

Proteomanalysen zur Identifizierung K-RAS-modulierter Zielstrukturen im
in vitro-Modell der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3

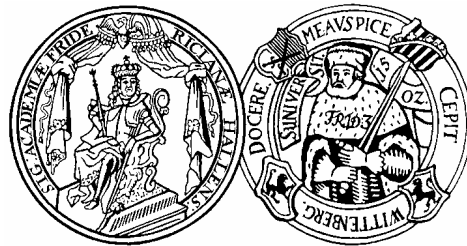
D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

Christian Viktor Recktenwald

geboren am: 18.06.1973 in Illingen

Gutachter /in

1. Prof. Dr. A. Sinz
2. Prof. Dr. B. Seliger
3. Prof. Dr. R. Schäfer

Halle (Saale), Januar 2009

1	Einleitung	1
1.1	Die klassische RAS-Superfamilie	1
1.1.1	Die Charakteristika der einzelnen RAS-Isoformen.....	1
1.1.2	Prozessierung und Membrantranslokation der RAS-Proteine.....	3
1.1.3	Subzelluläre Lokalisation der RAS-Proteine	4
1.1.4	Aktivierung und Deaktivierung der RAS-GTPasen	7
1.2	RAS als Schalter der zellulären Signaltransduktion	10
1.2.1	Mechanismus der RAS-induzierten Signalweiterleitung.....	10
1.2.1.1	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Weg	11
1.2.1.2	Phosphatidylinositol3-Kinase (PI3-K)-AKT-Weg	11
1.2.1.3	Ral-GEF-Weg	12
1.2.2	Isoformspezifische Induktion der Signaltransduktionsmaschinerie	13
1.3	Mechanismen der RAS-Aktivierung in menschlichen Tumoren	14
1.3.1	Aktivierung durch Punktmutationen	14
1.3.2	Aktivierung durch Genamplifikation.....	14
1.3.3	Aktivierung durch GAP-Inhibierung.....	15
1.4	Prävalenz und Einfluss aktivierender K-ras-Mutationen auf den Tumorphänotyp.....	15
1.4.1	Häufigkeitsverteilung von ras-Mutationen in humanen Tumoren	15
1.4.2	Auswirkungen verschiedener K-ras-Mutationen auf den Tumorphänotyp	17
1.5	Der Einfluss von Onkogenen auf das Immunsystem	18
1.5.1	Die MHC-Klasse-I-Antigenprozessierungsmaschinerie (APM)	18
1.5.2	Der Einfluss von Onkogenen auf die MHC-Klasse-I-Expression	20
1.6	Analyse des pleiotropen Einflusses der RAS-Proteine	21
1.7	Zielstellung der Arbeit:	22
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Verwendete Mikroorganismen und Zelllinien	25
2.1.1.1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Stämme	25
2.1.1.2	Zelllinien.....	26
2.1.1.2.1	Parentalzelllinie.....	26

2.1.1.2.2	Zelllinien zur Gewinnung von Wildtyp- und mutierter humaner <i>K-ras</i> -DNS	26
2.1.2	Plasmide	27
2.1.2.1	pCR2.1-TOPO	27
2.1.2.2	pIRESHyg.....	28
2.1.3	Enzyme.....	29
2.1.3.1	Restriktionsendonukleasen.....	29
2.1.3.2	Weitere Enzyme	29
2.1.4	Antikörper	29
2.1.4.1	Antikörper für durchflusszytometrische Analysen	29
2.1.4.2	Antikörper für Immunoblotanalysen	30
2.1.4.3	Enzym/Fluoreszenz-konjugierte Antikörper	30
2.1.5	Medien und Agar	31
2.1.5.1	Nährmedien für <i>E. coli</i>	31
2.1.5.2	Medien für die Zellkultur.....	31
2.1.6	Molekulargewichtsmarker	32
2.2	Methoden.....	32
2.2.1	Zellbiologische Methoden	32
2.2.1.1	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> -Zellen.....	32
2.2.1.2	Kultivierung und Aseervierung von Säuger-Zellen.....	32
2.2.1.3	Proliferationsanalyse.....	33
2.2.1.4	Analyse des verankerungsunabhängigen Wachstums	33
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.2.1	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	34
2.2.2.2	DNS-Transfer.....	35
2.2.2.2.1	Bakterientransformation.....	35
2.2.2.2.2	DNS-Transfektion eukaryotischer Zellen	36
2.2.2.2.3	Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNS	37
2.2.2.3	Nukleinsäureisolierungen.....	38
2.2.2.3.1	Plasmid-Mini-Präparationen.....	38
2.2.2.3.2	Plasmid-Midi-Präparationen.....	39
2.2.2.3.3	Isolierung von RNS	39
2.2.2.4	DNS/RNS-Quantifizierung und Reinheitsbestimmung	40
2.2.2.5	DNS-Agarose-Gelelektrophorese	40

2.2.2.6	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	41
2.2.2.7	Restriktionsverdau	41
2.2.2.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
2.2.2.8.1	Ortsspezifische Mutagenese-PCR	44
2.2.2.8.2	Kolonie-PCR	45
2.2.2.8.3	Genomische PCR	45
2.2.2.8.4	Echtzeit-quantitative Reverse Transkriptions-PCR (qRT-PCR)	45
2.2.2.9	Reverse Transkription oder Erststrang-cDNS-Synthese.....	46
2.2.2.10	Ligation	47
2.2.2.11	Klonierungen mit Hilfe von Topoisomerase II	47
2.2.2.12	Sequenzierung.....	48
2.2.3	Proteinchemische Methoden	48
2.2.3.1	Proteinextraktion aus murinen Fibroblasten.....	48
2.2.3.1.1	Proteinextraktion für 1D-SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese).....	48
2.2.3.1.2	Proteinextraktion für 2-DE im pH-Bereich von 4-7	49
2.2.3.1.3	Proteinextraktion für 2-DE im pH-Bereich von 6-11	50
2.2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmungen.....	50
2.2.3.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Biuretmethode.....	50
2.2.3.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Bradfordmethode	51
2.2.3.3	Proteomanalysen mittels 2-DE	51
2.2.3.3.1	Isoelektrische Fokussierung	52
2.2.3.3.1.1	Isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich von 4-7.....	52
2.2.3.3.1.2	Isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich von 6-11	53
2.2.3.3.1.3	Äquilibrierung der IPG-Streifen	54
2.2.3.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
2.2.3.3.2.1	SDS-PAGE für 2-DE	55
2.2.3.3.2.2	SDS-PAGE für zielgerichtete Expressionsanalysen	56
2.2.3.4	Gelfärbemethoden	57
2.2.3.4.1	Silberfärbung	57
2.2.3.4.2	Kolloidale Coomassiefärbung	58
2.2.3.4.3	Ruthenium II bathophenanthroline disulfonat chelat (RuBPS)-Färbung	58
2.2.3.5	Geldokumentation und -auswertung	59
2.2.3.5.1	Dokumentation von Silber- und Coomassiegelen	59
2.2.3.5.2	Dokumentation von fluoreszenzgefärbten Gelen	59

2.2.3.5.3	Gelanalyse	59
2.2.3.6	Proteinidentifizierung mittels Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time of Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)	60
2.2.3.6.1	In Gel-Verdau der differentiell exprimierten Proteine	61
2.2.3.6.2	Massenspektrometrische Analyse	61
2.2.3.6.2.1	Peptidmassenfingerabdruck (PMF).....	61
2.2.3.6.2.2	Peptidsequenzierungen mittels MALDI-PSD	62
2.2.4	Immunologische Methoden.....	63
2.2.4.1	Western Blot	63
2.2.4.2	Durchflusszytometrische Analysen	64
2.2.5	Biochemische Arbeitsmethoden	65
2.2.5.1	Bestimmung des Glutathiongehaltes	65
2.2.5.2	Zytotoxizitätsbestimmung	67
2.2.5.3	Bestimmung der relativen Apoptoserate	67
2.2.5.4	Bestimmung der Menge an aktiviertem RAS	68
3	Ergebnisse	69
3.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> -Zellmodells der onkogenen Transformation....	69
3.1.1	Aufbau des <i>in vitro</i> -Modells.....	70
3.1.2	Bestimmung der funktionellen K- <i>ras</i> -Expression	72
3.1.3	Einfluss der verschiedenen K-RAS-Varianten auf Morphologie, Proliferations- und Wachstumsverhalten	73
3.1.3.1	K-RAS-induzierte morphologische Veränderungen	73
3.1.3.2	Proliferationsverhalten von K- <i>ras</i> -Transfektanten und Kontrollzellen	74
3.1.3.3	Einfluss der K-RAS-Varianten auf verankerungsunabhängiges Wachstum	77
3.1.3.4	Zusammenstellung der Zellcharakteristika des <i>in vitro</i> -Modells.....	77
3.2	Analyse des Einflusses von K-RAS auf die Signaltransduktion	78
3.2.1	Evaluation des globalen Aktivierungszustandes der einzelnen Zelllinien mittels Western Blot-Analyse	78
3.2.2	Verstärkte Aktivität des MAPK-Weges nach K-RAS-Überexpression.....	79
3.2.3	Verstärkte Aktivierung des PI3-K/AKT-Weges nach onkogener K- <i>ras</i> -Überexpression.....	80
3.3	Analyse des Einflusses von K-RAS auf die MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung und -präsentation	82

3.3.1	Verringerung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression durch K-RAS	82
3.3.2	K-RAS reprimiert die Expression bestimmter APM-Gene	84
3.4	Komparative Analyse des Proteinexpressionsprofils	89
3.4.1	Auftrennung des Proteoms im sauren bis neutralen pH-Bereich (pH 4-7)	90
3.4.2	Auftrennung der Proteine im pH-Bereich von 6-11	94
3.4.3	Validierung differentiell exprimierter Proteine	97
3.5	Funktionelle Analyse differentiell exprimierter Gene	100
3.5.1	Toleranz K-RAS-transformierter Zellen gegen reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	100
3.5.2	Analyse des intrazellulären Glutathionspiegels.....	103
3.5.3	Resistenz K-RAS-transformierter Zellen gegen Formaldehyd	104
3.5.4	Onkogene K-ras-Expression vermittelt Resistenz gegen H ₂ O ₂ -induzierte Apoptose.....	107
4	Diskussion	109
4.1	Induktion der onkogenen Transformation nach K-ras-Überexpression.	109
4.1.1	K-RAS-Überexpression induziert morphologische und zellbiologische Veränderungen	109
4.1.2	Deregulierte Signaltransduktion in den K-ras-Transfektanten.....	111
4.2	K-RAS induziert einen „Immune escape“-Phänotyp	114
4.2.1	Die Überexpression von onkogenem und proto-onkogenem K-ras resultiert in einer MHC-Klasse-I-Minderexpression.....	114
4.2.2	Onkogene K-ras Überexpression führt zur Verringerung der Transkript- und/oder Proteinmenge bestimmter APM-Gene	115
4.3	Identifizierung von Zielgenen der K-RAS-medierten Transformation ...	119
4.3.1	Vergleich mit verschiedenen Studien der durch RAS deregulierten Signaltransduktion	119
4.3.2	Mögliche funktionelle Bedeutung K-RAS-modulierter Zielstrukturen ...	123
4.3.2.1	Genexpressionsregulatorische Proteine	123
4.3.2.2	Hitzeschockproteine.....	125
4.3.2.3	Zytoskelettproteine.....	126
4.3.2.4	Metabolische Proteine	126
4.3.2.5	Oxidoreduktasen.....	129
4.4	Funktionelle Analyse K-RAS-modulierter Proteine	130

4.4.1	Onkogene K- <i>ras</i> -Überexpression induziert erhöhte Resistenz gegenüber ROS	130
4.4.2	K-RAS induziert einen erhöhten Glutathionspiegel	132
4.4.3	Resistenz K-RAS-transformierter Zellen gegen Formaldehyd	133
5	Zusammenfassung	136
6	Ausblick	137
7	Literatur	138
8	Anhang	153
	Abkürzungen	158
	Verwendete Geräte:	162
	Verwendete Chemikalien:	163

Einleitung

1.1 Die klassische RAS-Superfamilie

1.1.1 Die Charakteristika der einzelnen RAS-Isoformen

Das Protoonkoprotein K-RAS gehört zu den GTP-bindenden Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung von (extra-)zellulären Signalen an zahlreiche Effektormoleküle spielen (Malumbres, M. und Pellicer, A., 1998). Bisher wurden mehr als 100 derartige, 20-30 kDa große GTP-bindende Proteine identifiziert, die in die RAS-, RHO-, ARF-, RAN-, RAD- und RAB-Familie eingeteilt werden (Wennerberg, K. *et al.*, 2005). Obwohl die einzelnen Mitglieder der unterschiedlichen Proteinfamilien aufgrund ihrer Funktion den α -Untereinheiten trimerer G-Proteine ähneln, sind sie als Monomere funktionell (Paduch, M. *et al.*, 2001; Takai, Y. *et al.*, 2001; Friday, B. B. und Adjei, A. A., 2005). H-RAS und N-RAS gehören neben den beiden K-RAS-Isoformen 4A und 4B, die durch alternatives Spleißen des vierten Exons gebildet werden, als klassische Vertreter dieser Proteinfamilie an (Colicelli, J., 2004). Das Molekulargewicht der RAS-Proteine beträgt ungefähr 21 kDa. H-, N- und K-RAS4A sind aus 189 Aminosäuren aufgebaut, wohingegen K-RAS4B aus 188 Aminosäuren besteht (Abb.1.1). Die N-terminale G-Domäne des Polypeptids setzt sich aus 165 Aminosäuren zusammen und weist zwischen den verschiedenen Isoformen Sequenzhomologien von 90-100 % auf. Die ersten 85 Aminosäuren der G-Domäne sind in allen vier Isoformen identisch. Sie spezifizieren die Phosphatbindungsschleife („P-loop“) sowie die „Switch“-I- und die „Switch“-II-Domäne. Der „P-Loop“ ist für die Bindung des GTP- γ -Phosphatrestes verantwortlich und konstituiert sich aus den Aminosäuren 10-16. Mutationen der beiden Glycine an Position 12 und 13 führen zur onkogenen Aktivierung der GTPase. Die Aminosäuren 32-38 bzw. 59-67 bilden die „Switch“-I- bzw. „Switch“-II- Domäne, die die Wechselwirkungen mit Regulator- und Effektormolekülen steuern. Beim GDP-GTP-Austausch durchlaufen diese beiden Domänen den größten Konformations-wechsel innerhalb der Polypeptidkette (Milburn, M. V. *et al.*, 1990). Die „Switch“-II-Region beinhaltet einen weiteren Aminosäurerest, der bei der Hydrolyse des GTP von entscheidender katalytischer Bedeutung ist. So wurde gezeigt, dass durch die Mutation von Glutamin 61 die GTP-Hydrolyse komplett blockiert werden kann (Scheffzek, K. *et al.*, 1997). Die

Aminosäurereste 85-165 sind zu ca. 90 % zwischen den einzelnen Isoformen homolog (Hancock, J. F., 2003; Schubbert, S. *et al.*, 2007).

Im Gegensatz zur N-terminalen Domäne ist die C-terminale Domäne zwischen den einzelnen Isoformen nur zu etwa 15 % konserviert. Der Bereich der Aminosäurereste 166-188 bzw. 189 wird daher als hypervariable Region (HVR) bezeichnet. Dieser Sequenzabschnitt ist für die subzelluläre Lokalisation der einzelnen RAS-Isoformen verantwortlich. Dies konnte durch die Membranlokalisierung von chimären Proteinen, die nach Fusion der kodierenden Sequenz des zytosolischen Proteins A und der HVR-cDNS der RAS-Isoformen in COS-Zellen exprimiert wurden, gezeigt werden (Hancock, J. F. *et al.*, 1991). Je nach Isoform dienen die Aminosäurereste 166-180 bzw. 166-174 als sogenannte Verbindungsregion zwischen der G-Domäne und dem Membrananker, der den restlichen C-Terminus umfasst (Jaumot, M. *et al.*, 2002; Parton, R. G. und Hancock, J. F., 2004).

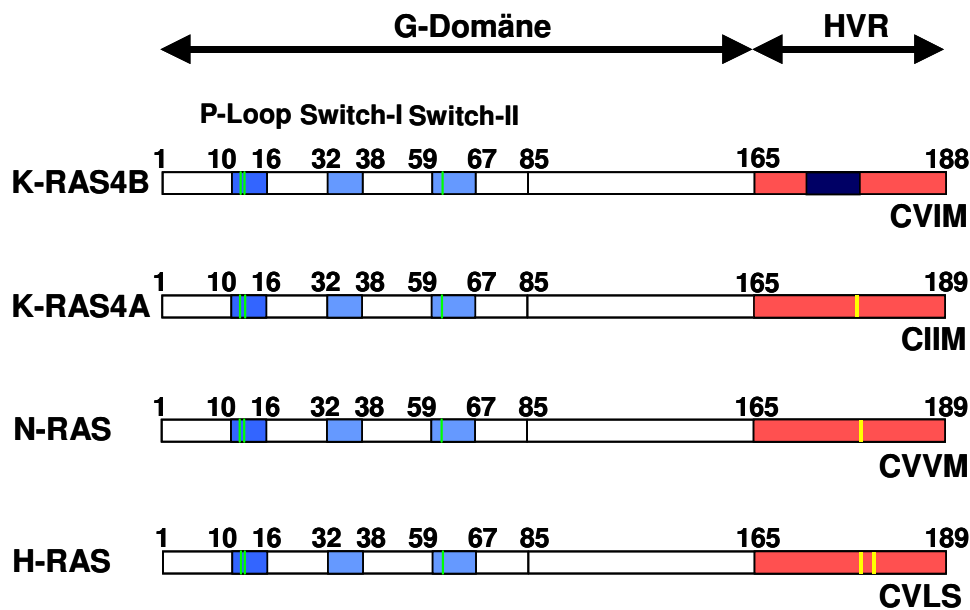


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau der vier RAS-Isoformen.

H-, N-, K-RAS4A und 4B weisen ca. 90 % Sequenzhomologie in der G-Domäne auf. Die ersten 85 Aminosäuren sind identisch und spezifizieren die Bindung von GDP und GTP. Sie bestehen aus dem „P-Loop“ (Phosphat-Bindungsloop, Aminosäuren 10-16), der für die Bindung des γ -Phosphats verantwortlich ist, sowie der „Switch“-I- (Aminosäuren 32-38) und der „Switch“-II-Region (Aminosäuren 59-67), die für die Bindung von regulatorischen Proteinen und Effektoren entscheidend sind. Die C-terminale hypervariable Region (HVR, Aminosäuren 165-188/189) spezifiziert die Membranlokalisierungssignale der einzelnen Isoformen. Der Cysteinrest des CAAX-Motivs liegt farnesyliert vor. Die durch einen Palmitoylrest posttranslational modifizierten Cysteine in H-, N- und K-RAS4A sind gelb hervorgehoben. In K-RAS4B wird die Membranverankerung durch den dunkelblau gekennzeichneten, polybasischen Hexalysinrest verstärkt. Häufig auftretende somatische *ras*-Mutationen in den Kodonen 12, 13 und 61 sind grün dargestellt (verändert nach Schubbert *et al.* 2007).

Die letzten vier Aminosäuren jeder RAS-Isoform besitzen die Konsensussequenz CAAX (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure und X = Serin oder Methionin), die

posttranslational modifiziert wird. Die HVR von K-RAS4B besitzt zahlreiche basische Aminosäuren, während die anderen klassischen RAS-Familienmitglieder ein bis zwei konservierte Cysteine enthalten, die als Bindestellen für einen Palmitoylrest genutzt werden.

1.1.2 Prozessierung und Membrantranslokation der RAS-Proteine

Bei der Prozessierung der einzelnen RAS-Isoformen werden verschiedene Aminosäurereste der HVR posttranslational modifiziert. Hierbei treten wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen RAS-Proteinen auf. Die Prozessierung aller Isoformen erfolgt sequentiell im endoplasmatischen Retikulum (ER). Zunächst wird ein Farnesylrest, der in Form von Farnesylpyrophosphat aktiviert vorliegt, durch die Proteinfarnesyltransferase kovalent an die Sulfhydrylgruppe des Cysteins der CAAX-Konsensussequenz gebunden. Danach erfolgt an der zytosolischen Seite des ER die Abspaltung der drei C-terminalen Aminosäuren durch das Enzym Rce1 (RAS and a factor converting enzyme). Daraufhin katalysiert die Isoprenylcysteinocarboxylmethyltransferase mit Hilfe des Kofaktors S-Adenosylmethionin die Methylierung des terminalen Cysteinrestes (Hancock, J. F., 2003). Danach gelangt K-RAS4B aus dem ER über einen nicht näher charakterisierten Weg zur Plasmamembran (Apolloni, A. *et al.*, 2000), an die es sich über Salzbrückenbindungen zwischen seiner polykationischen Hexalysindomäne und den negativ geladenen Phospholipiden sowie über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Farnesylrest und den Lipidschwänzen der Membranlipide anlagert (Omerovic, J. *et al.*, 2007). N-RAS, H-RAS und K-RAS4A werden nach Palmitoylierung durch eine ER-ständige Palmitoylacyltransferase – H-RAS an C181 und C184, N-RAS an C181 und K-RAS4A an C180 – über den klassischen sekretorischen Weg durch den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transloziert. Diese Acylierung ist für die Membrantranslokation dieser Isoformen essentiell, da gezeigt werden konnte, dass die Verhinderung der Palmitoylierung durch die Substitution der entsprechenden Cysteine zu Serinen einer ER-Akkumulation von H- und N-RAS führt (Choy, E. *et al.*, 1999). Für den Translokationsprozess müssen diese an der zytoplasmatischen Seite der sekretorischen Vesikel lokalisiert sein (Prior, I. A. und Hancock, J. F., 2001).

