctggt ctcttgagct
1741 tcgactcttc tgtgcgctac tgctgcgcac tgctttttct acaggcatta catcaactcc
1801 taaggggtcc tctgggatta gttatgcaga tattaatca cccgaagaca ctaacttaca
1861 gaagacacaa ctcttcccc agtgatcact gtcataacca gtgctctacc gtatcccatc
1921 actgaggact gatgttgact gacatcattt tctttatcgt aataaacatg tggctctatt
1981 agctgcaagc tttaccaagt aattggcatg acatctgagc acagaaatta aggcacaaaa
2041 ccaaagcaaa acaaatacat ggtgctgaaa ttaacttgat gccaaagcca aggcagctga
2101 tttctgtgta tttgaactta gggcaaatca gagtctacac agacgcctac agaaagtttc

2161 aggaagaggc aagatgcatt caatttgaaa gatatttatg ggcaacaaaag taaggtcagg
2221 attagacttc aggcattcat aaggcaggca ctatcagaaa gtgtacgcca actaagggac
2281 ccacaaagca ggcagaggta atgcagaaat ctgttttggt cccatgaaat caccaatcaa
2341 ggcctccggt cttctaaaga ttagtccatc atcattagca actgagatca aagcactctt
2401 ccacttttacg tgattaaaaat caaacctgta tcagcaagtt aaatggttcc atttctgtga
2461 tttttctatt atttgagggg agttggcaga agttccatgt atatgggatc ttacaggtc
2521 agatcttggt acaggaaatt tcaaaggttt gggagtgggg agggaaaaaa gctcagtcag
2581 tgaggatcat tttatcacat tagactgggg cagaactctg ccaggattta ggaatatttt
2641 cagaacagat tttagatatt atttctatcc atatattgaa aagaatacca ttgtcaatct
2701 tattttttta aaagtactca gtgtagaaat cgctagccct taattctttt ccagcttttc
2761 atattaatgt atgcagagtc tcaccaagct caaagacact ggttgggggt ggagggtgcc
2821 acagggaaag ctgtagaagg caagaagact cgagaatccc ccagagttat

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. Guido Adler für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl für ihre erstklassige Betreuung, ihr Engagement und ihre Hilfsbereitschaft. Sie hat mich in das wissenschaftliche Denken eingeführt, mir methodisch und technisch viel beigebracht und sich sehr für meine Arbeit und die daraus resultierende Publikation engagiert.

Herrn Prof. Dr. Andre Menke für die Mitbetreuung der Arbeit und die Unterstützung vor allem in den letzten Monaten meiner praktischen Arbeit im Labor.

der SFB-Forschungsgruppe, vor allem bei Claudia und Iris für die methodische Anleitung und die Hilfsbereitschaft.

der Arbeitsgruppe 4204 - Institut für Pharmakologie und Toxikologie, insbesondere bei Angela, die meine ersten Schritte in der Forschung begleitet haben.

meinen Eltern, die mir meine wundervolle Kindheit und mein Studium ermöglichten und mir viel Kraft gaben.

Ein besonderer Dank geht an meinem Sohn Nick Glowa, der mich, mit seinem Lächeln und seiner wundervollen Art, immer neu motiviert hat.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei den zwei wundervollsten Frauen in meinem Leben bedanken: meiner Mutter Aurora Porr und meiner Schwiegermutter Sylvia Glowa, für den Rückhalt in schwierigen Situationen und für ihre Unterstützung.