1.1.3 Subzelluläre Lokalisation der RAS-Proteine

Die posttranslationale Farnesylierung ermöglicht den RAS-Proteinen eine Lokalisation an der Plasmamembran, die sich aus zahlreichen, verschiedenen Lipiden und Proteinen konstituiert. Nach dem durch Singer und Nicolson postulierten Flüssig-Mosaik-Modell (Singer, S. J. und Nicolson, G. L., 1972) befinden sich biologische Lipiddoppelschichten in einem flüssigen Zustand, der durch die unbeschränkte Diffusion der Lipide zustande kommt. Dieser wird als flüssigungeordnete Phase (l_d -Phase) bezeichnet. Dennoch können bestimmte Lipidklassen miteinander interagieren und so die l_d -Phase verlassen. Dabei handelt es sich um Cholesterol sowie Sphingo- und Glycerophospholipide mit gesättigten Fettsäureresten. Aufgrund ihrer Zusammenlagerung entstehen innerhalb der l_d -Phase Membranregionen, die sich in einem definierteren Zustand befinden und dementsprechend als flüssiggeordnete Phase (l_o -Phase) bezeichnet werden. Innerhalb dieser l_o -Phase bilden sich aus diesen Lipidmolekülen und unterschiedlichen Proteinen Membranmikrodomänen, die Lipid Rafts genannt werden und eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen (Simons, K. und Toomre, D., 2000). Eine spezielle Mikrodomänenart stellen sogenannte Caveolae dar. Diese sind morphologisch als höhlenartige Invaginationen innerhalb der Plasmamembran zu erkennen, die durch das Strukturprotein Caveolin aufgebaut werden. Aus der Zusammensetzung der Plasmamembran und den unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen der einzelnen RAS-Familienmitglieder ergeben sich verschiedene Membran-lokalisierungen, die zu einer isoformspezifischen Signaltransduktion führen (siehe Kap. 1.2). So können H- und N-RAS aufgrund der gesättigten Palmitoylreste in Lipid Rafts inkorporiert sein. Für H-RAS ist die Lokalisation dabei von der Art des gebundenen Guaninnukleosidphosphates abhängig. Prior und Mitarbeiter konnten ein GTP/GDP-assoziiertes Gleichgewicht für H-RAS in Lipid Rafts und cholesterolumabhängige Mikrodomänen zeigen (Prior, I. A. *et al.*, 2001; Jaumot, M. *et al.*, 2002; Prior, I. A. *et al.*, 2003). Dieses Gleichgewicht ist für die H-RAS induzierte Aktivierung der RAF-MAPK-Kaskade essentiell (Roy, S. *et al.*, 1999), da die Zerstörung cholesterolreicher Membranmikrodomänen durch die Expression von dominant-negativem Caveolin die Aktivierung der RAF-Kinase verhindert. Demnach interkaliert GDP-gebundenes inaktives H-RAS in Lipid Rafts und wird nach GTP-Bindung in Galectin-1-abhängige Signaldomänen der Zelloberfläche transloziert. Dagegen ordnet sich K-RAS4B in Nanoclustern, die aus

sieben RAS-Molekülen aufgebaut sind (Tian, T. *et al.*, 2007), innerhalb der I_d-Phase an. In diesen Untersuchungen zeigen konstitutiv aktives und wildtypisches (wt) K-RAS4B ein identisches Membranassoziationsverhalten, das keiner Umverteilung zwischen geordneten oder ungeordneten Strukturen unterliegt. Die Ausbildung dieser Mikrodomänen erfolgt cholesterolunabhängig, wie durch Cholesteroldepletion mittels Cyclodextrin nachgewiesen werden konnte (Prior, I. A. *et al.*, 2003). Diese Interaktion ist von der Art des C-terminalen Prenylrestes abhängig. Die Substitution des Methionins zu Leucin im K-RAS4B-CAAX-Motiv führt anstatt einer Farnesylierung zu einer Geranylgeranylierung (Casey, P. J. und Seabra, M. C., 1996) und verhindert so die Zusammenlagerung der Nanocluster. Die Membranaffinität dieser K-RAS4B-Cluster wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Kopfgruppen der Membranphospholipide und der polybasischen Proteindomäne, die aus den sechs Lysinresten der Positionen 175-180 besteht, verstärkt (Hancock, J. F. *et al.*, 1991; Jackson, J. H. *et al.*, 1994; Roy, M. O. *et al.*, 2000; Gomez, G. A. und Daniotti, J. L., 2007). Neben diesem Hexalysinmotiv finden sich in der prozessierten HVR von K-RAS4B weitere fünf Lysinreste, die die Membranaffinität weiter erhöhen (Omerovic, J. *et al.*, 2007). Allerdings wird die Plasmamembranlokalisation von K-RAS4B kontrovers diskutiert. Während Prior *et al.* (Prior, I. A. *et al.*, 2001) K-RAS4B nur in ungeordneten Membranstrukturen postulieren, detektierten Kranenburg und Mitarbeiter diese Isoform hauptsächlich in Caveolae (Kranenburg, O. *et al.*, 2001). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Lokalisation in unterschiedlichen Membranmikrodomänen eine Erklärung für die isoformspezifische Signalweiterleitung der RAS-Proteine ist, da die Verteilung sowie die Konzentration der Kofaktoren für die Effektoraktivierung entlang dieser Kompartimente variiert.

Die RAS-GTPasen werden nicht nur in der Plasmamembran, sondern auch in oder an folgenden Zellorganellen lokalisiert: ER, Golgi, Mitochondrien, Endosomen sowie dem Nukleus. Für die palmitoylierten Isoformen H- und N-RAS wurde für die zelluläre Lokalisation ein Acylierungszyklus nachgewiesen (Goodwin, J. S. *et al.*, 2005; Rocks, O. *et al.*, 2005). Bei diesem Prozess wird depalmitoyliertes H- bzw. N-RAS über einen nicht-vesikulären Transport von der Plasmamembran zum Golgi transloziert, wo es durch einen Palmitoyltransferasekomplex erneut acyliert und anschließend zurück zur Plasmamembran transportiert wird. Dagegen konnte für K-RAS4B eine Protein-Kinase C-abhängige Phosphorylierung des Serinrestes 181 gezeigt werden,

wodurch die positive Ladung der Polylysindomäne teilweise neutralisiert und so die Membranaffinität herabgesetzt wird. Dies führt zur Dissoziation von der Zelloberfläche und bedingt die Akkumulation am ER, dem Golgi sowie der äußeren Mitochondrienmembran (Bivona, T. G. *et al.*, 2006). Darüber hinaus kann N-RAS an der äußeren Mitochondrienmembran und inneren Mitochondrienkompartimenten lokalisiert sein. Außerdem hatten Zellen, in denen die K-ras oder N-ras-Gene ausgeschaltet wurden, eine abnormale Mitochondrienmorphologie, die mit einer beeinträchtigten Funktionalität assoziiert war (Wolfman, J. C. *et al.*, 2006). Der Translokationsmechanismus sowie die subzelluläre Verteilung der RAS-Isoformen ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.

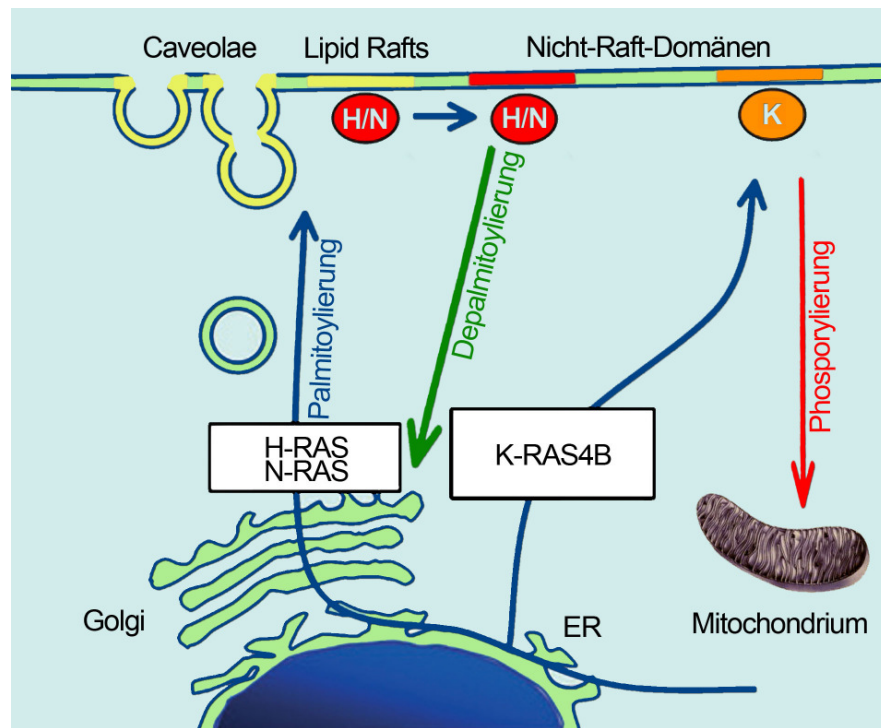


Abb. 1.2: Translokation und Lokalisation der RAS-Isoformen.

Die unterschiedliche HVR der RAS-Proteine steuert die Membrantranslokation und deren subzelluläre Lokalisation. Die Prozessierung des C-terminalen CAAX-Motivs resultiert in der Farnesylierung aller Isoformen. Die Stabilisierung der Membranbindung wird durch ein zweites Membranlokalisierungssignal bedingt, das entweder in der Palmitoylierung eines (N-RAS) bzw. zweier (H-RAS) Cysteinyreste oder aus einer polybasischen Domäne (K-RAS4B) besteht. Die palmitoylierten Isoformen werden über den sekretorischen Weg zur Zelloberfläche transloziert, während der Transportmechanismus von K-RAS4B nur ungenügend verstanden ist. Die weitere subzelluläre Verteilung von H- und N-RAS wird durch einen Zyklus von Depalmitoylierung und Palmitoylierung reguliert. Dagegen dissoziiert K-RAS4B nach der Phosphorylierung des Serinrestes 181 von der Membran und kann sich an der äußeren Mitochondrienmembran, dem ER und Golgi anlagern (verändert nach Omerovic *et al.* 2007).

1.1.4 Aktivierung und Deaktivierung der RAS-GTPasen

Die Aktivierung der RAS-Proteine wird üblicherweise durch die Ligandenbindung einer Rezeptortyrosinkinase (RTK) eingeleitet. RTK sind Transmembranglykoproteine, die aus einer extrazellulären Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Kinasedomäne zusammengesetzt sind. Während die Sequenz der zytosmatischen Kinasedomäne zwischen den einzelnen Familienmitgliedern der RTK-Familie eine starke Homologie aufweist, zeigt die ligandenbindende Ektodomäne eine variable Struktur. Dadurch werden die verschiedenen RTK befähigt, ihren spezifischen Liganden zu erkennen. Durch die Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung, die zu einer Freisetzung der Dimerisierungsschleife führt. Sie ragt aus jedem ligandenbindenden Monomer heraus und erleichtert dadurch die Bildung eines Rezeptordimers. Diese Dimerisierung induziert die Rezeptorkinaseaktivität, indem ein (a)symmetrischer Kinasedimerkomplex gebildet wird, bei dem der C-Lobus der einen Kinasedomäne mit dem N-Lobus der zweiten Kinasedomäne wechselwirkt. Dadurch bilden sich Salzbrücken im N-Lobus, die die intramolekulare Aktivierungssequenz freisetzen. Dieser Prozess führt letztendlich zur Trans(Auto-)phosphorylierung des Kinasedimers. In dieser aktiven Konformation kann die RTK mit anderen Molekülen der Signaltransduktionskaskade interagieren. Die phosphorylierten Tyrosinreste werden dann für die Src-homologen SH2-Domänen eines Adaptorproteins, wie z. B. Grb2, zugänglich. Nach Interaktionsstabilisierung durch ionische Wechselwirkungen können die beiden SH3-Domänen von Grb2 an prolinreiche Abschnitte eines RAS-Guaninnukleotid-Austauschfaktors, wie z. B. SOS (Son of sevenless), binden. Diese Verankerung von SOS an einen Membranrezeptor bewirkt aufgrund der räumlichen Nähe zu RAS eine Freisetzung von GDP. Die nachfolgende Bindung von GTP wird durch das zelluläre GTP/GDP-Verhältnis bedingt (Bos, J. L. *et al.*, 2007). Die Interaktion der RAS-Proteine mit ihren Effektormolekülen wird über die Bindung und Hydrolyse von GTP gesteuert (Abb. 1.3).

Dieser Zyklus wird in folgende Stadien eingeteilt:

- i) Im ruhenden, inaktiven Zustand liegt RAS GDP gebunden vor.
- ii) Durch die Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade, z. B. über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) mittels extrazellulärer Stimuli, kommt es zur Aktivierung von Guaninnukleotid austauschfaktoren (GEF). Bisher konnten neun RAS-GEF identifiziert werden, von denen die meisten auch andere GTPasen aktivieren können. Die Austauschfaktoren stimulieren die Dissoziation des GDP, wodurch das in der Zelle im Überfluss vorhandene GTP die transient leere GDP/GTP-Bindestelle des RAS-Proteins besetzt (Omerovic, J. *et al.*, 2007).
- iii) Die GTP-Bindung erzeugt allosterische Veränderungen, die die Affinität für Effektorinteraktionen erhöhen. Mit Hilfe dieser Wechselwirkungen werden die RAS-Effektoren an bzw. in das jeweilige RAS-Kompartiment rekrutiert und so der Aktivierung durch Kinasen zugänglich gemacht.
- iv) Sobald die intrinsische GTPase-Aktivität das gebundene GTP hydrolysiert, kommt es zur Abschaltung der Signalkaskade und RAS kehrt in seinen inaktiven Zustand zurück. Diese enzymatische Aktivität der RAS-Proteine wird über sogenannte „GTPase-activating proteins“ (GAP) reguliert, die durch ihre Wechselwirkung mit RAS die GTPase-Aktivität um mehrere Größenordnungen steigern können. Dies geschieht zum einen durch die Stabilisierung des Glutaminrestes 61, der den nukleophilen Angriff der Wassermoleküle koordiniert (Bos, J. L. *et al.*, 2007). Zum anderen wird ein GAP-Argininrest so in die Phosphatbindungsstelle positioniert, dass der Übergangszustand durch die Neutralisierung der negativen Ladung des γ -Phosphatrestes stabilisiert wird (Scheffzek, K. *et al.*, 1997).

Neben der Aktivierung durch RTK (Abb. 1.3) können RAS-Proteine noch durch zahlreiche weitere rezeptorvermittelte Prozesse aktiviert werden, wie z. B. durch Integrine, Serpentinrezeptoren und heterotrimere G-Proteine (Friday, B. B. und Adjei, A. A., 2005).

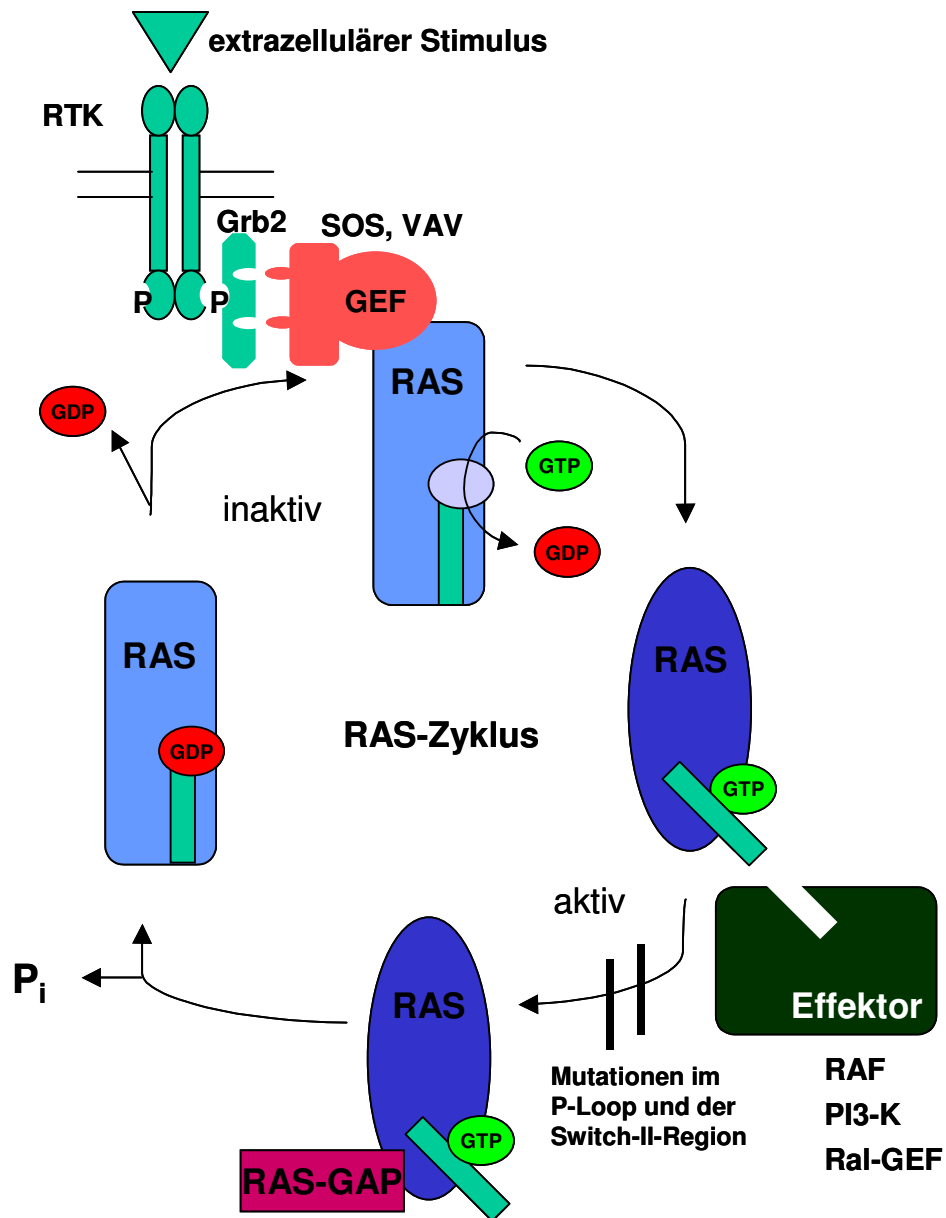


Abb. 1.3: Molekulare Regulation der RAS-Aktivität.

Nach der Aktivierung membranständiger Rezeptoren durch einen extrazellulären Stimulus kommt es mit Hilfe von GEF zur RAS-GTP-Bindung. Dadurch wird die Wechselwirkung mit seinen Effektormolekülen ermöglicht. GAP-Proteine erhöhen die intrinsische GTPase-Aktivität von RAS um mehrere Größenordnungen und führen durch die GTP-Hydrolyse zur Inaktivierung von RAS. Durch Punktmutationen im „P-Loop“ und der „Switch-II-Region“ entstehen mutierte, konstitutiv aktive Onkoproteine, deren GTPase-Aktivität nicht mehr stimulierbar ist.

1.2 RAS als Schalter der zellulären Signaltransduktion

1.2.1 Mechanismus der RAS-induzierten Signalweiterleitung

RAS-Proteine sind an der Weiterleitung zahlreicher zellulärer Signale beteiligt. Nach der Aktivierung interagiert RAS mit seinen Effektormolekülen. Viele dieser Effektoren sind GEF für weitere GTPasen. In den folgenden Abschnitten soll der Aktivierungsprozess sowie die Signalweitergabe an die RAS-Effektoren RAF, Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3-K) und Ral erläutert werden. Die GTP-Bindung führt zu einer Konformationsänderung des RAS-Moleküls, die die „Switch“-Regionen dazu befähigen, mit den RAS-Effektoren zu interagieren. Bisher sind mehr als 20 mögliche RAS-Effektormoleküle bekannt (Schubbert, S. *et al.*, 2007), die verschiedene zelluläre Prozesse, wie u. a. Proliferation, Überleben und Differenzierung, steuern. Abbildung 1.4 fasst die beeinflussten Effektoren mit den daraus resultierenden zellulären Konsequenzen zusammen. Diese werden im Anschluss kurz vorgestellt.

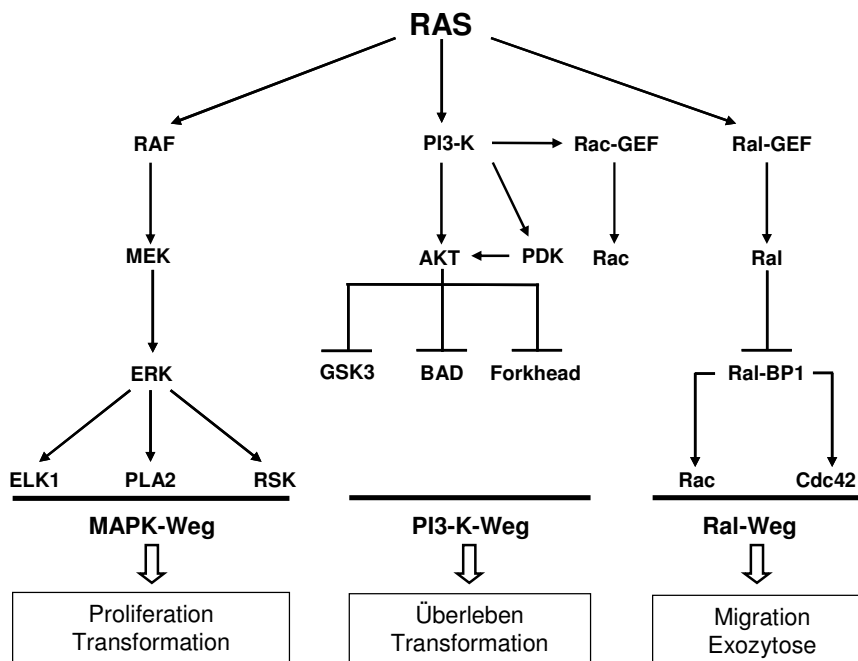


Abb. 1.4: RAS beeinflusste Signaltransduktionswege.

Durch GTP-Bindung wird RAS aktiviert und kann mit unterschiedlichen Effektorproteinen interagieren und deren katalytische Aktivität stimulieren. Es existieren drei Hauptwege: Die RAF-Kinasen initiieren den MAPK-Weg, der über die Aktivierung von ERK u. a. zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen kann, die die Zellzyklusprogression steuern. PI3-K erzeugen „second messenger“-Lipide, wie PIP₃, die unterschiedliche Proteinsubstrate aktivieren. Die Aktivierung des Ral-Weges durch RAS induziert morphologische Veränderungen, die zu einer verstärkten Zellmotilität und -migration führen (verändert nach Downward 2003).

1.2.1.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Weg

Durch die vorher beschriebene Aktivierung des RAS-Proteins kann die Serin/Threonin-Kinase RAF gebunden werden. Dadurch kommt es zur Translokation von RAF aus dem Zytoplasma an die Plasmamembran. Die Interaktion mit RAS bewirkt zum einen eine Veränderung der Quartärstruktur und zum anderen die Phosphorylierung von RAF durch verschiedene Kinasen, wie z. B. Januskinasen (Kolch, W., 2000; Zebisch, A. und Troppmair, J., 2006). Dadurch kann RAF die dual-spezifische Kinase MEK (ERK-Aktivator Kinase) phosphorylieren, die daraufhin sowohl Serin- und Threonin- als auch Tyrosinreste anderer Kinasen phosphorylieren kann. Für die MEK-Aktivierung ist die subzelluläre Lokalisation der RAF-Kinase von ausschlaggebender Bedeutung. So konnten Tian und Mitarbeiter zeigen, dass konstitutiv aktives RAF ohne Sequenzmotiv zur Membranverankerung MEK nicht phosphorylieren konnte (Tian, T. *et al.*, 2007).

Die aktivierte MAPKK phosphoryliert die extrazellulär-regulierten Kinasen ERK1/2, die ihrerseits verschiedene zytoplasmatische Substratmoleküle stimulieren können. Zusätzlich kann phosphoryliertes ERK in den Zellkern translozieren und Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, was zu spezifischen Veränderungen der Genexpression führt. So kann u. a. die Promotoraktivität wichtiger „früher Gene“, wie z. B. der FOS- und JUN-Transkriptionsfaktoren verstärkt werden. Die gesteigerte Aktivierung dieser und anderer Transkriptionsfaktoren potenziert die qualitative und quantitative Umgestaltung der Genexpression. Die RAS-RAF-Signaltransduktionskaskade ist für die onkogene Transformation essentiell, da mutiertes RAF in verschiedenen Zelltypen den gleichen neoplastischen Phänotyp hervorrufen kann, der auch durch konstitutiv aktives RAS-Onkoprotein induziert wird (Bonner, T. I. *et al.*, 1985; Stanton, V. P., Jr. *et al.*, 1989). Eine weitere Studie, in der die durch RAS hervorgerufene maligne Transformation durch den Transfer eines dominant-negativen *raf*-Gens revertiert wurde, belegte ebenfalls die Bedeutung der MAPK-Kaskade für diesen Prozess (Heinicke, T. *et al.*, 2000).

1.2.1.2 Phosphatidylinositol3-Kinase (PI3-K)-AKT-Weg

Ein weiterer durch aktiviertes RAS beeinflusster Signaltransduktionsweg führt zur Bildung von sogenannten „second messenger“-Molekülen durch die PI3-K. PI3-K der Klasse I werden durch RAS-GTP und RTK reguliert. Sie bilden ein konstitutives

Heterodimer aus einer 85 kDa bzw. 101 kDa großen Adaptor- (p85 bzw. p101) und einer 110 kDa großen katalytischen Untereinheit, die je nach Isoform als p110 alpha, beta, gamma oder delta bezeichnet wird. Im inaktiven Zustand stabilisiert die Adaptor-domäne die katalytische Domäne. Nach Wachstumsfaktorstimulation kann p85 mit Hilfe seiner SH2-Domäne an phosphorylierte YxxM-Motive der RTK oder deren Substrat-Adaptorproteine binden. Dadurch wird die katalytische Domäne aktiv. Dieser Prozess wird für p110 α durch die Interaktion mit GTP-gebundenem RAS verstärkt (Rodriguez-Viciano, P. *et al.*, 1994; Rodriguez-Viciano, P. *et al.*, 1996; Bader, A. G. *et al.*, 2005). Ein hochaffines Substrat für p110 α ist Phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphat (PIP₂). PI3-K katalysiert die Kondensation einer Phosphatgruppe an die Hydroxylgruppe des dritten C-Atoms des Inositolringes, wodurch Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP₃) entsteht. PIP₃ kann als „second messenger“-Molekül mit Proteinen, die eine Pleckstrin-homologe (PH)-Domäne besitzen, interagieren und diese somit an der Zellmembran assoziieren. Ein wichtiger molekularer Schalter dieser Kaskade mit PH-Domäne ist die Serin/Threonin-Kinase Proteinkinase B/AKT. Die Interaktion der PH-Domäne von AKT mit der Inositol-Kopfgruppe von PIP₃ ermöglicht die Phosphorylierung an Thr308 durch die Kinase 3-Phosphatidylinositol-abhängige Kinase (PDK)1 (Vivanco, I. und Sawyers, C. L., 2002). Durch eine PDK2-medierte zweite Phosphorylierung des Serinrestes 473 wird AKT funktionell aktiv und erzielt durch die Phosphorylierung seiner Proteinsubstrate einen anti-apoptischen Effekt. So inhibiert es beispielsweise die Aktivität der Glykogensynthasekinase-3 β (GSK-3 β) durch die Phosphorylierung des Serinrestes an Position 9. Dadurch kann der pro-apoptische Einfluss der GSK-3 β auf die intrinsische mitochondriale Apoptosekaskade verhindert werden (Beurel, E. und Jope, R. S., 2006).

1.2.1.3 Ral-GEF-Weg

Ein weiteres wichtiges Zielprotein von RAS ist der Guaninnukleotidaustauschfaktor der Ral-Proteine Ral-GEF. Die Bindung an RAS führt zur Translokation des Ral-GEF an die innere Zytoplasmamembran folglich zur Substitution des GDP gegen GTP und damit zur Aktivierung der Ral-Proteine A und B. Die aktivierten Ral-Proteine können das Ral-Bindungsprotein Ral-BP1 inaktivieren. Dadurch wird die GTPase-Aktivität von Rac und Cdc42 nicht induziert. Transient aktives Rac und Cdc42 ermöglichen

die Ausbildung von Lamellipodien bzw. Filopodien (Symons, M., 1995; Bos, J. L., 1998; Wennerberg, K. und Der, C. J., 2004). Der Ral-GEF-Weg ist v. a. für die Motilität von neoplastischen Zellen von entscheidender Bedeutung (Bodemann, B. O. und White, M. A., 2008).

1.2.2 Isoformspezifische Induktion der Signaltransduktionsmaschinerie

Aufgrund der großen Sequenzhomologie wurde ursprünglich von einer funktionellen Redundanz der verschiedenen RAS-Isoformen ausgegangen. Erste Hinweise auf isoformspezifisches Signalverhalten lieferten die Bestimmungen der Mutationsraten verschiedener Tumorentitäten. Diese Analysen zeigten, dass die K-RAS-Isoform am häufigsten in humanen Tumoren mutiert vorliegt (Bos, J. L., 1989; Ellis, C. A. und Clark, G., 2000; Downward, J., 2003; Bamford, S. *et al.*, 2004). Weitere Beweise wurden durch Untersuchungen an „knock out“-Mäusen erlangt. In Mäusen, bei denen N- und/oder H-*ras* homozygot ausgeschaltet wurde, war eine normale Embryogenese und Entwicklung zu beobachten (Umanoff, H. *et al.*, 1995; Esteban, L. M. *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu starben K-*ras4B*^{-/-}-Mäuse zwischen dem 12. und 14. Tag der Embryogenese (Johnson, L. *et al.*, 1997). Darüber hinaus zeigten zahlreiche Arbeiten einen isoformspezifischen Einfluss auf die PI3-K-, RAF-MAPK- oder die Rac-Signalkaskade (Yan, J. *et al.*, 1998; Voice, J. K. *et al.*, 1999; Walsh, A. B. und Bar-Sagi, D., 2001). So konnte K-RAS4B die RAF-Kinase sehr viel effizienter als H-RAS an die Plasmamembran translozieren. Für die Aktivierung der PI3-K gilt die umgekehrte Situation. Die isoformspezifische Signaltransduktion führt zu einer Modulation biologischer Prozesse wie Fokusbildung, verankerungsunabhängiges Wachstum und Migration. So wurde von Voice und Koautoren (1999) die Aktivierung dieser Prozesse durch die vier homologen RAS-Proteine folgendermaßen klassifiziert (Voice, J. K. *et al.*, 1999):

- i) Fokusbildung: H-RAS \geq K-RAS4A \ggg N-RAS = K-RAS4B
- ii) Verankerungsunabhängiges Wachstum: K-RAS 4A \geq N-RAS \ggg K-RAS4B = H-RAS
- iii) Zellmigration: K-RAS4B \ggg H-RAS $>$ N-RAS = K-RAS4A.

1.3 Mechanismen der RAS-Aktivierung in menschlichen Tumoren

Die Progression hyperplastischen Gewebes ist häufig mit einer gesteigerten Aktivität der RAS-Proteine assoziiert. In humanen Tumorentitäten existieren mehrere Möglichkeiten:

1.3.1 Aktivierung durch Punktmutationen

In 20 % aller menschlichen Tumoren weist eines der *ras*-Gene eine Punktmutation auf, die zur Expression eines konstitutiv aktiven Onkoproteins führt. Dominant-positive Mutationen der *ras*-Protoonkogene, die zu einer onkogenen Aktivierung des G-Proteins führen, werden in menschlichen Tumoren fast ausschließlich in den Kodonen 12, 13 und 61 detektiert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Substitution eines der beiden Glycine an Position 12 bzw. 13 zu sterischen Kollisionen mit der Hauptseitenkette des Arginin-Fingers der GAP und der Aminogruppe der Glutamin 61-Seitenkette von RAS führt. Dadurch wird der Übergangszustand während der GTP-Hydrolyse nachhaltig beeinträchtigt und die Deaktivierung ist durch die intrinsische GTPase-Aktivität nicht mehr möglich bzw. stark verringert (Scheffzek, K. *et al.*, 1997). Ebenso kann die Stilllegung der GTPase-Aktivität durch die Substitution des Glutaminrestes der Position 61 erfolgen. Durch diese Veränderungen wird ein konstitutiv aktives Onkoprotein erzeugt, das nicht mehr zu inaktivieren ist. Damit wird die Zelle unabhängig von mitogenen Stimuli, was eine unkontrollierte Proliferation zur Folge hat. Das gehäufte Auftreten von *K-ras*-Mutationen in Tumoren unterschiedlicher Histologie legt eine wichtige Rolle dieser G-Proteinfamilie bei der Tumorentstehung und Metastasierung nahe.

1.3.2 Aktivierung durch Genamplifikation

Darüber hinaus kann es durch Genamplifikation zu einer erhöhten *ras*-Expression kommen, die ebenfalls zur malignen Transformation führen kann (Pulciani, S. *et al.*, 1985; Nicolaidis, A. *et al.*, 1994; Villa, E. *et al.*, 1996; Kozma, L. *et al.*, 1997; Hoa, M. *et al.*, 2002). So wurde beim Glioblastom ein Zusammenhang zwischen der Vervielfachung von *ras*-Loci und/oder Wachstumsfaktorrezeptoren aufgezeigt (Feng, J. *et al.*, 2001; Jeuken, J. *et al.*, 2007).

1.3.3 Aktivierung durch GAP-Inhibierung

Eine dritte Möglichkeit, die zu einer dauerhaften RAS-Aktivierung führen kann, ist die Inaktivierung oder der Verlust von GAP. Dieser Mechanismus liegt bei der Neurofibromatose Typ 1 (von-Recklinghausen-Syndrom) vor. Bei diesem vererbbaaren Tumor ist das RAS-GAP Neurofibromin von Deletionen, Translokationen, Insertionen oder Mutationen betroffen und kann dadurch die GTP-Hydrolyse von RAS nicht mehr regulieren. Dies führt zur Ausprägung von malignen, neuronalen Tumoren (Korf, B. R., 2000).

1.4 Prävalenz und Einfluss aktivierender K-*ras*-Mutationen auf den Tumorphänotyp

1.4.1 Häufigkeitsverteilung von *ras*-Mutationen in humanen Tumoren

Die *ras*-Gene waren die ersten identifizierten Onkogene. Ursprünglich wurden H- und K-*ras* als die transformierenden Gene des H(arvey)- und K(irsten)-Maussarkomvirus identifiziert (Harvey, J. J., 1964; Kirsten, W. H. und Mayer, L. A., 1967). Spätere Arbeiten konnten nicht-transformierende, zelluläre Analoga der viralen *ras*-Gene im eukaryotischen Genom identifizieren und zeigten, dass eine Punktmutation für die onkogene Aktivierung der RAS-Proteine ausreicht. N-*ras* wurde aus einer Neuroblastomzelllinie isoliert und konnte bisher in keinem Retrovirus identifiziert werden (Shimizu, K. *et al.*, 1983). Unter den verschiedenen RAS-Isoformen nimmt K-RAS eine Sonderstellung bei der Tumorprogression ein. Etwa 20 % aller humanen Tumore tragen aktivierende *ras*-Punktmutationen, von denen K-*ras* in 85 % der Fälle mutiert vorliegt. Je nach Patientenpopulation wurden Inzidenzen von bis zu 90 % beim Pankreas-, ca. 40 % bei Lungen- und ca. 50 % beim Kolorektalkarzinom detektiert (Downward, J., 2003). Dominant-positive Mutationen des N-*ras*-Gens werden in ca. 15 % der untersuchten Tumorentitäten gefunden. Der Einfluss des H-*ras*-Gens auf die Tumorinitiation ist v. a. auf Genamplifikationen zurückzuführen (Bos, J. L., 1989; Rodenhuis, S., 1992; Macaluso, M. *et al.*, 2002; Bamford, S. *et al.*, 2004). Die unterschiedlichen Frequenzen spiegeln möglicherweise die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Isoformen wider, da bei der Untersuchung von 18 Tumorzelllinien K-*ras* als die am stärksten exprimierte detektiert werden konnte (Omerovic, J. *et al.*, 2008). Eine Zusammenstellung der verfügbaren Mutationsraten in unterschiedlichen Tumorentitäten bietet die COSMIC (Catalogue of Somatic

Mutations in Cancer)-Datenbank des Wellcome Trust Sanger-Institutes (Cambridge, UK) (Bamford, S. *et al.*, 2004). Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Prävalenzen der verschiedenen RAS-Isoformen in ausgewählten Tumorerläsionen.

Tabelle 1.1: Inzidenz von H-, N- und K-ras-Mutationen in menschlichen Tumoren.

Tumorentität	H-ras	N-ras	K-ras
Blase	11 %	3 %	4 %
Brust	0 %	0 %	4 %
Kolon	0 %	3 %	32 %
Endometrium	1 %	0 %	15 %
Gallengang	0 %	1 %	33 %
Leukämien	0 %	14 %	5 %
Lunge	1 %	1 %	19 %
Melanoma	6 %	18 %	2 %
Niere	0 %	0 %	1 %
Ovar	0 %	4 %	17 %
Pankreas	0 %	2 %	60 %
Schilddrüse	5 %	7 %	4 %

Die Inzidenzen wurden der COSMIC-Datenbank des Sanger Institute of Somatic Mutations entnommen (www.sanger.ac.uk/cosmic).

Das gehäufte Auftreten des mutierten K-ras-Gens liegt darin begründet, dass von einer K-ras-Mutation gleichzeitig zwei Genprodukte betroffen sind: Aktivierende Punktmutationen sind in den *ras*-Genen fast immer in Kodonen, die für Aminosäurereste in der hochkonservierten „Switch“-II-Region oder/und dem sogenannten „P-Loop“ kodieren, lokalisiert. Dies bedeutet, dass eine dominant-positive Mutation des K-ras-Genes dazu führt, dass zwei konstitutiv aktive Onkogene exprimiert werden können. Obwohl die beiden K-RAS-Isoformen Spleißvarianten eines Genes sind, unterscheiden sich ihre biologischen Aktivitäten stark voneinander (Voice, J. K. *et al.*, 1999); siehe Kap. 1.2.2). Damit können durch eine aktivierende Mutation parallel mehrere für die maligne Transformation wichtige Signalkaskaden aktiviert werden. Möglicherweise lässt sich daraus die hohe Mortalitätsrate von Patienten mit Pankreas- und Lungentumoren ableiten (Schuller, H. M., 2002).

1.4.2 Auswirkungen verschiedener K-ras-Mutationen auf den Tumorphänotyp

Mehrere Studien beschrieben, dass die Position der aktivierenden Punktmutation die Ausprägung des Tumorphänotyps bestimmt. So konnten zellbiologische *in vitro*-Untersuchungen zeigen, dass Mutationen im Kodon 12 des K-ras-Gens gegenüber Kodon 13 eine höhere Apoptoseresistenz und eine Prädisposition zu verankerungsunabhängigem Wachstum vermitteln (Guerrero, S. *et al.*, 2000). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte die Ausprägung unterschiedlicher Tumorphänotypen durch die Generierung von Tumoren nach subkutaner Injektion von K-ras-Kodon 12 und 13 transformierten murinen Fibroblasten *in vivo* bestätigen (Guerrero, S. *et al.*, 2002). Dabei führte die Injektion von durch Kodon 12 transformierten Fibroblasten zur Ausprägung des fibrosarkomen Phänotyps, während Kodon 13-Mutationen den moderat aggressiven malignen fibrösen Histozytom-Phänotyp induzierten (Guerrero, S. *et al.*, 2002).

Statistische Analysen von Patientengruppen mit Kolorektalkarzinomen bestätigten den Einfluss der Lokalisation der K-ras-Punktmutation auf den ausgeprägten Phänotyp. So konnten Bazan und Mitarbeiter anhand einer Kohorte von 160 Kolorektalkarzinom-Patienten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer K-ras-Mutation in Kodon 12 und dem mukinösen Differenzierungsweg ableiten. In dieser Studie waren Kodon 13-Mutationen meist mit fortgeschrittenem Tumorstadium und Lymphknotenmetastasen assoziiert (Bazan, V. *et al.*, 2002). Eine andere Studie mit 3439 Kolorektalkarzinompatienten lieferte einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Austausch von Glycin zu Valin in Position 12 und einer erhöhten Mortalität (Andreyev, H. J. *et al.*, 2001). Dieser Befund konnte durch biochemische Analysen erklärt werden, die beim Vergleich dieser Mutation mit anderen Aminosäuresubstitutionen in Position 12 die stärkste Verringerung der GTPase-Aktivität des Onkoproteins detektierten (Al-Mulla, F. *et al.*, 1999). Darüber hinaus beeinflusst diese Mutation auch das Dissoziationsgleichgewicht von Effektormolekülen, wie z. B. RAF-1 (Al-Mulla, F. *et al.*, 1999).

Neben dem Einfluss auf Tumorprogression und -prognose hängt das Auftreten der K-ras-Mutationen auch von der Tumorlokalisierung ab. Ein signifikant gehäuftes Auftreten von Kodon 12-Mutationen wurde in distalen Tumoren sowie im fortgeschrittenen Tumorstadium beim Kolonkarzinom nachgewiesen. Weiterhin

wurde eine 40-%ige Erhöhung der Kurzzeitmortalität beim Vorhandensein einer Kodon 13-Mutation festgestellt (Samowitz, W. S. *et al.*, 2000).

1.5 Der Einfluss von Onkogenen auf das Immunsystem

1.5.1 Die MHC-Klasse-I-Antigenprozessierungsmaschinerie (APM)

Kernhaltige Zellen exprimieren MHC-Klasse-I-Moleküle, die gewebespezifisch zelleigene antigene Peptide auf der Zelloberfläche präsentieren. Nach der Infektion mit einem Pathogen oder bei maligner Transformation verändert sich das Antigenrepertoire der Zelle. Dadurch kann die zelluläre Immunantwort die Lyse dieser Zellen einleiten. Dieser Prozess wird nach der Bindung der MHC-Klasse-I-Komplexe durch CD8-Moleküle auf der Oberfläche der zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) und der Erkennung des präsentierten körperfremden oder mutierten Peptids durch den T-Zellrezeptor induziert. Die Generierung und Präsentation der antigenen Peptide aus körpereigenen, körperfremden bzw. tumorassoziierten Proteinen wird als Antigenprozessierung bezeichnet und soll in den folgenden Abschnitten vorgestellt werden:

Die Generierung antigenen Peptide beginnt im Zytosol, indem polyubiquitinierte Proteine durch das multikatalytische Proteasom degradiert werden. Dieser Multienzymkomplex ist aus den regulatorischen Komplexen 11S und/oder 19S sowie dem katalytischen 20S-Proteasom aufgebaut (Lowe, J. *et al.*, 1995). Das 20S-Proteasom setzt sich aus zwei äußeren, heptameren α - und zwei inneren, heptameren β -Untereinheiten zusammen, die aufgrund ihrer Anordnung eine zylinderartige Struktur bilden. Die Zusammensetzung der enzymatisch aktiven β -Untereinheiten ist durch Interferon-gamma (IFN- γ) modulierbar. Durch dessen Einfluss werden die konstitutiv exprimierten Untereinheiten X, Y und Z gegen die induzierbaren Untereinheiten LMP 2, 7 und 10 ausgetauscht (Belich, M. P. *et al.*, 1994). Darüber hinaus bewirkt IFN- γ den Einbau der 11S-Untereinheit in das Proteasom. Diese Zusammenlagerung führt zu einer erhöhten proteolytischen Enzymaktivität und verstärkt die Bildung antigenen Peptide (Dick, T. P. *et al.*, 1996). Das Proteasom fragmentiert Proteine zu 3-22 Aminosäuren großen Peptiden (Kisselev, A. F. *et al.*, 1999). Diese Proteinformen können durch zytosolische Peptidasen weiter prozessiert werden. Im nächsten Schritt der Antigenprozessierung wird ein Teil der erzeugten Peptide mit Hilfe des heterodimeren ATP-abhängigen

ABC-Transporters TAP („transporter associated with antigen presentation“), der sich aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2 aufbaut, in das ER transloziert. Dabei bindet TAP sequenz- und längenspezifisch 8-16 Aminosäuren lange Peptide, jedoch werden 8-12 Aminosäuren große Peptide am effektivsten transportiert (Androlewicz, M. J. und Cresswell, P., 1994; van Endert, P. M. *et al.*, 1994). Neben der Peptidlänge spielt auch die Peptidsequenz eine entscheidende Rolle für die Transporteffektivität. Im ER-Lumen werden die Peptide N-terminal durch die ER-assoziierten Peptidasen ERAP1/2 auf eine Länge von 8-11 Aminosäuren verkürzt. Die so erzeugten Peptide werden durch den makromolekularen Peptidbeladungskomplex (PLC), der sich aus TAP1, TAP2, Tapasin, der schweren MHC-Klasse-I-Kette, β_2 -Mikroglobulin, Calretikulin und ERp57 konstituiert, auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen (Ortmann, B. *et al.*, 1997; Antoniou, A. N. *et al.*, 2003). Die MHC-Klasse-I-Moleküle setzen sich aus den drei α -Untereinheiten der schweren Kette und dem nicht-kovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin zusammen. Dieser Komplex ist instabil und kann durch Peptidbeladung oder Interaktion mit Tapasin stabilisiert werden. Nach ihrer Synthese interagiert die schwere Kette mit dem immunglobulinbindenden Protein (BiP) und Calnexin im ER-Lumen. Anschließend dissoziiert die schwere Kette von Calnexin und assoziiert mit β_2 -Mikroglobulin, Calretikulin, ERp57 und einem präassemblierten Komplex aus TAP1, TAP2 und Tapasin zum kompletten PLC. Dieser ist für die Beladung leerer MHC-Klasse-I-Moleküle essentiell. Beim darauffolgenden Aufbau des MHC-Klasse-I/Peptid-Komplexes übernehmen die molekularen Faltungshelfer Tapasin, Calnexin, Calretikulin und/oder ERp57 mehrere wichtige Funktionen:

- i) Sie stabilisieren die MHC-Klasse-I-Moleküle während deren Konformationsfindung und Zusammenlagerung.
- ii) Sie besitzen Peptidbindungskapazität und
- iii) assistieren bei der Peptidbeladung des MHC-Klasse-I-Moleküles (Hammond, C. und Helenius, A., 1995; Sadasivan, B. *et al.*, 1996; Seliger, B. *et al.*, 2000).

Nach der Peptidbeladung des MHC-Klasse-I-Moleküles kommt es zur Dissoziation des trimeren Komplexes aus schwerer MHC-Klasse-I-Kette/ β_2 -Mikroglobulin/Peptid vom PLC und zur Translokation des Komplexes über das trans-Golgi-Netzwerk an

die Zelloberfläche zur Präsentation für ZTL (Zinkernagel, R. M. und Doherty, P. C., 1979). Abbildung 1.5 gibt den dargestellten Prozess schematisch wieder.

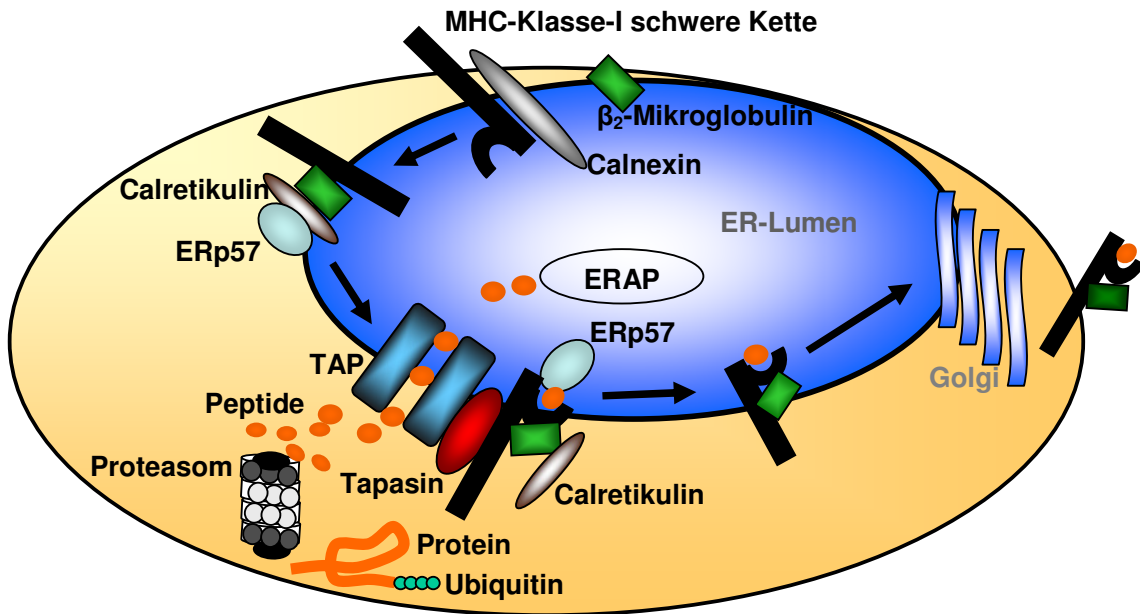


Abb. 1.5: Die MHC-Klasse-I-Antigenprozessierungsmaschinerie.

Antigene Peptide werden im Zytosol durch die proteasomale Degradation ubiquitiniertes Peptide generiert. Im ER wird der heterodimere Komplex aus schwerer Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls und β_2 -Mikroglobulin mit Hilfe der Faltungshelfer Calnexin, Calretikulin und ERp57 gebildet. Die zytosolischen Peptide werden vom Peptidtransporter TAP in das ER-Lumen transportiert, wo die Peptidbeladung des dimeren MHC-Komplexes durch Tapasin koordiniert wird. Anschließend wird der trimere Komplex über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche transportiert und dort den zytotoxischen T-Zellen präsentiert (verändert nach Seliger *et al.* 2000).

1.5.2 Der Einfluss von Onkogenen auf die MHC-Klasse-I-Expression

Die onkogene Transformation geht häufig mit einer verminderten Expression der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression und bestimmter APM-Komponenten einher. Dadurch sind Tumorzellen in der Lage sich der Immunüberwachung insbesondere durch ZTL zu entziehen („Immune escape“). Dieses Phänomen konnte durch die Analyse der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression sowie von APM-Komponenten in mehreren Studien gezeigt werden. Die Transfektion muriner Fibroblasten mit onkogenem H-*ras* führte zu einer stark verringerten MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in den transformierten Zellen, die in einer verminderten ZTL-Antwort resultierte (Ehrlich, T. *et al.*, 1993; Seliger, B. *et al.*, 1996; Seliger, B. *et al.*, 1998). Die mit onkogenem H-*ras*-transformierten Zellen exprimierten stark reduzierte Mengen an LMP2 und TAP. Die H-RAS induzierte Herunterregulation dieser APM-Komponenten führte zu einer reduzierten Peptidbeladung und damit zu einer

instabilen MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (Seliger, B. *et al.*, 1998). Neben onkogenem H-*ras* hatte die induzierte Expression der Protoonkogene *mos*, *myc* und *fos* den gleichen Effekt auf die Expression der MHC-Klasse-I-Oberflächenmoleküle (Lohmann, S. *et al.*, 1996). In einem weiteren *in vitro*-Modell der Überexpression des Protoonkogens Her2/Neu wurde aufgrund einer verringerten Expression der APM-Komponenten LMP2/10, PA28 α/β , TAP1/2 und Tapasin eine mehr als 50-%ige Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression detektiert. Die beschriebenen Veränderungen resultierten in einer verringerten Lyse durch ZTL (Herrmann, F. *et al.*, 2004). Darüber hinaus bewiesen die immunhistochemischen Analysen von Kolorektalkarzinomen eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von K-*ras*-Mutationen und Defizienzen bei den APM-Komponenten TAP1, LMP und Tapasin (Atkins, D. *et al.*, 2004).

Die verminderte APM-Komponentenexpression in unterschiedlichen malignen Läsionen kann zu einer Beeinträchtigung der Prozessierung tumorassoziierter Antigene (TAA) und zu einer verminderten Präsentation TAA-generierter Peptide für ZTL führen. Damit stellt dieser Mechanismus einen sogenannten „Immune escape“-Phänotyp für maligne Zellen dar.

1.6 Analyse des pleiotropen Einflusses der RAS-Proteine

Als zentraler Wechselschalter zahlreicher Signaltransduktionswege erzielt RAS einen pleiotropen Effekt, der zu einer veränderten Genexpression führt. Obwohl die Interaktion zwischen RAS und vielen seiner Effektormoleküle bekannt ist, ist das durch die Aktivierung dieser Signalwege veränderte Expressionsprofil auf mRNA- und Proteinniveau wenig untersucht. Zur globalen Detektion der RAS-beeinflussten Genexpressionsunterschiede stellen Transkriptom- und Proteomanalysen über Hochdurchsatzverfahren geeignete Werkzeuge dar. Mit Hilfe dieser Techniken ist es möglich, potentielle Biomarker der RAS-vermittelten Tumorprogression zu identifizieren. Darüber hinaus führen derartige Ansätze zu einem besseren Verständnis RAS-assoziiertes, zellulärer Prozesse und zeigen mögliche pharmakologische Angriffspunkte für die Therapie von Tumoren mit mutiertem *ras*-Status auf.

Zur Identifizierung derartiger Zielstrukturen wurden bisher v. a. Transkriptomanalysen durchgeführt. So konnten Tchernitsa und Koautoren in einer ovariellen Ratten-

epithelzelllinie, die durch *K-ras* Onkogen-transformiert war, mehr als 200 differentiell exprimierte Gene identifizieren (Tchernitsa, O. I. *et al.*, 2004). Mit Hilfe spezifischer Inhibitoren des MAPK- und des PI3-K-Weges konnten Gene selektiert werden, die am verankerungsunabhängigen Wachstum bzw. an der epithelial-mesenchymalen Transition involviert sind. Eine weitere Studie detektierte beim Vergleich eines *in vitro*-Modells einer präneoplastischen Nagerzelllinie, die konstitutiv aktives K-, N- oder H-*ras* exprimierte, eine zu ca. 90 % überlappende mRNS-Expressionssignatur. In diesem *in vitro*-Modell wurden 26 cDNS-Fragmente von den einzelnen RAS-Isoformen unterschiedlich reguliert (Zuber, J. *et al.*, 2000).

Die Analyse des globalen Proteinexpressionsprofils RAS-induzierter Signaltransduktion beschränkte sich v. a. auf *in vitro*-Modelle H-RAS vermittelter Transformation. Zum einen wurden Proteomanalysen an einer durch mutiertes H-RAS transformierten ovariellen Epithelzelllinie (Young, T. W. *et al.*, 2004) und zum anderen in mit konstitutiv aktivem H-RAS transformierten murinen, embryonalen Fibroblasten (Jin, B. F. *et al.*, 2006; Park, J. W. *et al.*, 2006; Ji, H. *et al.*, 2007) durchgeführt. Dabei wurden je nach Studie zwischen 30 und 80 differentiell exprimierte Proteine identifiziert. Die durch H-RAS in ihrer Expression modulierten Proteine konnten in folgende Familien klassifiziert werden: Metabolische Enzyme, Strukturproteine, Hitzeschockproteine, Oxidoreduktasen sowie Proteine, die Transkriptions- und Translationsprozesse beeinflussen.

1.7 Zielstellung der Arbeit:

Onkogene RAS-Proteine verändern durch die konstitutive Aktivierung diverser Signalkaskaden die Gen-/Proteinexpression, die unterschiedliche zelluläre Prozesse induzieren kann. Bei der malignen Transformation legt das gehäufte Auftreten von *K-ras*-Mutationen in verschiedenen Tumorentitäten eine wichtige Rolle dieses monomeren G-Proteins bei der Tumorentstehung und -progression nahe (Schubbert, S. *et al.*, 2007). Darüber hinaus scheint die Position der aktivierenden Aminosäuresubstitution die Ausprägung des Tumorphänotyps zu bestimmen. So zeigten klinische und experimentelle Befunde einen Einfluss der molekularen Struktur des K-RAS-Onkoproteins auf das maligne Potential von Tumoren (Andreyev, H. J. *et al.*, 2001; Bazan, V. *et al.*, 2002; Guerrero, S. *et al.*, 2002). Obwohl die Funktion der RAS-Proteine bei klassischen Signaltransduktionswegen wie dem MAPK-Weg gut

verstanden ist, existieren nur wenige Studien zur Bestimmung der daraus resultierenden Modulation des Gen-/Proteinexpressionsprofils (Omerovic, J. *et al.*, 2007; Rajalingam, K. *et al.*, 2007). Diese Auswirkungen wurden bisher v. a. auf mRNA-Ebene durch „Microarray“-Analysen untersucht (Zuber, J. *et al.*, 2000; Tchernitsa, O. I. *et al.*, 2004). Daher soll der pleiotrope Effekt der Überexpression verschiedener *K-ras*-Genvarianten/Allele in einem *in vitro*-Modell onkogener Transformation in der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 auf Proteinebene untersucht werden. Dazu soll die durch Überexpression von onkogenem und protoonkogenem *K-ras* bewirkte Veränderung des zellulären Proteinexpressionsprofils mit Hilfe der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese erfasst und differentiell exprimierte Proteine massenspektrometrisch identifiziert werden.

In einem weiteren Ansatz soll analysiert werden, wie die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation durch (proto)onkogenes K-RAS beeinflusst wird. Dabei sollen die molekularen Ursachen der Immunogenität Onkogen-transformierter Zellen untersucht werden. Dies soll zu einem besseren Verständnis der K-RAS-medierten Modulation der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation beitragen.

Die Arbeit gliedert sich in folgende Abschnitte:

- **Etablierung verschiedener RAS-transformierter Zelllinien**

Es sollen zunächst verschiedene *K-ras*-cDNS, die jeweils eine dominant-positive Mutation besitzen, in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert werden. Es sollen Mutationen ausgewählt werden, deren klinische Relevanz in mehreren Studien gezeigt wurde, d. h. Mutationen in Kodon 12, 13 und 61 (Bos, J. L., 1989). Nach Transfektion dieser Konstrukte in NIH3T3-Zellen sollen mehrere Klone, die mutiertes und wildtypisches *K-ras* stabil exprimieren, selektiert werden. Als Kontrollen sollen die Parentalzelllinie sowie eine durch Transfektion mit dem Vektorrückgrat generierte Leervektor-Kontrolle verwendet werden.

- **Charakterisierung der onkogenen Transformanten**

Der Einfluss der verschiedenen *K-ras*-Mutationen bzw. der Wildtyp-*K-ras*-Überexpression soll anhand der Fähigkeit zu verankerungsunabhängigem Wachstum analysiert werden. Des Weiteren soll die Funktionalität des *in vitro*-Modells durch die Analyse des Aktivierungsstatus wichtiger Signalkaskaden wie dem MAPK- und dem PI3-K-Weg überprüft werden.

- **Untersuchung der MHC-Klasse-I-Expression in den K-*ras*-Transfektanten**
Es soll der Einfluss der (proto)onkogenen K-*ras*-Überexpression auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression bestimmt werden. Darüber hinaus soll der Expressionsstatus wichtiger APM-Komponenten in den RAS-transformierten Zelllinien mit dem der Kontrollzelllinien durch Echtzeit-quantitative Reverse Transkription-PCR auf mRNA-Ebene und mittels Western Blot-Analysen auf Proteinebene verglichen werden.
- **Analyse des Einflusses von K-RAS auf das globale Proteinexpressionsprofil**
Zur Bestimmung potentieller Zielstrukturen bei RAS-induzierter Signaltransduktion sollen Gesamtproteinlysate der verschiedenen Zelllinien hergestellt und mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Expressionsprofile sollen anschließend quantitativ analysiert und differentiell exprimierte Proteine durch Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie identifiziert werden.
- **Validierung potentieller Biomarker**
Die K-RAS-induzierte Expressionsänderung potentieller Biomarker soll durch verschiedene Methoden validiert werden. Bei kommerziell verfügbaren Antikörpern durch Western Blot-Analysen direkt auf Proteinebene und/oder durch Echtzeit-quantitative Reverse Transkription-PCR auf Transkriptionsebene.
- **Funktionelle Analyse der Überexpression von (proto-)onkogenem K-*ras* auf zellbiologische Prozesse**
Die Bedeutung der differentiell exprimierten Proteine auf die onkogene Transformation soll mittels entsprechenden zellbiologischen Methoden evaluiert werden.

Diese Analysen sollen zur Identifizierung von Proteinen führen, deren Expressions-/Aktivierungsstatus durch K-RAS beeinflusst wird. Diese Genprodukte können, nach entsprechender Validierung in humanen Tumoren, mögliche therapeutische Ansatzpunkte für Tumoren mit K-*ras*-Mutationen darstellen. Darüber hinaus sollen funktionelle Analysen dieser Zielstrukturen zu einem besseren Verständnis RAS-induzierter zellulärer Prozesse beitragen.

2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt) und Merck KGaA (Darmstadt) bezogen. Für Versuche in denen Chemikalien anderer Hersteller eingesetzt wurden, ist der Firmenname in Klammern angegeben. Die Oligonukleotide für PCR-Reaktionen wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert und sind im Anhang aufgelistet. Verwendete Geräte können ebenfalls dem Anhang entnommen werden.

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Mikroorganismen und Zelllinien

2.1.1.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sind mit ihren Genotypen und Referenzen in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verwendete *E. coli*-Stämme mit Genotypen und Referenzen.

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α	SupE44 Δ lacU169 (Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15) HsdR17 recA1 endA1 gyrA96thi-1 relA1	Hanahan (1983)
TOP 10 F	F ⁺ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen (Karlsruhe)
XL1-Blue	RecA1 endA1 gyrA96thi hsdR17 (rk-, mk+) supE44 relA1 λ -lac-[F ⁺ pro AB lacIqZ λ M15 Tn10(tet)]	Bullock <i>et al.</i> (1987)

E. coli DH5 α ist ein rekombinationsdefizienter Stamm, der für Plasmidvervielfältigungen geeignet ist. Außerdem erlaubt die Φ 80/*lacZ* Δ M15-Mutation eine α -Komplementation mit dem N-Terminus der β -Galactosidase, der in diesem Stamm von pUC-Vektoren oder Vektorderivaten zur Verfügung gestellt wird (Sambrook, J. *et al.*, 1989). Dadurch sind Blau-Weiß-Selektionen auf X-Gal- und IPTG-haltigem Selektionsagar möglich.

Der *E. coli*-Stamm TOP 10 F wurde für Topoisomeraseklonierungen verwendet und ist im Klonierungskomplettsystem TOPO-TA™ (Invitrogen) enthalten. Die Bakterien besitzen eine Kompetenz von 1×10^9 Transformanten/ μg DNS. Aufgrund der Deletion *lacZ* Δ M15 auf dem Fertilitätsplasmid F` können sie ebenfalls für die Blau-Weiß-Selektion unter o. g. Bedingungen eingesetzt werden.

Der *E. coli*-Stamm XL1-Blue wird im Komplettsystem für die ortsspezifische Mutagenese von Stratagene (La Jolla, US) zur Verfügung gestellt und kann ebenfalls für Blau-Weiß-Selektionen eingesetzt werden.

2.1.1.2 Zelllinien

2.1.1.2.1 Parentalzelllinie

Die in dieser Arbeit verwendete murine, embryonale Fibroblastenzelllinie NIH3T3 wurde von der American Tissue Culture Collection bezogen (ATCC-Nr.: CRL-1658™). Bei NIH3T3-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die starke Zellkontaktinhibition während der Proliferation zeigt. Sie wurde aus NIH Swiss Maus-Embryonenkulturen etabliert (Jainchill J. L. *et al.*, 1969) und wurde ausgewählt, da sie eine hohe Transfektionseffizienz besitzt. Außerdem erwies sie sich in früheren Arbeiten bei *in vitro*-Studien der onkogenen Transformation als geeignet (Copeland, N. G. und Cooper, G. M., 1979).

2.1.1.2.2 Zelllinien zur Gewinnung von Wildtyp- und mutierter humaner K-ras-DNS

Zur Isolation der Wildtyp-cDNS von K-ras diente die Lungenkarzinomzelllinie Colo-699. Die Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 besitzt eine Transition in Kodon 13 des humanen K-ras-Gens, die in der Aminosäuresubstitution von Glycin zu Asparaginsäure resultiert. Durch die transversale Mutation in Kodon 12 der Kolonkarzinomzelllinie SW-480 wird Glycin durch Valin ersetzt (Delp, K. *et al.*, 2000). Alle genannten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

2.1.2 Plasmide

2.1.2.1 pCR2.1-TOPO

Der von der Firma Invitrogen bereitgestellte, linearisierte Vektor pCR2.1-TOPO besitzt einen einzelnen 3`-Thymidin-Überhang. Durch die an diesen Vektor gekoppelte Topoisomerase II ist es möglich, Amplifikate zu klonieren, die einen 3`-Desoxyadenosinüberhang besitzen. Durch diesen Vektor stehen nach Überprüfung der korrekten Insertion des DNS-Fragments Restriktionsschnittstellen zur weiteren Klonierung in Expressionsvektoren zur Verfügung. Abbildung 2.1 zeigt die Plasmidkarte mit Replikationsursprüngen, Antibiotikaresistenzgenen und seiner multiplen Klonierungsstelle.

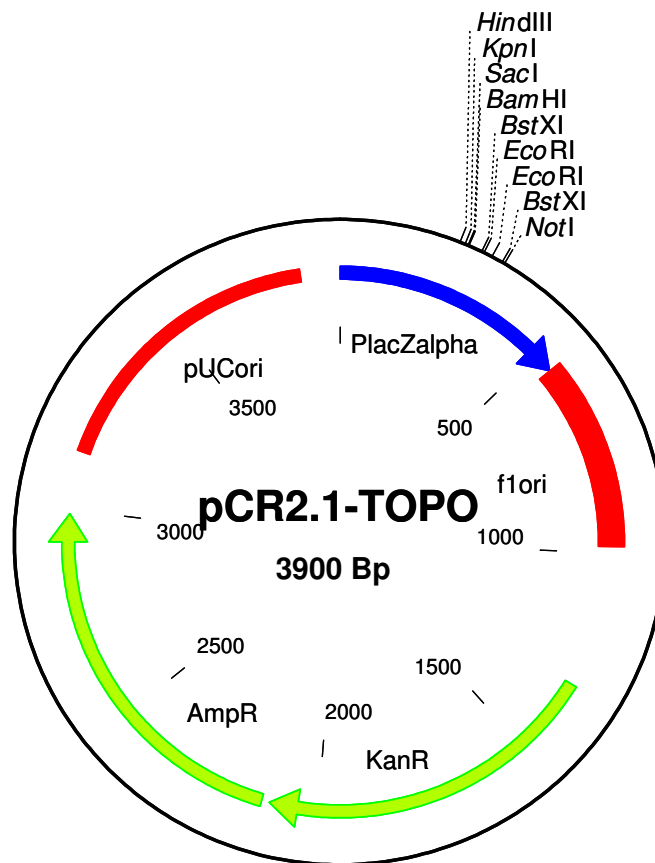


Abb. 2.1: Plasmidkarte von pCR2.1-TOPO.

AmpR = Ampicillinresistenzgen; KanR = Kanamycinresistenzgen; pUC ori = Replikationsursprung; PlacZalpha = lacZ-Promotor; lacZ α = Fragmentbasen 1-547 des lacZ-Gens; f1 ori = Replikationsursprung des F-Plasmids.

2.1.2.2 pIREShyg

Dieser Vektor besitzt die interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) des Enzephalomyokarditisvirus zwischen der multiplen Klonierungsstelle und dem eukaryotischen Selektionsmarker Hygromycin (HygR). Dadurch wird die gleichzeitige Translation des offenen Leserasters des zu exprimierenden Gens und des Selektionsgens ermöglicht (Jackson, R. J. *et al.*, 1990; Rees, S. *et al.*, 1996). Die pIREShyg-Vektorkarte ist in Abbildung 2.2 gezeigt.

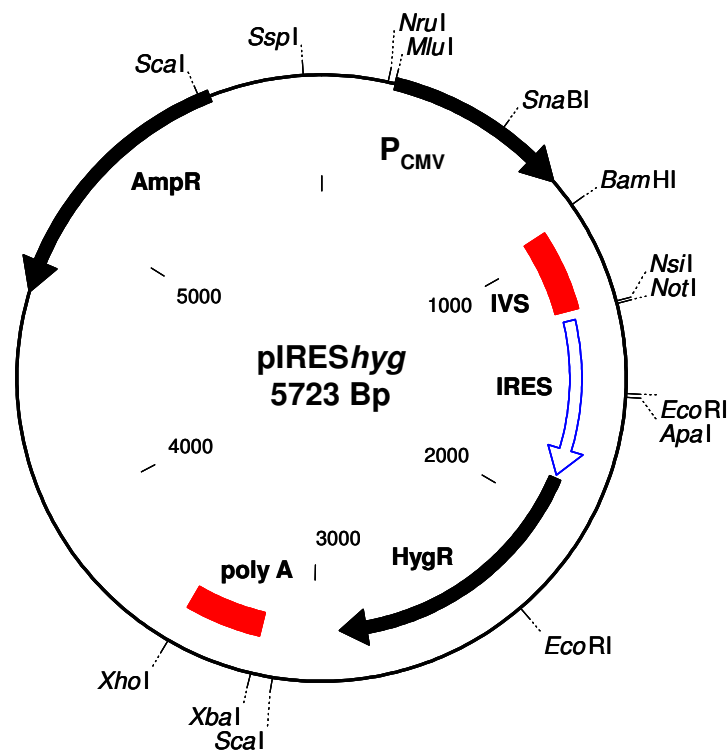


Abb. 2.2: Plasmidkarte von pIREShyg und seiner multiplen Klonierungsstelle.

P_{CMV} = Promotor des Zytomegalievirus; IRES = Interne Ribosomeneintrittsstelle; IVS = synthetische Intronsequenz; HygR = Hygromycinresistenzgen; poly A = Polyadenylierungssequenz des bovinen Wachstumsfaktors; AmpR = Ampicillinresistenzgen.

2.1.3 Enzyme

2.1.3.1 Restriktionsendonukleasen

Für die Klonierungen, zur Linearisierung und zur Insertionsüberprüfung wurden folgende Restriktionsendonukleasen verwendet, die alle von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen wurden:

SspI, XmaCI, PstI, SmaI, BamHI, EcoRV, NcoI, NotI.

2.1.3.2 Weitere Enzyme

<i>Taq/Pwo</i> -Polymerase	Roche Diagnostics
Proteinase K	Roche Diagnostics
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics
DNase	Invitrogen
RNaseA	Sigma (Taufkirchen)
T4-DNS-Ligase	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Trypsin	Promega (Madison, US)

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

IgG2A (Isotypkontrolle)	Beckmann/Coulter (Krefeld)
α -H-2L ^d	Cedarlane (Hornby, Kanada)

2.1.4.2 Antikörper für Immunoblotanalysen

Tabelle 2.2: Antikörper zur zielgerichteten Expressionsanalyse und zur Analyse des Aktivierungsstatus bestimmter Signaltransduktionskaskaden.

Antikörper	Spezies	Applikation	Affinität	Quelle
anti-AKT	Kaninchen	Western Blot	1:500	CST, Denvers (US)
anti-phospho-AKT Ser473	Kaninchen	Western Blot	1:500	Biosource (Karlsruhe)
anti-Calretikulin	Kaninchen	Western Blot	1:1000	ABR, Golden (US)
anti-ERK	Kaninchen	Western Blot	1:500	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-phospho-ERK Tyr204	Maus	Western Blot	1:500	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-Esterase D	Maus	Western Blot	1:500	Novus Biologicals, Littleton (US)
anti-FK506-Bindeprotein4	Ziege	Western Blot	1:500	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-gp96	Ratte	Western Blot	1:1000	ABR, Golden (US)
anti-Katalase	Kaninchen	Western Blot	1:1000	Biomol, Hamburg
anti-PA 28 α	Kaninchen	Western Blot	1:1000	Biomol, Hamburg
anti-phospho-RAF Ser259	Kaninchen	Western Blot	1:500	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-Pyruvatkinase M2	Kaninchen	Western Blot	1:1000	CST, Denvers (US)
anti-Ras	Maus	Western Blot	1:200	Perbio (Bonn)
anti-Tapasin	Kaninchen	Western Blot	1:5000	Ortmann, B. (Köln)
anti-TAP1	Kaninchen	Western Blot	1:1000	Rockland, Gilbertsville (US)
anti-phospho-Tyrosin	Maus	Western Blot	1:1000	CST, Denvers (US)
anti- β -Aktin	Maus	Western Blot	1:5000	Abcam, Cambridge (UK)

2.1.4.3 Enzym/Fluoreszenz-konjugierte Antikörper

Ziege-anti-Maus-IgG-FITC	DAKO (Hamburg)
Schwein-anti-Kaninchen-HRP	DAKO
Kaninchen-anti-Ziege-HRP	DAKO
Kaninchen-anti-Ratte-HRP	DAKO

FITC = Fluoreszeinisothiocyanat; HRP = Meerrettichperoxidase

2.1.5 Medien und Agar

2.1.5.1 Nährmedien für *E. coli*

LB (Luria-Bertoni)-Medium

Trypton (Difco, Augsburg)	10 g
Hefeextrakt (Difco)	5 g
NaCl (Roth, Karlsruhe)	5 g
H ₂ O	1 l

LB-Agar

LB-Medium + 2 % (w/v) Agar (Difco)

Zur Selektion wurde den Medien Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzugefügt.

2.1.5.2 Medien für die Zellkultur

MEM	Seromed (Berlin)
DMEM	Invitrogen

Den Zellkulturmedien wurden jeweils folgende Lösungen/Zusätze in den angegebenen Endkonzentrationen hinzugefügt:

Fötale Kälberserum (FKS) (Invitrogen)	10 % (v/v)
L-Glutamin (Seromed)	2 mM
HEPES (Roth)	10 mM
Penicillin (Gibco BRL, Eggenstein)	100 IU/ml
Streptomycin (Gibco BRL)	100 µg/ml

Zur Selektion der mit pRES_{hyg}-Vektoren transfizierten Zellen wurde das Kulturmedium mit 170 µg/ml aktivem Hygromycin B (Roth) supplementiert. Die Passagierung der adhären Zellen erfolgte durch Ablösung mit Trypsinlösung (0,05 % (w/v) Trypsin; 0,02 % EDTA (Invitrogen)) und entsprechender Teilung.

2.1.6 Molekulargewichtsmarker

Nukleinsäurenlängenstandards

100 Bp-Leiter	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
1000 Bp-Leiter	New England Biolabs

Proteingrößenstandards

RPN 800	Amersham Pharmacia
PageRuler	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*-Zellen

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Medium. Für die Inokulation der Medien wurde jeweils eine Einzelkolonie eingesetzt, die durch vorhergehendes Ausstreichen auf einer LB-Agar-Platte gewonnen wurde. Flüssigkulturen wurden mit einer Frequenz von 200-250 Upm auf einem Rotationsschüttler bei 37 °C inkubiert. Agar-Platten wurden ebenfalls bei 37 °C bebrütet. Die Inkubationsdauer betrug 12-16 Stunden. Für die dauerhafte Aufbewahrung wurde das Aliquot einer Bakteriensuspension im Verhältnis 1:1 mit sterilem 100-%igem Glycerol gemischt und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2 Kultivierung und Aseervierung von Säuger-Zellen

Alle verwendeten Zelllinien zeigten adhärentes Wachstum und wurden abhängig vom Versuchsansatz in Gewebekulturschalen mit 25, 75 und 175 cm² Fläche bei 5 % CO₂-Partialdruck und 37 °C im Inkubator kultiviert. Alle drei Tage wurde je nach Konfluenz ein Mediumwechsel vorgenommen bzw. die Zellen nach Bedarf verdünnt. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt, die Kulturschale einmal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben. Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese in Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 450 x g sedimentiert. Anschließend wurde entweder ein Teil in eine frische Kulturschale ausgesät oder die komplette Kultur expandiert.

Die Aservierung der Säuger-Zellen erfolgte bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dazu müssen die Zellen in ein geeignetes Medium, das die beim Kristallisieren des Wassers auftretenden Scherkräfte möglichst gering hält, überführt werden. Die Zellen wurden dazu in FKS, das 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid enthielt, resuspendiert, in ein Kryopräservationsgefäß abgefüllt und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Durch diese Prozedur wird ein langsames Abkühlen von ca. $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ gewährleistet. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in einen Stickstofftank überführt.

2.2.1.3 Proliferationsanalyse

Die Bestimmung von Verdopplungszeiten sowie der Zellvitalität wurde mit Hilfe des Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche) durchgeführt. Die Teilungsrate wird dabei anhand des Umsatzes des Tetrazoliumsalzes XTT (Natrium-3`-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro)-benzen-schwefelsäurehydrat) zu wasserlöslichem Formazan bestimmt. Diese Reaktion wird durch mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen unter NADH-Verbrauch katalysiert und ist proportional zur Zellzahl. Das gebildete Formazan kann spektralphotometrisch quantifiziert werden.

Für die Proliferationsanalyse wurden $2,5 \times 10^3$ Zellen der jeweiligen Zelllinie/Loch in vier 96-Lochplatten in Triplikaten ausgesät. An den darauffolgenden 4 Tagen wurden jeweils $50\text{ }\mu\text{l}$ Arbeitsreagenz ($50\text{ }\mu\text{l}$ XTT + $1\text{ }\mu\text{l}$ PMS (N-methyl-dibenzopyrazinmethylsulfat)) zu den Zellen hinzugefügt. Die Stoffwechselaktivität wurde anhand der gebildeten Formazanmenge nach vierstündiger Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei einer Wellenlänge von 490 nm in einem Plattenlesegerät bestimmt. Die Verdopplungszeiten (t_d) wurden während der exponentiellen Wachstumsphase nach folgender Formel errechnet:

$$t_d = \ln 2 / (\Delta E / \Delta t).$$

2.2.1.4 Analyse des verankerungsunabhängigen Wachstums

Die durch K-RAS-vermittelte Transformation der Parentalzelllinie wurde u. a. anhand der Fähigkeit, auf Softagar proliferieren zu können, untersucht. Dazu wurden 2×10^4 Zellen pro 60 mm-Petrischale in Medium, supplementiert mit 0,3 % (w/v) Agar und 20 % FKS, resuspendiert und auf eine 0,5 % (w/v) Agarbasisschicht ausgesät. Nach vier Wochen Inkubation in einem feuchten Inkubator bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 -

Partialdruck wurden die entstandenen Kolonien durch Färbung mit 500 µl Iod-nitrotetrazoliumchlorid (5 mg/ml in ddH₂O (Fluchs, Buchs, Schweiz)) angefärbt und mit einem Bildabtaster visualisiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Bakterienzellen, die freie DNS aufnehmen können, werden als kompetent bezeichnet. Natürliche Kompetenz ist bei einigen Prokaryonten, z. B. bei *Streptococcus*, *Haemophilus* und *Neisseria*, vorhanden (Brock, T. D. *et al.*, 1994). Bakterien, die normalerweise keine Kompetenz besitzen, können durch verschiedene Methoden kompetent gemacht werden. Am verbreitetsten ist die von Hanahan entwickelte CaCl₂-Methode (Hanahan, D., 1983).

Dafür wurden 3 ml LB-Medium, versetzt mit 10 mM MgSO₄, mit 10 µl Glycerolkultur des zu transformierenden Stammes beimpft und für 12-16 Stunden bei 37 °C auf einem Schüttler bei 250 Upm inkubiert. 500 µl dieser Kultur wurden mit 50 ml LB-Medium, supplementiert mit 10 mM MgSO₄, inokuliert und unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,3-0,5 bebrütet. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4000 Upm, Rotor 19776 Sigma K, 30 Minuten, 4 °C) und in 14 ml Transferpuffer I resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und das Pellet anschließend vorsichtig in 2 ml Transferpuffer II resuspendiert.

Die Bakterien wurden zu je 100 µl in Reaktionsgefäße aliquotiert und nach Schockfrost in flüssigem Stickstoff bei -80 °C aufbewahrt.

Transferpuffer I

1 M K-(CH ₃ COO)	3 ml
1 M KCl	10 ml
1 M CaCl ₂	1 ml
Glycerol	12 ml
ddH ₂ O	ad 80 ml
pH auf 6,1 einstellen	
+ 1 M MnCl ₂	5 ml
ddH ₂ O	ad 100 ml

Transferpuffer II

0,2 M MOPS	1,0 ml
1 M KCl	0,2 ml
1 M CaCl ₂	1,5 ml
Glycerol	2,4 ml
ddH ₂ O	ad 20 ml

2.2.2.2 DNS-Transfer

2.2.2.2.1 Bakterientransformation

Die Aufnahme freier DNS durch Mikroorganismen wird als Transformation bezeichnet. In dieser Arbeit wurde zur Bakterientransformation eine modifizierte Versuchsvorschrift von Cohen (Cohen, S. N. *et al.*, 1972) verwendet.

Zu 100 µl kompetenter Zellen wurden entweder 10 ng gereinigtes Plasmid oder 10 µl eines Ligationsansatzes gegeben. Die Suspension wurde dann für eine halbe Stunde auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 2 Minuten auf 42 °C überführt und danach für 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde die Suspension für 1 Stunde bei 37 °C in einem Tischschüttelgerät bebrütet. Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte durch Ausplattieren von 100 µl Transformationsansatz auf ampicillinhaltigen LB-

Agarplatten. Die Platten wurden für 12-16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.2.2 DNS-Transfektion eukaryotischer Zellen

Die nicht-virale Einführung von DNS bzw. RNS in tierische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Es existieren unterschiedliche Transfektionsmethoden, deren Einsatz von der Transfizierbarkeit der verwendeten Zelllinie abhängt. In dieser Arbeit wurde die Lipofektion angewendet. Bei dieser Gentransfermethode wird die (Desoxy-)Nukleinsäure mit einem polykationischen Lipiddetergenz vermischt, so dass sich ein Liposomen-DNS-Komplex über Salzbrückenbindungen zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS und der positiv geladenen Kopfgruppe des Detergenz ausbildet (Felgner, P. L. *et al.*, 1987).

Zur Erleichterung der Integration des Expressionsvektors in das Genom der Parentalzelllinie wurde die Plasmid-DNS im Bereich des offenen Leserasters des Ampicillinresistenzlokus mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *SspI* linearisiert (siehe 2.2.2.7). Anschließend wurde das linearisierte Plasmid mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetatlösung und 2,5 Vol. Ethanol ausgefällt. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung in sterilem ddH₂O aufgenommen. In dieser Arbeit wurde das Lipofektionsreagenz PolyFect der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Dieses Reagenz sorgt für eine positive Nettoladung der Liposomen-DNS-Komplexe, wodurch die Wechselwirkung mit negativ geladenen Molekülen der eukaryotischen Zelloberfläche, wie z. B. Phospholipiden oder sialysierten Glykoproteinen, ermöglicht und so den Eintritt in die Zelle erleichtert wird. Außerdem erhöht es die Stabilität der Liposomen-DNS-Komplexe durch die Inhibierung lysosomaler Nukleasen.

Einen Tag vor der Transfektion wurden 8×10^5 Zellen in eine 60 mm-Petrischale ausgesät. Für die Transfektion wurden 2,5 µg linearisierte Plasmid-DNS in 150 µl serum- und antibiotikafreiem Zellkulturmedium verdünnt. Anschließend wurde die DNS-Lösung mit 0,1 Vol. PolyFect-Reagenz gemischt und die DNS für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit dem Lipofektionsreagenz komplexiert. Währenddessen wurden die Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen und 3 ml frisches Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben. Die Transfektionslösung wurde mit 1 ml serum- und antibiotikahaltigem Kulturmedium versetzt und zu den Zellen gegeben.

Zur Selektion transfizierter Zellen wurde das Zellkulturmedium 24 Stunden nach dem DNS-Transfer mit Hygromycin B (Roth) supplementiert. Dabei wurde die

Minimalkonzentration eingesetzt, die die Parentalzelllinie abtöten konnte. Dies wurde an einer parallel kultivierten NIH3T3-Kultur kontrolliert. Die mittels einer Letalitätskurve ermittelte Konzentration betrug 200 µg/ml. Die Transfektionsansätze wurden anschließend so lange unter Selektionsbedingungen inkubiert, bis alle parallel kultivierten, nicht-transfizierten Parentalzellen abgestorben waren. Danach wurden je fünf bis zehn transfizierte Zellklone isoliert und expandiert. Bei der weiteren Expansion der gewonnenen Zellklone wurde der Selektionsdruck stets aufrecht erhalten, um eine kontinuierliche Expression der jeweiligen *K-ras*-Genvarianten zu gewährleisten.

2.2.2.2.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNS

Zur spezifischen Stilllegung bzw. Verringerung der Expression eines Genproduktes stellt die Transfektion mit siRNS („small interfering RNS“) eine Alternative zur homologen Rekombination dar. Diese Methode der in *C. elegans* entdeckten posttranskriptionellen Genstilllegung beruht auf der Spaltung zellulärer mRNS nach RNS-Interferenz. Die enzymatische Zerstörung einer spezifischen mRNS wird bei dieser Methode durch die Transfektion chemisch synthetisierter, 21-25 Nukleotide großer und aus sense und anti-sense bestehender RNS-Duplices induziert. In der Zelle wandern diese doppelsträngigen RNS-Moleküle in einen Enzymkomplex, der als „RNA-induced-silencing-complex“ RISC bezeichnet wird. Dieser Molekülkomplex erkennt mit Hilfe der siRNS die komplementäre mRNS-Teilsequenz und kann die mRNS dadurch aufgrund seiner Endoribonukleaseaktivität hydrolysieren. Dadurch wird die Expression des Gens, aus der die mRNS stammt, nahezu stillgelegt. *In vivo* werden siRNS durch die Aktivität einer RNase III dem so genannten DICER-Enzym aus längeren RNS-Vorläufern hergestellt (Fire, A. *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurde das HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen verwendet. 24 Stunden vor der Transfektion wurden 8×10^4 Zellen/Loch in eine 6-Loch-Platte ausgesät. Für die Transfektion wurden 8 µl 6 µM siRNS in 100 µl serumfreiem Medium verdünnt. Die Lösung wurde mit 12 µl HiPerFect-Transfektionsreagenz versetzt, gemischt und zur Komplexbildung zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden jeweils 2,3 ml frisches Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde die Transfektionslösung zu den Zellen supplementiert. Nach 48 Stunden wurde die Transfektion wiederholt und die Zellen für weitere 48 Stunden inkubiert.

2.2.2.3 Nukleinsäureisolierungen

2.2.2.3.1 Plasmid-Mini-Präparationen

Für Plasmidaufreinigungen im kleinen Maßstab wurde eine modifizierte Methode von Birnboim und Doly (Birnboim, H. C. und Doly, J., 1979) angewandt.

5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie inokuliert und 12-15 Stunden auf dem Rotationsschüttler bei 37 °C mit 250 Upm inkubiert. Nach der Zentrifugation (3000 x g, 10 min, Raumtemperatur) wurde das Pellet in 100 µl Resuspensionspuffer mit folgender Zusammensetzung aufgenommen:

EDTA	10 mM
Tris x Cl, pH 8,0	25 mM
Glucose	50 mM
RNaseA	100 µg/ml

EDTA bildet mit bivalenten Kationen Chelatkomplexe. Aufgrund der Komplexierung der prosthetischen Magnesiumionen von Desoxyribonukleasen kann deren enzymatische Aktivität inhibiert werden.

Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Bakterienzellen durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer. Im Lysepuffer sind NaOH und Natriumdodecylsulfat (SDS) enthalten, die die Zellwände zerstören. SDS sorgt für die Freisetzung zytosolischer Bestandteile der Zelle, da es Membranproteine und Lipide der Zellmembran solubilisiert. Außerdem bewirkt NaOH eine Denaturierung doppelsträngiger DNS.

Lysepuffer

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Die Zugabe von 100 µl Neutralisierungspuffer (3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2)) führt zur Präzipitation chromosomaler DNS und denaturierter Proteine, da die Salzionen das Hydratwasser der DNS entziehen. Plasmid-DNS präzipitiert bei diesen osmotischen Verhältnissen nicht. Ausgefallene Proteine wurden nach Zentrifugation (10000 x g) entfernt und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNS mit 2,5 Vol.

Ethanol gefällt. Nach Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol wurde das Plasmid 2 min bei 65 °C getrocknet und in einem definierten Volumen ddH₂O aufgenommen.

2.2.2.3.2 Plasmid-Midi-Präparationen

Um größere Mengen reiner DNS zu gewinnen, wurde das Plasmidisolierungssystem der Firma Qiagen (Plasmid-MIDI-Kit), das mit Anionenaustauschersäulen arbeitet, benutzt. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Nach alkalischer Lyse wird die Plasmid-DNS unter geeigneten Salz- und pH-Bedingungen an das Anionenaustauscherharz gebunden. RNA, Proteine und andere Verunreinigungen werden bei mittleren Salzkonzentrationen von der Säule gelöst.

25 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 0,1 % Inokulum einer frischen Vorkultur angeimpft und für 12-16 Stunden bei 37 °C bei 250 Upm im Inkubator geschüttelt. Die Schritte bis zur Entfernung des SDS-Proteingemisches und der genomischen DNS erfolgten analog zu Abschnitt 2.2.2.3.1, wobei die Volumina der einzelnen Pufferlösungen angepasst wurden (jeweils 4 ml Resuspensions-, Lyse- und Neutralisierungspuffer). Die Plasmid-DNS-Lösung wurde auf eine zuvor äquilibrierte Anionenaustauschersäule geladen. Nach zwei Waschschritten mit den bereitgestellten Niedrigsalzpuffern wurde die Plasmid-DNS mit einem Hochsalzpuffer von der Säule eluiert, durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol präzipitiert und durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 10000 x g pelletiert. Nach Lufttrocknen des Pellets wurde die DNS in einem definierten Volumen sterilem ddH₂O aufgenommen.

2.2.2.3.3 Isolierung von RNS

Zur Gewinnung von Gesamt-RNS aus eukaryotischen Zellen wurde das RNeasy-MIDI-Komplettsystem der Firma Qiagen eingesetzt. 5×10^6 Zellen wurden in 600 µl bereitgestelltem Puffer lysiert. Durch das im Puffer enthaltene Guanidinisothiocyanat werden RNasen inaktiviert. Nach der Homogenisierung des Lysates wurde die Probe zur effizienten Bindung an eine Anionenaustauschersäule mit 1 Vol. 70 % (v/v) Ethanol vermischt, auf die Affinitätssäule gegeben und die RNS durch Zentrifugation bei 10000 x g für 15 Sekunden gebunden. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 500 µl Waschpuffer wurde die RNS mit einem definierten Volumen RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert. Das Eluat wurde zur Hydrolyse von eventuell noch vorhandener DNS mit 1 µl DNase I (10 U/µl) für eine Stunde bei 37 °C temperiert. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet.

2.2.2.4 DNS/RNS-Quantifizierung und Reinheitsbestimmung

Die Bestimmung der DNS/RNS-Konzentrationen erfolgte spektralphotometrisch durch die Absorptionsmessung bei 260 nm. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorption durch aromatische Aminosäuren) lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der DNS-Präparation zu. Der Quotient reiner DNS/RNS liegt zwischen 1,6 und 1,9. Bei Anwesenheit von Proteinverunreinigungen in der Probe liegt der Quotient unterhalb dieser Grenze. Da die optische Dichte (OD) der Nukleinsäuren bei 260 nm bekannt ist, lässt sich die jeweilige Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz durch folgende Formel errechnen:

$$C_{\text{Nukleinsäurelösung}} [\mu\text{g/ml}] = E_{260\text{nm}} \times V \times OD_{260\text{nm}}$$

$E_{260\text{nm}}$: Absorption der Nukleinsäure-Lösung bei 260 nm

V: Verdünnungsfaktor der Lösung

$OD_{260\text{nm}}$: Optische Dichte der DNS-Lösung = 50 $\mu\text{g/ml}$

$OD_{260\text{nm}}$: Optische Dichte der RNS-Lösung = 40 $\mu\text{g/ml}$

2.2.2.5 DNS-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNS-Molekülen wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Mit Hilfe dieser Methode wurden Restriktionsverdau und PCR-Reaktionen überprüft sowie Nukleinsäurekonzentrationen abgeschätzt. Agarose bildet je nach Konzentration im verwendeten Puffer ein grob- oder engmaschiges System von Poren, durch die unterschiedlich große DNS-Moleküle verschieden schnell hindurchwandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei in etwa umgekehrt proportional dem Logarithmus der Größe des DNS-Fragments. Da die Phosphorsäure-Gruppen im Rückgrat der DNS im verwendeten TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) negativ geladen vorliegen, wandern alle Fragmente zur Anode. Damit hängt die Wanderungstrecke im Wesentlichen von der Länge der DNS ab.

Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose unter Erhitzen auf einem heizbaren Magnetprüfer in 1 x TAE-Puffer aufgelöst. Die Lösung wurde auf ca. 50 °C abgekühlt und Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen benachbarten Basen der DNS und fluoresziert unter UV-Licht. Das Gel wurde in eine Flachbettgelapparatur gegossen. Durch einen

speziellen Kamm wurden Probetaschen in benötigter Anzahl und Größe ausgespart. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit 1/10-Volumen Gel-Ladepuffer versetzt und in die Auftragesaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung wurden kommerziell erhältliche DNS-Größenstandards verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 60-80 Volt durchgeführt. Die Detektion der DNS erfolgte unter UV-Licht und die Dokumentation mittels einer Polaroid-Kamera.

Gel-Ladepuffer

Bromphenolblau	2,5 mg
Xylencyanol	2,5 mg
Glycerol	300 µl
ddH ₂ O	ad 1 ml

TAE-Puffer (50 x)

Tris	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA	50 mM

2.2.2.6 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick-Gel-Extraktionssystem (Qiagen). Das zu isolierende DNS-Fragment wurde unter UV-Licht höherer Wellenlänge sichtbar gemacht und aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Agarosematrix wurde mittels einer Iodat-/Chloratlösung bei 50 °C aufgelöst. Danach wurde die DNS unter Hochsalzbedingungen an Silica-Gel-Partikel gebunden. Nach mehreren Waschschritten wurde die DNS mit ddH₂O von der Säule eluiert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.2.7 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die an bestimmte palindromische DNS-Sequenzen binden und diese spalten. Diese Enzyme dienen der Bakterienzelle als Schutz vor Infektionen mit fremder DNS, z. B. Phagen-DNS.

Es sind drei Typen von Restriktionsendonukleasen bekannt. Typ II bindet an 4-8 Basenpaare lange, palindromische Sequenzen und hydrolysiert innerhalb dieses Abschnitts pro Strang eine Phosphodiesterbindung. Erfolgt die Spaltung versetzt, entstehen zueinander komplementäre, überhängende Enden. Werden die beiden Phosphodiesterbindungen an der gleichen Stelle hydrolysiert entstehen, zwei glatte Enden.

Die Ansätze für eine Restriktion waren folgendermaßen zusammengesetzt:

DNS	X µg
10 x Restriktionspuffer	0,1 Vol.
BSA (Sigma)	0,03 %
Restriktionsendonuklease(n)/µg DNS	2-3 U

Für analytische Untersuchungen wurden Ansätze von 30 µl für 2-3 Stunden bei der jeweiligen Optimaltemperatur der Endonukleasen inkubiert. Bei präparativem Verdau (50 µl Volumen) wurden die Proben für 15-20 Stunden bei der Optimaltemperatur der Restriktionsenzyme temperiert.

Zur Aufreinigung der geschnittenen DNS wurden die Restriktionsansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und die zu untersuchenden DNS-Fragmente gemäß der in Abschnitt 2.2.4.5 beschriebenen Methode aus dem Gel extrahiert.

2.2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (Mullis, K. *et al.*, 1986) ist eine *in vitro*-Technik, mit der gezielt DNS-Abschnitte vervielfältigt werden können, die von zwei bekannten DNS-Sequenzen flankiert werden. Zur Vervielfältigung des gewünschten DNS-Abschnitts werden als Starthilfe für die DNS-Polymerase Oligonukleotide, so genannte Primer, benötigt. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNS-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNS-Matrize sind. Eine DNS-Polymerase verlängert unter den geeigneten Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) die Oligonukleotide entlang der durch Hitze denaturierten einzelsträngigen DNS. Dadurch entstehen in 5`→3`-Richtung neue DNS-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Alle DNS-Moleküle liegen am Ende der Reaktion als Doppelstränge vor. Für eine Wiederholung der

Synthese muss die doppelsträngige DNS erneut durch Hitze aufgeschmolzen werden. Nach Abkühlung der Reaktionsmischung binden erneut die Oligonukleotide und werden nach Erreichen der optimalen Synthesetemperatur der DNS-Polymerase verlängert. Dieser Zyklus kann wiederholt werden, so dass am Ende eine große Anzahl von Kopien des gewünschten DNS-Abschnittes vorliegt.

Bei quantitativen PCR-Analysen diente *Taq*-Polymerase als Amplifizierungsenzym. Falls eine spätere Klonierung des PCR-Produktes angestrebt war, wurde für die Amplifizierung ein Gemisch aus *Taq*- und *Pwo*-Polymerase benutzt. Dieses Enzymgemisch besitzt aufgrund der *Pwo*-Polymerase zusätzlich eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität und arbeitet daher mit einer geringeren Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase allein. Die für die verschiedenen PCR-Reaktionen eingesetzten Oligonukleotidprimer sind im Anhang aufgelistet.

Ein PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

DNS-Matrize	10-20 ng
Vorwärts-Primer	40 pmol
Rückwärts-Primer	40 pmol
dNTP-Lösung	0,2 mM
10 x Inkubationspuffer	0,1 Vol.
<i>Taq/Pwo</i> -Polymerase	1,75 Units
ddH ₂ O	ad 50 µl

Parallel zu den Reaktionsansätzen wurde immer eine Negativkontrolle mitgeführt, die anstatt der DNS-Matrize ddH₂O enthielt, um die Reagenzien auf eventuelle Kontaminationen zu prüfen.

Ein in dieser Arbeit verwendetes PCR-Protokoll ist im Folgenden exemplarisch dargestellt:

- i) 95 °C für 3 min initiale DNS-Denaturierung
- ii) 95 °C für 1 min DNS-Denaturierung
- iii) 60 °C für 1 min Oligonukleotidanlagerung
- iv) 68 °C für 1 min DNS-Synthese
- 30 - 40 Zyklen von Schritt ii) bis iv)
- v) 68 °C für 5 min finale Elongation
- vi) 4 °C ∞ Lagerung

Die Vervielfältigung der Matrize wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft und das Amplifikat, wie in Abschnitt 2.2.4.5 beschrieben, aufgereinigt.

2.2.2.8.1 Ortsspezifische Mutagenese-PCR

Diese Technik bietet gegenüber anderen Mutagenesetechniken den Vorteil, dass mit doppelsträngiger (Plasmid)-DNS gearbeitet werden kann und umständliche Subklonierungen in M13-Bakteriophagen vermieden werden können. Für die Mutagenese-PCR werden 25-45 Basen große komplementäre Oligonukleotide so konstruiert, dass sich die gewünschte Mutation in deren Mitte befindet. Dann wird das komplette Plasmid amplifiziert, wodurch es zur Einführung der Mutation in die PCR-Produkte kommt. Anschließend wird der Reaktionsansatz mit DpnI verdaut. Diese Restriktionsendonuklease hat die Zielsequenz 5'-GATC-3', bei der das Guanin methyliert vorliegen muss. Damit wird selektiv die parentale, methylierte Plasmid-DNS verdaut, vorausgesetzt, dass kein dam- *E. coli*-Stamm verwendet wird. Nach Transformation in kompetente *E. coli*-Stämme werden die PCR-Stränge ligiert, vervielfältigt und das Plasmidkonstrukt mit der eingeführten Mutation kann nachfolgend isoliert werden.

Zum Einsatz kam die Pfu-Turbo®-Polymerase (Stratagene), da diese eine geringe Fehlerrate besitzt und die mutierten Oligonukleotide bei der Amplifikation nicht entfernt. Die PCR wurde nach dem in 2.2.2.8 beschriebenen Programm durchgeführt, wobei die Amplifikationsdauer an die Größe der Plasmid-DNS-Matrize angepasst wurde (1 min/kBp Plasmid).

2.2.2.8.2 Kolonie-PCR

Eine Methode zur Identifizierung positiv transformierter Klone stellt die Kolonie-PCR dar. Bei dieser PCR-Variante wird ein Ansatz der unter 2.2.2.8 angegebenen Zusammensetzung ohne DNS-Matrize hergestellt. Mit einem sterilen Zahnstocher wird ein Teil der Bakterienkolonie in das jeweilige Reaktionsgefäß gegeben. Danach wird das PCR-Programm gestartet. Durch die Detergenzien im Inkubationspuffer und die hohen Denaturierungstemperaturen werden Zellwände und Membranen zerstört und so der zytosolische Inhalt der Bakterienzelle freigesetzt. Die Oligonukleotidprimer im Ansatz sind so konzipiert, dass sie die gewünschte Ziel-DNS erkennen. Es kommt bei positiven Klonen zu einer Amplifikation der jeweiligen Sequenz, die mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann.

2.2.2.8.3 Genomische PCR

Zur Überprüfung des stabilen Einbaus von transfizierter DNS werden 2×10^4 Zellen eines Klons in 20 μl ddH₂O aufgenommen und 10 Minuten bei 95 °C lysiert. Dann wurden zur Degradation zellulärer Proteine 5 μl Proteinase K (2 mg/ml) hinzugefügt und 1 Stunde bei 55 °C inkubiert. Nach zehnminütiger Inaktivierung des Enzyms bei 95 °C wurde der Reaktionsansatz mit 25 μl PCR-Mix komplettiert und das PCR-Programm gestartet. Die amplifizierte Sequenz wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen, aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert.

2.2.2.8.4 Echtzeit-quantitative Reverse Transkriptions-PCR (qRT-PCR)

Für die Quantifizierung der mRNA-Transkriptmenge stellt die qRT-PCR die Methode der Wahl dar. Die Bestimmung der gebildeten Amplifikatmenge erfolgt im Gegensatz zu kompetitiven PCR-Quantifizierungstechniken nach jedem Zyklus des Programms. Die qRT-PCR bietet sowohl die Möglichkeit der absoluten Quantifizierung der Transkripte mit Hilfe von Kalibriergeraden als auch die der relativen Quantifizierung, bei der die Expression des/der Zielgene auf die Expression von einem oder mehreren Haushaltsgenen, die homogen exprimiert werden, normalisiert wird. Der Vorteil der Normalisierung liegt in der Reduktion der Varianz der Versuchsergebnisse, da z. B. unterschiedliche RNS-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der Reversen Transkription (RT) innerhalb einer experimentellen Probe Ziel- und Haushaltsgen gleichermaßen betreffen. Als Maß für die Quantifizierung wird der Schwellenwertzyklus herangezogen. Er entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen, die benötigt werden, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erzielen. An

diesem Punkt befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNS. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes wurde bei der relativen Quantifizierung nach der delta Cp-Methode (ΔC_p) durchgeführt, wobei die Effizienzunterschiede in den einzelnen Reaktionsgefäßen berücksichtigt werden. Diese Berechnungsmethode setzt eine optimale PCR-Effizienz voraus, bei der die DNS-Produktmenge und damit das Fluoreszenzsignal in jedem Zyklus verdoppelt würde. Allerdings bewegt sich die korrekte Effizienz in einer Schwankungsbreite zwischen 1,7 und 2,0. Die Berechnung des relativen Expressionsunterschiedes ergibt sich daher nach folgender Formel:

$$\text{Ratio} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_p}$$
$$\Delta C_p = C_p (\text{Kontrolle}) - C_p (\text{Probe})$$

Die komparativen Genexpressionsanalysen wurden mit dem Rotor Gene 2000-Gerät im komparativen Modus der Analysesoftware ausgewertet. Für die qRT-PCR wurde das QuantiTect SYBR Green-System (Qiagen) verwendet. Dazu wurden für einen PCR-Ansatz 10 μl SybrGreen-Reagenz, 1 μl cDNS (siehe 2.2.2.9), 8 μl ddH₂O und jeweils 0,5 μl der beiden Oligonukleotide (100 pmol/ μl) nach Herstellerangaben eingesetzt. Das PCR-Programm bestand aus 40 Amplifikationszyklen, die sich aus Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden, Oligonukleotidanlagerung bei 60 °C für 30 Sekunden und dem Elongationsschritt bei 72 °C für 30 Sekunden zusammensetzten. Die Spezifität der PCR wurde durch eine Schmelzkurve der Amplifikate überprüft.

2.2.2.9 Reverse Transkription oder Erststrang-cDNS-Synthese

Die cDNS-Erststrangsynthese aus Gesamt-RNS wurde mit Hilfe des RevertAid™ Minus-Erststrangsystems der Firma MBI Fermentas durchgeführt. Die Erststrangsynthese wird dabei mit Hilfe von oligo-(dT)₁₈-Nukleotiden mit Hilfe der Reversen Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämie-Virus erreicht. Es wurden 500 ng Gesamt-RNS mit 500 ng Oligo-(dT)₁₈-Nukleotiden in einem Endvolumen von 12 μl für 5 Minuten bei 70 °C zur Denaturierung von RNS-Sekundärstrukturen temperiert. Der Ansatz wurde auf Eis gestellt und mit 8 μl Reaktionsmix versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37 °C wurde der Reaktionsansatz für 60 Minuten auf 42 °C temperiert. Danach wurde die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf

70 °C gestoppt. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

5 x Reaktionspuffer	4 µl
Ribonukleaseinhibitor (20 U)	1 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Reverse Transkriptase (200 U)	1 µl

2.2.2.10 Ligation

Die kovalente Verknüpfung von DNS-Molekülen bezeichnet man als Ligation. Diese Reaktion wird von Ligasen, z. B. T4-DNS-Ligase, katalysiert. Die Reaktionsansätze waren so zusammengesetzt, dass die zu ligierende DNS in einem molaren Überschuss von mindestens 5 : 1 zur Vektor-DNS vorlag. Fragment- und Vektor-DNS waren durch Restriktionsenzyme so verdaut, dass kompatible Enden vorhanden waren.

Die Ligationsansätze waren folgendermaßen zusammengesetzt:

geschnittene PCR-DNS	X µl
geschnittene Vektor-DNS	Y µl
ATP (10 mM)	1,5 µl
Ligase-Puffer (10 x)	1,5 µl
T4-DNS-Ligase (7 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 15 µl

Die Ligationsansätze wurden auf Eis mindestens 20 Stunden inkubiert. Zur Steigerung der Transformationseffizienz wurde die Ligase vor der Transformation für 15 Minuten bei 70 °C hitzeinaktiviert.

2.2.2.11 Klonierungen mit Hilfe von Topoisomerase II

Da Restriktionsenzyme für ihre katalytische Aktivität einen Nukleotid-Überhang benötigen, wurde für die Klonierung der *K-ras*-kodierenden DNS (mit Ausnahme für das mutierte Kodon 61) ein von der Firma Invitrogen hergestelltes Komplettsystem

eingesetzt. Der TOPO TA Cloning Kit beinhaltet den durch Topoisomerase II aktivierten, linearisierten Vektor pCR2.1-TOPO mit einem einzelnen 3'-Thymidin-Überhang (Shuman, S., 1994). Mit diesem Plasmid können PCR-Produkte kloniert werden, die mit *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden, da solche Amplifikate einen einzelnen 3'-Desoxyadenosin-Überhang besitzen. Es wurden dazu 4 µl des PCR-Ansatzes mit 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl/0,06 M MgCl₂) sowie 1 µl TOPO-Vektor gemischt. Der Ligationsansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in kompetente *E. coli* TOP 10-Zellen transformiert. Da die PCR-Produkte bidirektional in den Vektor einkloniert werden können, musste nach Ligation und Transformation noch die korrekte Insertion des Fragments überprüft werden.

2.2.2.12 Sequenzierung

Die Integrität der klonierten cDNS-Sequenzen wurde über Sequenzierung nach der Methode von Sanger überprüft. Die Sequenzierungsoligonukleotide wurden so gewählt, dass vom Vektor ausgehend in die cDNS-Sequenz amplifiziert wurde. Die Sequenzierungen wurden von der Fima GENTERprise (Mainz) mit Hilfe des Thermosequenzase-Komplettsystems (Amersham Pharmacia) durchgeführt.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Proteinextraktion aus murinen Fibroblasten

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von mutiertem bzw. Wildtyp-überexprimiertem *K-ras* auf das Gesamtexpressionsprofil von murinen Fibroblasten miteinander verglichen werden. Dazu wurden Gesamtzelllysate der Parentalzelllinie, Vektorkontrollzelllinie und den *K-ras*-Transfektanten hergestellt.

2.2.3.1.1 Proteinextraktion für 1D-SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)

Für die 1D-Separation der Gesamtzelllysate nach dem Molekulargewicht wurden ca. 1×10^7 Zellen nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS mit einem Zellschaber von der Petrischale abgelöst, in 1 ml 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0), supplementiert mit 1 x Protease- bzw. 1 x Phosphataseinhibitorenmix (Sigma), aufgenommen und für zwei Minuten bei 1000 x g und 4 °C sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl Tris-Puffer resuspendiert und die Zellen durch einen Ultraschallstoß von 5 Sekunden Dauer bei einer Geräteleistung (Bandelin US Sonifier) von 70 % im Eisbad lysiert.

Zur Degradierung der genomischen DNS wurde 10 U DNase zugesetzt und die Reaktion für 10 Minuten im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 4 Vol. Aceton (-20 °C) für 15 Minuten auf Eis präzipitiert und für 30 Minuten bei 10000 x g und 4 °C in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 µl Laemmli-Puffer solubilisiert und für 5 Minuten bei 95 °C gekocht.

Laemmli-Puffer (2 x)

Tris x Cl pH 6,8	125 mM
Glycerol	20 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
Bromphenolblau	0,004 % (w/v)

vor SDS-PAGE

β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
-------------------	-----------

2.2.3.1.2 Proteinextraktion für 2-DE im pH-Bereich von 4-7

Für die Analyse der Proteine mit saurem bis neutralem isoelektrischem Punkt (pI) wurden 5×10^8 Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 % expandiert. Die Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit je 10 ml PBS durch einen Zellschaber von den Petrischalen gelöst und in 40-50 ml Phosphatpuffer aufgenommen. Danach wurde die Suspension bei 4 °C und 300 x g abzentrifugiert und mit 40 ml PBS gewaschen. Die Herstellung des Zelllysats erfolgte durch Resuspension der Zellen in 400 µl Solubilisierungspuffer mittels Ultraschallbehandlung. Es wurden 5 Stöße mit jeweils 5 Sekunden Dauer bei einer Geräteleistung von 70 % auf Eis durchgeführt. Zwischen den Stößen wurden ca. einminütige Pausen eingelegt, um eine schädigende Erwärmung der Proben zu vermeiden. Nach der Zellyse wurden Zelltrümmer und Nukleinsäuren durch Zentrifugation für 90 Minuten bei 15 °C mit 10000 x g von den solubilierten Proteinen getrennt. Der Überstand wurde in ein 15-ml-Röhrchen überführt, mit 4 Vol. Aceton (-20 °C) versetzt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch diesen Schritt sollten Nukleinsäuren und Lipide entfernt werden, da sie mit der isoelektrischen Fokussierung (IEF) interferieren. Das ausgefällte Proteinpellet wurde für 20 Minuten bei 10000 x g und 4 °C abzentrifugiert und nochmals mit 4 Vol. 80 %

(v/v) Aceton (-20 °C) gewaschen. Das Proteinpellet wurde in 500 µl Solubilisierungspuffer nach Rabilloud (Rabilloud, T. *et al.*, 1997) gelöst.

Solubilisierungspuffer

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
CHAPS	4 % (w/v)
DTT	1 % (w/v)
Ampholyte pH 3-10	0,5 % (v/v)

2.2.3.1.3 Proteinextraktion für 2-DE im pH-Bereich von 6-11

Zur Anreicherung der alkalischen Proteine wurde eine Versuchsvorschrift von Görg und Mitarbeitern (Görg, A. *et al.*, 1998), welche sich für die Anreicherung von Proteinen mit basischem pI eignet, modifiziert. 3×10^7 Zellen wurden in 200 µl Extraktionspuffer (10 % (v/v) Trichloressigsäure / 20 mM DTT in Aceton) resuspendiert und mit 5 Ultraschallstößen von jeweils 5 Sekunden Dauer (Leistung 70 %) auf Eis lysiert. Die Proteine wurden nach Zugabe von 1200 µl Extraktionspuffer für 16 Stunden bei -20 °C präzipitiert. Die Proben wurden bei 10000 x g und 4 °C 30 Minuten in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben analog dem Lyseschritt zweimal mit einer Aceton/ 20 mM DTT-Lösung gewaschen. Nach Lufttrocknung wurde das Proteinpräzipitat in 500 µl Solubilisierungspuffer gelöst.

2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmungen

2.2.3.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Biuretmethode

Die Proteinkonzentration für 1D-SDS-PAGE-Gele wurde mit Hilfe der Biuretreaktion bestimmt. Bei dieser Methode wird die Reduktion von Cu^{++} im alkalischen Milieu durch Peptidbindungen ausgenutzt. Nach der Reduktion von Cu^{++} zu Cu^+ wurden die einwertigen Kupferionen durch zwei Bicinchoninsäuremoleküle (BCA) komplexiert, wobei ein blauer bis violetter Komplex gebildet wird. Durch die Absorptionmessung bei 570 nm kann die Proteinkonzentration anhand einer Eichkurve bestimmt werden. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden BSA-Lösungen bekannter Konzentration

von 0,1-1,5 µg/µl in Triplikaten in eine 96-Loch-Platte pipettiert und im Verhältnis 1:20 mit Bicinchoninarbeitsreagenz (Perbio, Bonn) verdünnt. Nach 30-minütiger Komplexbildung bei 60 °C wurde die Absorption bei 570 nm bestimmt. Parallel dazu wurden die zu untersuchenden Proben in geeigneter Verdünnung sowie eine proteinfreie Referenzprobe, mit der die gemessenen Absorptionen korrigiert wurden, inkubiert.

2.2.3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Bradfordmethode

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen für die 2-DE wurde die von Bradford entwickelte Methode (Bradford, M. M., 1976) eingesetzt, da sich die Biuret-Methode aufgrund der auftretenden Interferenzen zwischen DTT bzw. Harnstoff im Solubilisierungspuffer mit dem BCA-Reagenz ausschloss. Das kommerziell verfügbare „BioRad Protein Assay“-Reagenz ist kompatibel mit den verwendeten Konzentrationen an DTT und Harnstoff. Es wurde 1:5 mit ddH₂O verdünnt und entsprechend der Biuretmethode verwendet. Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte die Absorption bei 595 nm der BSA-Referenzkonzentrationen von 0,1-0,5 µg/µl Protein sowie die der jeweiligen Proben analysiert.

2.2.3.3 Proteomanalysen mittels 2-DE

Zur globalen Darstellung des Proteinexpressionsprofils biologischer Systeme stellt die 2-DE ein geeignetes Werkzeug dar. Bei dieser Methode werden die physikochemischen Eigenschaften der Proteine zur Trennung ausgenutzt. In der ersten Dimension werden die Proteine dabei nach ihrem isoelektrischen Punkt in einem immobilisierten pH-Gradienten aufgetrennt. Anschließend folgt die Separierung der Proteine nach ihrem Stoke'schen Radius mittels SDS-PAGE. Die Kombination dieser beiden Methoden ermöglicht je nach Wahl des pH-Gradienten und PAGE-Gels die Auftrennung eines komplexen Proteingemisches in bis zu 10000 Einzelfractionen, die im Idealfall nur noch eine Proteinspezies repräsentieren. Dies ermöglicht in Kombination mit geeigneten Färbemethoden die Quantifizierung des Expressionsniveaus eines Proteins unter verschiedenen Zuständen, z. B. Tumor gegenüber Normalgewebe.

2.2.3.3.1 Isoelektrische Fokussierung

Bei der IEF wird die unterschiedliche Ladung der Proteine zur Trennung ausgenutzt. Mittels immobilisierter pH-Gradienten, die mit Hilfe von Ampholytmolekülen einen bestimmten pH-Bereich abdecken, wird ein Proteingemisch aufgrund der Eigenladung der einzelnen Proteine aufgetrennt. Im elektrischen Feld werden die Proteine an der Stelle des pH-Gradienten fokussiert, an denen ihre Nettoladung Null ist (isoelektrischer Punkt, pI). In dieser Arbeit wurden auf immobilisierte pH-Gradienten-Streifen (IPG-Streifen) der Firma Amersham Pharmacia verwendet.

2.2.3.3.1.1 Isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich von 4-7

Die Rehydrierung der IPG-Streifen erfolgte gleichzeitig mit der Probenaufnahme. Dazu wurde die entsprechende Probenmenge in 340 μ l Solubilisierungspuffer (siehe Abschnitt 2.2.3.1.2.1) in die Fokussierungseinheiten eingebracht und die Flüssigkeit gleichmäßig unter dem IPG-Streifen verteilt. Anschließend wurden die Streifen gegen Austrocknung mit 500 μ l Öl (Dry Strip Cover Fluid) bedeckt, die Fokussierungseinheiten geschlossen und das Fokussierungsprogramm gestartet. Bei der isoelektrischen Fokussierung wurde die Spannung der IPGphor-Einheit schrittweise von 30 auf 8000 V erhöht. Der Stromfluss war dabei auf 50 μ A/IPG-Streifen begrenzt und die Temperatur wurde durch ein Peltier-Element konstant auf 20 °C gehalten. Zunächst wurden die IPG-Streifen 12 Stunden rehydriert. Das Fokussierungsprotokoll setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

i)	0 V	2 Stunden
ii)	30 V	10 Stunden
iii)	500 V	1 Stunde
iv)	1000 V	1 Stunde
v)	5000 V	1 Stunde
vi)	8000 V	4 Stunden

Es wurden stets mindestens 38000 Vh angestrebt. Bei Unterschreiten des Wertes wurde bis zu dessen Erreichen nachfokussiert. Nach Ablauf des Programmes wurden die IPG-Streifen entweder sofort für die Auftrennung in der zweiten Dimension äquilibriert oder bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.3.1.2 Isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich von 6-11

Die Trennung eines Gemisches aus Proteinen mit einem $pI > pH 7$ ist problematisch, da DTT als schwache Säure in Richtung Anode wandert, wodurch es zur Protein-Aggregation kommt. Dies verhindert eine distinkte Fokussierung, was sich im 2-D-Gel durch eine stark verringerte Auflösung äußert. Daher wurden die Fokussierungsstreifen für den alkalischen pH-Bereich vor der Probenbeladung mit einem hydroxyethyl-disulfidhaltigen Puffer rehydriert und die mit Solubilisierungspuffer gelösten Proteine vor der Applizierung auf eine Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit Rehydrierungspuffer verdünnt. Dieses Reagenz bildet mit den Sulfhydrylgruppen der Cysteinyreste gemischte Disulfide aus, die nicht reoxidiert werden können. Dazu wurden die Fokussierungsstreifen über Nacht in $340 \mu\text{l}$ Rehydrierungspuffer gelegt und mit Silikonöl überschichtet. Nach vollständiger Quellung wurden die Streifen entnommen und in die Fokussierungseinheit des Ettan IPGphor II-Systems überführt. Die Probenaufnahme und -fokussierung erfolgte durch Applikation der Proteinprobe in ein Aufnahmegefäß, das an der Anode (anodische Cup-Beladung) platziert wurde. Zur Fokussierung wurde folgendes Programm verwendet:

- i) 30 V 1 Stunde
- ii) 500 V 1 Stunde
- iii) 1000 V 1 Stunde
- iv) 5000 V 1 Stunde
- v) 8000 V 2 Stunden

Nach Erreichen von 23.000 Vh wurde das Programm gestoppt und die Fokussierungsstreifen analog zu denen des sauren bis neutralen pH-Bereichs weiter prozessiert.

Rehydrierungspuffer

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
CHAPS	4 % (w/v)
Hydroxyethyl-disulfid (Amersham)	100 mM
IPG-Puffer 6-11 (Amersham)	2 % (v/v)

2.2.3.3.1.3 Äquilibrierung der IPG-Streifen

Zur Gewährleistung einer effizienten Übertragung der nach ihrem pI getrennten Proteine in die Matrix der zweiten Dimension ist es notwendig, das Puffersystem zu wechseln. Zuerst werden die Sulfhydrylgruppen der Proteine durch DTT vollständig reduziert und anschließend durch Behandlung mit Iodacetamid alkyliert, wodurch eine Reoxidation verhindert wird. Außerdem erhalten die Proteine durch SDS einen negativen Ladungsüberschuss, deren Laufverhalten im elektrischen Feld dadurch vereinheitlicht wird.

Die Äquilibrierung der IPG-Streifen wurde in Plexiglasröhrchen durch Inkubation auf einem Taumelschüttler mit Äquilibrierungslösung 1 bzw. 2 bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurden 15 ml Äquilibrierungslösung 1 in die mit den Fokussierungsstreifen beschickten Röhrchen eingebracht und 15 Minuten geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung entfernt, durch Äquilibrierungslösung 2 ersetzt und erneut für 15 Minuten geschüttelt.

Äquilibrierungspuffer 1

Tris x Cl pH 8,8	50 mM
Glycerol	30 % (v/v)
Harnstoff	6 M
SDS	2 % (w/v)
DTT	1,5 % (w/v)

Äquilibrierungspuffer 2

Tris x Cl pH 8,8	50 mM
Glycerol	30 % (v/v)
Harnstoff	6 M
SDS	2 % (w/v)
Iodacetamid	4,8 % (w/v)

2.2.3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine in den Zelllysaten erfolgte mittels SDS-PAGE. Bei dieser von Laemmli entwickelten Methode (Laemmli, U. K., 1970) werden Proteine aufgrund ihres Stoke'schen Radius bzw. ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld voneinander getrennt. Der Einfluss der Ladung wird durch SDS aufgehoben, da es sich an die hydrophoben Seitenketten von Proteinen anlagert und für einen stark negativen Ladungsüberschuss sorgt. Die SDS-Protein-Komplexe wandern aufgrund ihrer Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Zur Auftrennung wird ein chemisch inertes Acrylamid-Bisacrylamidgel verwendet. Acrylamid bildet mit Bisacrylamid eine quervernetzte Struktur mit Poren aus. In dieser Arbeit wurde als Quervernetzer Piperazindiacrylamid eingesetzt, da dieses Reagens eine geringere Interferenz mit

bestimmten Färbemethoden zeigt. Die Größe der Poren ist über die Konzentration an Acrylamid bzw. Bisacrylamid variierbar. Die Polymerisation zwischen diesen Molekülen folgt dem Mechanismus einer radikalischen Substitutionsreaktion, bei der Ammoniumperoxodisulfat (APS) die Startradikale liefert. N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) dient bei der Reaktion als Katalysator, da es im wässrigen Medium in freie Radikale zerfällt.

2.2.3.3.2.1 SDS-PAGE für 2-DE

Die Gele wurden parallel in einem "Hofer DALT multiple Gel Caster" (Amersham) hergestellt. Es wurden Gelkassetten mit den Abmessungen 20 cm x 22 cm x 0,15 cm verwendet. Nach dem Einbringen der Gelmatrix (Tabelle 2.3) wurde durch das Überschichten mit 2-3 ml Tris-gesättigtem n-Butanol (375 mM Tris x Cl pH 8,8) eine glatte Geloberfläche erzeugt. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Butanolösung entfernt und die Gele mit den äquilibrierten Fokussierungsstreifen beschickt. Zur mechanischen Fixierung der Streifen wurde eine 1-%ige (w/v) Agaroselösung (LMP-Agarose [Gibco BRL] in SDS-Laufpuffer / 0,0004 % Bromphenolblau) in das ausgesparte Volumen der jeweiligen Gelkassette gegossen und der IPG-Streifen auf die Geloberfläche aufgebracht. Nach dem Erstarren der Agarose erfolgte die Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Dazu wurde eine Spannung von 50 V angelegt und die Leistung/Gel bis zum Einwandern der Proteine in die Trennmatrix auf maximal 2,5 W begrenzt. Danach wurde der Gellauf bei 100-130 V fortgesetzt, bis 1800 Vh erreicht waren.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Gelmatrix für die 2D-SDS-PAGE.

Komponente	13 %T / 2,5 %C
Acrylamid/Piperazindiacrylamid (39:1)	520 ml
1M Tris x Cl, pH 8.8	600 ml
Glycerol	64 ml
1M Na ₂ S ₂ O ₃	8 ml
ddH ₂ O	392 ml
10 % (w/v) APS	16 ml
TEMED	0,8 ml

Angaben für 12 Gele. T = Gesamtacrylamidkonzentration, C = Vernetzerkonzentration

2.2.3.3.2.2 SDS-PAGE für zielgerichtete Expressionsanalysen

Für zielgerichtete Expressionsanalysen mittels Immunfärbung wurde die SDS-PAGE nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, U. K., 1970). Es wurden Gelkassetten mit den Abmessungen 8 cm x 8 cm x 0,15 cm verwendet. Die aufgetragenen Proben wurden in einem 5-%igen Sammelgel mit einer begrenzten Stromstärke von 10 mA fokussiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10- bzw. 12-%igen Trenngel bei 30 mA, bis die Bromphenolblaufront das Gel durchlaufen hatte. In der folgenden Tabelle 2.4 sind die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel aufgelistet:

Tabelle 2.4: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel der SDS-PAGE.

Komponente	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)
4 x Puffer	2500 µl	3750 µl	3750 µl
30 % Acrylamidmix	1600 µl	5000 µl	6000 µl
10 % (w/v) APS	50 µl	75 µl	75 µl
TEMED	5 µl	7,5 µl	7,5 µl
ddH ₂ O	5800 µl	6170 µl	5170 µl

Angaben für 3 kleine Gele.

Puffer für das Trenngel (4 x)

Tris x Cl pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

Puffer für das Sammelgel (4 x)

Tris x Cl pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

Laufpuffer

Tris	15,1 g
Glycin	94,0 g
SDS	0,1 % (w/v)
ddH ₂ O	ad 5000 ml

Laemmli-Puffer (2 x)

Tris x Cl pH 6,8	125 mM
Glycerol	20 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	10 % (v/v)
Bromphenolblau	0,004 %

2.2.3.4 Gelfärbemethoden

2.2.3.4.1 Silberfärbung

Zur Visualisierung des Proteinexpressionsprofils im alkalischen Bereich wurde die Silberfärbung verwendet. Der Nachteil der Silberfärbung besteht in ihrem geringen dynamischen Bereich über den eine Quantifizierung möglich ist. Dies ist begründet in der Abhängigkeit der Färbeintensität von der Aminosäuresequenz des Proteins. Aufgrund der hohen Sensitivität konnte nicht auf diese Färbemöglichkeit verzichtet werden, da ein Kompromiss zwischen guter Auflösung über den basischen pH-Gradienten und der maximal aufzutragenden Proteinmenge geschlossen werden musste. Neben der geringen Quantifizierbarkeit stellt die schlechte Kompatibilität der Silberfärbung mit massenspektrometrischen Methoden ein weiteres Problem dar (Gevaert, K. und Vandekerckhove, J., 2000). Daher wurde hier eine von Shevchenko entwickelte Variante herangezogen, die eine spätere massenspektrometrische Proteinidentifizierung erlaubt (Shevchenko, A. *et al.*, 1996).

Die 2D-Gele wurden zunächst für mindestens 1 Stunde mit Fixierlösung behandelt (30 % (v/v) Ethanol / 10 % (v/v) Essigsäure). Anschließend folgten zwei 20-minütige Waschschrte in 30-%iger Ethanolllösung und einmaliges Waschen in ddH₂O für 20 Minuten. Danach wurden die Proben für 15 Minuten in 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfatlösung sensitiviert. Nach dreimaligem Waschen in ddH₂O für jeweils 20 Sekunden erfolgte die Färbung mit Silbernitratllösung (0,2 % (w/v) AgNO₃ / 0,74 % (v/v) Formaldehyd) bei 4 °C im Dunkeln. Die Färbelösung wurde analog der Sensitivierungslösung entfernt und die Proteinspots durch Zugabe von Entwicklungslösung (3 % (w/v) Na₂CO₃ / 1,85 % (v/v) Formaldehyd) visualisiert. Nach 7 Minuten wurde die Entwicklungslösung entfernt und einmal für 20 Sekunden mit ddH₂O gewaschen. Die Reaktion wurde durch 15 minütige Inkubation mit 5 %

(v/v) Essigsäure gestoppt. Nach dreimaligem Waschen für je 10 Minuten mit ddH₂O erfolgte die Dokumentation und Analyse der Gele.

2.2.3.4.2 Kolloidale Coomassiefärbung

Die Sensitivität der kolloidalen Coomassiefärbung ist gegenüber der Silber- bzw. (RuBPS)-Färbung etwa um den Faktor 10 verringert. Sie wurde in dieser Arbeit zur Visualisierung von präparativen Gelen eingesetzt. Das Prinzip dieser Färbemethode besteht darin, dass das Coomassie-Molekül sich nicht-kovalent an hydrophobe Proteinanteile anlagert. In dieser Arbeit wurde das Protokoll von Neuhoff und Mitarbeitern (Neuhoff, V. *et al.*, 1988) eingesetzt.

Stammlösung 1

(NH ₄) ₂ SO ₄	10 % (w/v)
H ₃ PO ₄	2 % (v/v)

Stammlösung 2

Coomassie Brillant Blue G-250	5 % (w/v)
----------------------------------	-----------

Die beiden Lösungen wurden für 4 Stunden im Volumenverhältnis 98 : 2 von Lösung 1 zu 2 geschüttelt. Anschließend wurde Methanol bis zu einer Endkonzentration von 20 Vol-% hinzugefügt und nochmals für eine halbe Stunde gerührt. Die Färbung der 2D-Gele erfolgte über Nacht auf einem Taumelschüttler. Anschließend wurde solange mit ddH₂O gewaschen, bis sich der Färbehintergrund nicht weiter reduzieren ließ. Dabei wurde die Waschlösung mehrmals gewechselt.

2.2.3.4.3 Ruthenium II bathophenanthroline disulfonat chelat (RuBPS)-Färbung

Die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff RuBPS besitzt gegenüber Silber- und Coomassiefärbung den Vorteil einer guten Quantifizierbarkeit. Der lineare Bereich erstreckt sich über 3-4 Größenordnungen im Gegensatz zu 2-3 Größenordnungen bei den anderen beiden Färbemethoden. Darüber hinaus besitzt die RuBPS-Färbung eine geringfügig schwächere Sensitivität wie die Silberfärbung und ist mit massenspektrometrischen Methoden kompatibel.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifiziertes Protokoll nach Rabilloud und Koautoren verwendet (Rabilloud, T. *et al.*, 2001). Dazu wurden die Gele für mindestens eine Stunde mit Fixierlösung (30 % (v/v) Ethanol / 10 % (v/v) Essigsäure) behandelt und anschließend viermal mit 30 % (v/v) Ethanolösung gewaschen. Danach erfolgte die Färbung mit 10 mM RuBPS-Lösung für mindestens sechs Stunden. Im letzten Schritt wurden unspezifische Bindungen durch dreimaliges Waschen mit Wasser entfernt.

2.2.3.5 Geldokumentation und -auswertung

2.2.3.5.1 Dokumentation von Silber- und Coomassiegelen

Zur computergestützten Auswertung wurden 2D-Gele, in denen die Proteine durch Silber- bzw. Coomassiefärbung visualisiert wurden, mit einer Auflösung von 300 dpi im Durchlichtmodus eines Flachbettscanners (Umax 3000 Powerlook) eingescannt. Zur Auswertung wurden Bilddateien mit 256 Graustufen im tagged image file format (tiff) generiert, um die Kompatibilität mit dem Analyseprogramm Proteomweaver (BioRad, München) zu gewährleisten.

2.2.3.5.2 Dokumentation von fluoreszenzgefärbten Gelen

RuBPS-gefärbte 2D-Gele wurden mit Hilfe des Fluoreszenzscanners FLA-5100 (Fuji, Düsseldorf) visualisiert und dokumentiert. Die Fluoreszenz wurde mittels monochromatischen Lichtes der Wellenlänge 435 nm angeregt und die Emission bei 545 nm aufgenommen. Die so erzeugten Bilder wurden, wie unter Punkt 2.2.3.5.1 beschrieben, gespeichert und abgelegt.

2.2.3.5.3 Gelanalyse

Die quantitative Bildanalyse der analytischen Gele wurde mit Hilfe des Auswerteprogramms ProteomweaverTM (Versionen 3.1-4.0, BioRad, München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Intensitäten der verschiedenen Proteinspots eines jeden Gels werden bei diesem Programm durch einen Normalisierungsfaktor korrigiert, der den Median der Quotienten aller abgestimmter Proteinspots darstellt. Dieser Algorithmus ermöglicht die Begrenzung des Normalisierungsfehlers auf 1-10 %. Proteinspots wurden als differentiell exprimiert betrachtet, deren Spotintensitätsverhältnis um mindestens 50 % verändert war. Die Signifikanz des Vergleichs wurde durch den t-Test analysiert ($p < 0,05$).

Zur zusätzlichen Überprüfung diene die visuelle Inspektion des Intensitätsmusters der Kandidatenproteine in den einzelnen Zelllinien.

2.2.3.6 Proteinidentifizierung mittels Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time of Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Bei der MALDI-TOF-MS wird die zu analysierende Probe mit einer aromatischen Verbindung (Matrix) kokristallisiert. Nach der Inkorporierung des Analyten in die Matrixkristalle wird die Probe im Vakuum der Ionenquelle des Massenspektrometers einem wenige Nanosekunden-dauernden Impuls kurzwelliger Laserstrahlung ausgesetzt. Die Matrix hat ihr Absorptionsmaximum im Wellenlängenbereich des Lasers. Dadurch kommt es zum Übergang intakter Analyt- und Matrixmoleküle in die Gasphase, wo es zur Ionisation des Analyten durch Protonenübertragung von Matrixmolekülen kommt. Durch das Anlegen einer Spannung von mehreren zehntausend Volt werden die ionisierten Analytmoleküle beschleunigt, in einem Flugzeitanalysator (TOF-Time of Flight) nach ihrem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) getrennt und ihre Masse über den Vergleich mit Kalibrierungssubstanzen bestimmt (Abb. 2.3).

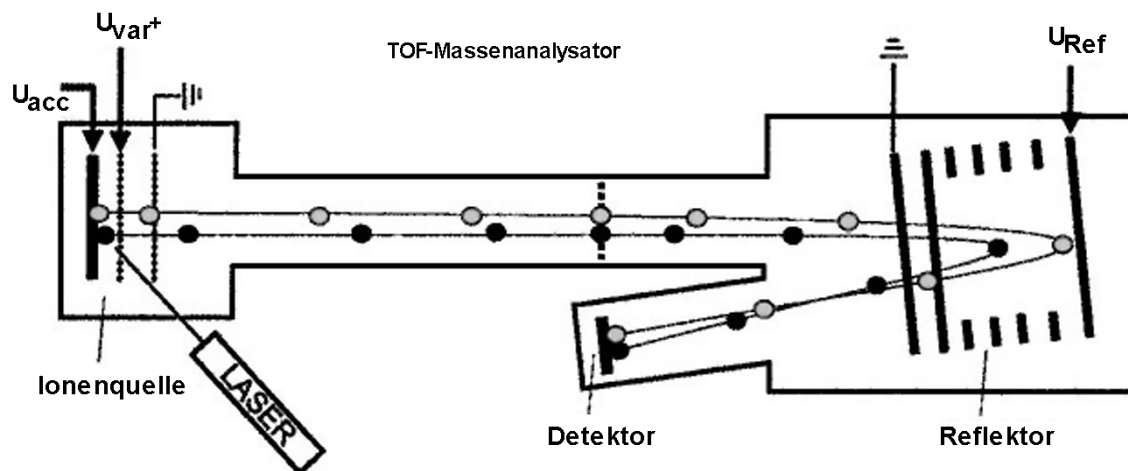


Abb. 2.3: Schematische Funktionsweise eines MALDI-TOF-Massenspektrometers.

Nach der Ionisierung der Analytmoleküle werden diese durch das Anlegen einer Beschleunigungsspannung in das Flugrohr überführt. Nach der feldfreien Strecke werden Zeit- und Beschleunigungsunschärfen mit Hilfe eines Ionenspiegels korrigiert und der m/z -Wert kann durch den Vergleich mit Kalibrierungssubstanzen ermittelt werden (verändert nach Mann, M. *et al.*, 2001).

2.2.3.6.1 In Gel-Verdau der differentiell exprimierten Proteine

Der Verdau von Proteinen aus Silbergelen wurde nach dem Protokoll von Guardehegi und Koautoren (Gharahdaghi, F. *et al.*, 1999) durchgeführt. Die Gelstücke wurden mit Hilfe des Ausschneidegerätes GelPal (Genetix, München) ausgestanzt und mit einer 1:1-Mischung einer 30 mM Kaliumferricyanid- und einer 100 mM Natriumthiosulfatlösung bis zur vollständigen Entfärbung inkubiert. Nach zwei Waschschrinen mit ddH₂O (jeweils 100 µl) wurden die Gelstücke für 20 Minuten mit 200 mM Ammoniumbicarbonatlösung inkubiert. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurden die Gelpartikel durch zweifache Behandlung mit je 100 µl Acetonitril dehydriert und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Der Verdau erfolgte durch Versetzen mit 5-10 µl Trypsin (20 ng/µl in 25 mM NH₄HCO₃-Lösung) für 16-24 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurden die tryptischen Peptide mit Hilfe von RP-Säulen (ZipTips, Millipore) nach Herstellerangaben extrahiert und auf ein Volumen von 0,5-2 µl eingengt.

Der Proteinverdau aus präparativen Coomassie-Gelen wurde analog durchgeführt. Allerdings wurden die Gelstücke vorher unter Verwendung von 50 % (v/v) Acetonitril entfärbt, mit ddH₂O gewaschen und getrocknet.

2.2.3.6.2 Massenspektrometrische Analyse

2.2.3.6.2.1 Peptidmassenfingeraabdruck (PMF)

Die massenspektrometrische Proteinidentifizierung mittels PMF beruht auf der Bestimmung der Massen einer möglichst großen Anzahl der durch die proteolytische Spaltung erzeugten Peptidfragmente. Anschließend werden die im Experiment erhaltenen Massen *in silico* mit einem virtuellen Fingerabdruck verglichen, der durch den theoretischen Verdau des aus dem offenen Genleserasters abgeleiteten Proteins generiert wurde.

Die PMF-Analysen wurden mit einer Voyager-DE™ PRO Biospectrometry-Arbeitsstation (Applied Biosystems, Foster City, USA) im Reflektormodus für die Detektion positiv geladener Ionen durchgeführt. Bei der Ionisierung wurden folgende Einstellungen verwendet: 20 kV Beschleunigungsspannung sowie eine Verzögerunsextraktion von 135 ns Dauer. 0,5-1 µl des jeweiligen tryptischen Verdau wurde im Verhältnis 1:1 mit Matrixlösung (10 mg/ml α-Cyano-4-hydroxymizsäure (Bruker, Bremen) in 50 % (v/v) Acetonitril / 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure) gemischt

und bei Raumtemperatur kokristallisiert. Die Spektren wurden zunächst extern mit den Peptiden Angiotensin I (m/z 1296,6853), Adrenocorticoidhormon clip I (m/z 2093,0867) und clip II (m/z 2465,1989) kalibriert. Nach Aufnahme des PMF wurde zusätzlich eine interne Kalibration mit Hilfe autolytischer Trypsinfragmente (m/z 842,51 und 2211,1046) durchgeführt. Die Proteine wurden mit der MASCOT-Suchmaschine (<http://www.matrixscience.com>) und der ProFound-Suchmaschine (<http://bioinformatics.genomicsolutions.com/service/prowl/profound.html>) im PMF-Modus identifiziert. Für den Vergleich der theoretischen und experimentell ermittelten monoisotopischen m/z -Werte wurde die nicht-redundante SwissProt-Datenbank gewählt. Die Suchparameter erlaubten maximal eine fehlende proteolytische Spaltung, Carbamidomethylierung oder S-Mercaptoethanol als feste Modifikation für Cysteinreste und eine Peptidtoleranz von ≤ 100 ppm für *Mus musculus*-Sequenzen.

2.2.3.6.2.2 Peptidsequenzierungen mittels MALDI-PSD

Neben der Identifizierung über PMF lassen sich Proteine weiterhin über *de novo*-Sequenzierung, z. B. über „post source decay“ (PSD) einzelner Peptide, bestimmen. Kommt es in der feldfreien Strecke des TOF-Analysators zum spontanen Zerfall (metastabile Fragmentierung) eines Peptides, können die sich mit gleicher Geschwindigkeit bewegenden Fragment-Ionen mit Hilfe eines Reflektors getrennt werden. Hierbei wird die unterschiedliche kinetische Energie von Vorläufer- und Fragment-Ionen ausgenutzt, die die beiden Ionenarten verschieden tief in das Reflektorfeld eindringen lässt und so für eine zeitliche Separierung der Detektorsignale sorgt. Durch die Auswahl eines Peptides eines proteolytischen Verdauens kann die Sequenz dieses Abschnitts der Polypeptidkette ermittelt werden. Ein einfacher Reflektor kann nur einen beschränkten Energiebereich auf den Detektor fokussieren. Daher muss die Reflektorspannung für die verschiedenen Massenbereiche sukzessiv angepasst und das PSD-Spektrum aus den gewonnenen Einzelspektren zusammengesetzt werden. Diese Möglichkeit wird v. a. dann interessant, wenn durch die Datenbankanalyse des PMF keine signifikante Zuordnung zu einem Protein getroffen werden konnte. Außerdem können durch diese Methode wichtige strukturelle Informationen über posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierung und Methylierung, gewonnen werden.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Western Blot

Der Transfer der elektrophoretisch getrennten Proteine (siehe 2.2.3.3.2.2) auf Nitrozellulosemembranen wurde in einer „Semi-Dry-Blot“-Apparatur mit $0,9 \text{ mA/cm}^2$ Membranfläche für 1,5 Stunden durchgeführt. Als Transferpuffer diente ein Glycinpuffer mit Methanol. Der Alkohol dient dazu, die Proteinbindungsstellen der Nitrozellulose (NC)-Membran zu aktivieren. Die folgenden Wasch- und Inkubationsschritte wurden auf einem Taumelschüttler bei 150 Upm und Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurden die nicht besetzten Proteinbindungsstellen der Membran durch die im Magermilchpulver enthaltenen Proteine des Blockierungspuffers besetzt. Danach wurde der Primärantikörper für zwei Stunden in einer geeigneten Verdünnung (siehe Tabelle 2.2) mit der NC-Membran inkubiert. Zur Entfernung von nicht gebundenen Antikörpern wurde die Membran fünfmal je 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit entsprechenden Sekundärantikörpern (1:1000-verdünnt in Blockierungspuffer, der 2 % (w/v) Milchpulver enthielt; siehe Tabelle 2.2) zugegeben und für 1 Stunde auf dem Schüttler geschwenkt.

Die nichtgebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS)T-Puffer entfernt. Da Tween 20 die enzymatische Aktivität der Meerrettichperoxidase inhibiert, wurde 5 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz. Die so genannte ECL-Reaktion (Enhanced ChemoLuminescence) basiert auf der Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol. Das von Amersham Pharmacia bereitgestellte System arbeitet mit einem Acridinsubstrat, das in Gegenwart von Meerrettichperoxidase und Wasserstoffperoxid zu einem Acridiniumester oxidiert wird. Dieses Intermediat reagiert mit Wasserstoffperoxid unter alkalischen Bedingungen zu einer chemolumineszenten Verbindung, die ihr Emissionsmaximum bei 430 nm hat. Durch Auflegen eines Röntgenfilms kann diese Strahlung sichtbar gemacht werden. Es wurde nach Herstellerangaben detektiert.

Transferpuffer

Glycin	150 mM
Tris x Cl pH 8,8	20 mM
Methanol	20 % (v/v)

TBS

NaCl	150 mM
Tris x Cl pH 8,0	10 mM

TBST

NaCl	150 mM
Tris x Cl pH 8,8	10 mM
Tween 20	0,05 %

Blockierungspuffer

NaCl	150 mM
Tris x Cl pH 8,8	10 mM
Tween 20	0,05 %
Milchpulver	5 % (w/v)

2.2.4.2 Durchflusszytometrische Analysen

Für die Analyse von Oberflächenmolekülen stellt die Durchflusszytometrie die Methode der Wahl dar. Dazu werden die Zellen mit einem gegen das Oberflächenmolekül gerichteten, spezifischen Antikörper immungefärbt. Dabei ist dieser entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder wird in einem zweiten Schritt durch einen zweiten Antikörper, der die schwere Kette des ersten Antikörpers erkennt, fluoreszenzmarkiert. Die Zellen werden durch Vakuum in ein Durchflusszytometer eingesaugt und die Zellen durch die Beschleunigung mit einer Trägerflüssigkeit vereinzelt. Neben Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht werden die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen mit Hilfe der Anregung eines Argon-Ionen-Lasers gemessen. Das Vorwärtsstreulicht stellt dabei ein Maß für die Zellgröße dar, während das Seitwärtsstreulicht die Zellgranularität bestimmt. Dies ermöglicht die Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen. Die spezifische Fluoreszenz-

intensität wird als Maß für die relative Expressionsstärke des markierten Oberflächenmoleküls herangezogen.

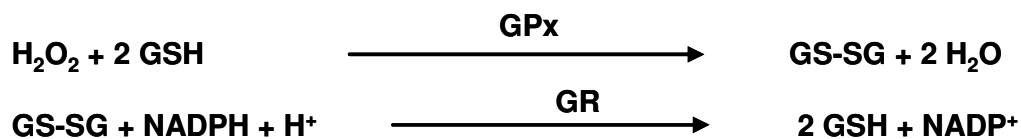
Für die Durchführung wurden 5×10^5 Zellen eingesetzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde zur Suspension $5 \mu\text{l}$ des Primärantikörpers H2-L^d bzw. IgG2A-Isotypenkontrolle hinzugegeben und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch zweifaches Waschen mit PBS wurden überschüssige Antikörper entfernt. Nach Zugabe von $3 \mu\text{l}$ fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (IgG-FITC) wurde für 30 Minuten im Dunkeln bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach zwei weiteren Waschstufen wurden die Zellen in einem definierten Volumen PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.5 Biochemische Arbeitsmethoden

2.2.5.1 Bestimmung des Glutathiongehaltes

Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist aus den Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutaminsäure aufgebaut. Dabei liegt zwischen dem Glutamat- und dem Cysteinrest eine Isopeptidbindung vor.

Reduziertes Glutathion ist ein Hauptantioxidanz in eukaryotischen Zellen und stellt der Glutathionperoxidase (GPx) Reduktionsäquivalente für den Abbau von ROS zur Verfügung. Nach Oxidation kann es durch die Glutathionreduktase (GR) unter Verbrauch eines β -Nikotinamid-adenin dinukleotidphosphats (NADPH) regeneriert werden.



Die Menge an intrazellulärem, reduziertem Glutathion reflektiert die Fähigkeit der Zelle, ROS zu inaktivieren.

Die Bestimmung des intrazellulären Glutathionspiegels erfolgte durch die Reduktion von Ellman's Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB), das dadurch bei 412 nm spektralphotometrisch detektierbar ist. Da es sich um eine Reaktion 1. Ordnung handelt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit nur von der Konzentration des zerfallenden Stoffes abhängig. Die Glutathionkonzentration kann anhand einer

Kalibriergeraden durch die Aufnahme einer Reaktionskinetik bestimmt werden. Zur Bestimmung des Glutathiongehaltes wurde das GSH/GSSG-Komplettsystem der Firma Calbiochem (Nottingham, UK) eingesetzt. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen auf eine 145 mm-Petrischale ausgesät und 48 Stunden bei 37 °C und 5 %-CO₂-Partialdruck inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 10 ml PBS wurden die Zellen von der Petrischale abgeschabt, in 1 ml PBS aufgenommen und bei 300 x g sowie 4 °C pelletiert. Die Zellen wurden in jeweils 100 µl eiskaltem PBS resuspendiert und zur Zellyse bei -80 °C für mehrere Stunden eingefroren. Nach Auftauen wurden 900 µl 5 % (w/v) Meta-Phosphorsäure hinzugefügt und der Ansatz für ca. 20 Sekunden auf einem Tischschüttelgerät bei 2000 Upm gemischt. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 1000 x g abzentrifugiert. 50 µl Überstand wurden entnommen und 1:30 mit Reaktionspuffer verdünnt. Bis zur Aufnahme der Kinetik wurden die Proben auf Eis gelagert. Zur Ermittlung der Reaktionsrate wurden 200 µl jeder Probe mit 200 µl DTNB und 200 µl Glutathionreduktase in einer Halbmikroküvette vermischt. Die Aufnahme der Kinetik wurde durch die Zugabe von 200 µl (NADPH) gestartet und die Zunahme der Absorption bei 412 nm über drei Minuten mit einem Spektralphotometer verfolgt. Parallel wurden Glutathionlösungen bekannter Konzentration (0; 1,5 und 3,0 µM) analog analysiert und durch die Erstellung einer Kalibriergeraden die Nettoreaktionsrate für Glutathion bestimmt. Damit war die Bestimmung der Glutathionkonzentrationen (GSH) in den einzelnen Proben nach folgender Formel möglich:

$$\text{GSH} = \frac{\text{(Nettoreaktionsrate GSH – Startabsorption Analytgerade)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Reaktionsrate Analytprobe}} \quad [\mu\text{M}]$$

Die Glutathionkonzentration wurde gegen die Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe normalisiert. Dazu wurde das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 200 µl 500 mM Natriumhydroxidlösung solubilisiert. Die Proben wurden 1:10 in einer Mikrotiterplatte mit PBS verdünnt und die Proteinkonzentrationen, wie in Abschnitt 2.2.3.2.1 beschrieben, mit Hilfe der BCA-Methode bestimmt.

2.2.5.2 Zytotoxizitätsbestimmung

Zur Untersuchung des zytotoxischen Einflusses von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie von Formaldehyd wurde die Menge an freigesetzter Laktatdehydrogenase gemessen. Laktatdehydrogenase ist in lebenden Zellen im Zytoplasma lokalisiert und gelangt nach Zelltod in den Kulturüberstand. Da es sich um ein konstitutiv exprimiertes Gen handelt, ist die Enzymaktivität der Menge an abgestorbenen Zellen proportional. Der zytotoxische Einfluss von Xenobiotika kann demnach bestimmt werden, indem das Verhältnis zwischen der LDH-Aktivität des Kulturüberstandes und der intrazellulären LDH-Aktivität bestimmt wird. Die Aktivität wurde photometrisch durch die Bildung von Formazan bestimmt. 50 µl Kulturüberstand bzw. Gesamtzelllysat wurden für 30 min mit einem im CytoTox96-Komplettsystem der Firma Promega bereitgestellten Tetrazoliumsalz bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption durch ein Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt.

2.2.5.3 Bestimmung der relativen Apoptoserate

Der programmierte Zelltod, die so genannte Apoptose, kann durch verschiedene Stimuli induziert werden. Dabei werden zunächst so genannte Aktivatorcaspasen aktiv, die daraufhin die in ihrer inaktiven Form vorliegenden Effektorprocaspasen proteolytisch spalten und aktivieren (Danial, N. N. und Korsmeyer, S. J., 2004).

Die Apoptoserate wurde mittels des Apo-One[®]-Komplettsystems der Firma Promega durch die Aktivität der beiden Effektorcaspasen 3 und 7 bestimmt. Diese Enzyme hydrolysieren Proteine C-terminal von der Peptidsequenz DEVD. Durch die Kopplung dieses Tetrapeptids an ein Rhodaminmolekül kann ein profluoreszierendes Substrat generiert werden. Durch die Aktivität der beiden Caspasen kommt es zur Abspaltung des DEVD-Restes, wodurch die Fluoreszenz des Rhodamins bei 490 nm angeregt und die relativen Fluoreszenzintensitäten bei 535 nm detektiert werden können. Die Stärke/Höhe der Fluoreszenz ist der Aktivität der beiden Effektorcaspasen 3 und 7 proportional und somit ein Indikator für die relative Apoptoserate.

1×10^4 Zellen wurden in Triplikaten in eine 96-Lochplatte ausgesät. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Partialdruck wurde das Kulturmedium entfernt und 100 µl Medium, versetzt mit oder ohne 100 µM Wasserstoffperoxid ersetzt. Die Versuchsansätze wurden für 8 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden jeweils

100 µl profluoreszentes Rhodaminsubstrat hinzugefügt und für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler bei 300 Upm inkubiert. Danach wurden die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) in einem Fluoreszenzlesegerät bestimmt.

2.2.5.4 Bestimmung der Menge an aktiviertem RAS

Die Menge der aktivierten GTP-gebundenen RAS-Moleküle in den verschiedenen Zelllinien kann durch Affinitätsaufreinigung mittels eines Fusionsproteins, das aus der RAF-1-RAS-Bindungsdomäne sowie der Glutathion-S-Transferase zusammengesetzt ist, bestimmt werden. Lediglich aktiviertes (GTP-gebundenes) RAS ist durch seine Konformation dazu befähigt, mit dieser Domäne der RAF-Kinase zu interagieren. Durch die nachfolgende Western Blot-Analyse kann die Menge an aktiviertem RAS in den unterschiedlichen Zelllinien miteinander verglichen werden.

In dieser Arbeit wurde der „EZ-Detect RAS Activation Kit“ (Perbio Science, Bonn) verwendet. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90 % in einer 145-mm-Petrischale inkubiert. Nach Waschen mit TBS-Puffer wurden die Zellen mit 1 ml LBW-Puffer lysiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10000 x g, 15 min, 4 °C) entfernt und das Gesamtzelllysat mit 80 µg GST-RAF-1-RBD für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation der Säule bei 7200 x g für zwei Minuten und drei weiteren analogen Waschschritten mit jeweils 400 µl LBW-Puffer wurde das GTP-gebundene RAS durch Zugabe von 50 µl Laemmli-Puffer, Erhitzen auf 95 °C für 5 Minuten und anschließender Zentrifugation eluiert. Die relative Quantifizierung zwischen den verschiedenen Zelllinien erfolgte durch Western Blot-Analyse (siehe 2.2.4.1).

LBW-Puffer

Tris x Cl pH 7,5	25 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	5 mM
NP-40	1 %
Glycerol	5 %

3 Ergebnisse

Als molekulare Schalter der Signaltransduktion üben die verschiedenen RAS-Isoformen einen pleiotropen Effekt auf die Genexpression aus. Daher stellen Hochdurchsatzverfahren geeignete Werkzeuge zur Erfassung einer möglichst großen Anzahl der durch diese GTPasen in ihrer Expression modulierten Gene/Proteine dar. Bisher wurden die Auswirkungen der RAS-medierte Transformation auf das Genexpressionsprofil hauptsächlich auf Transkriptebene anhand verschiedener *in vitro*-Modellsysteme untersucht (Zuber, J. *et al.*, 2000; Vasseur, S. *et al.*, 2003; Tchernitsa, O. I. *et al.*, 2004). Die Änderung des Proteinexpressionsprofils wurde in mehreren Studien anhand der H-RAS-induzierten Transformation untersucht (Jin, B. F. *et al.*, 2006; Park, J. W. *et al.*, 2006; Ji, H. *et al.*, 2007). Aufgrund der ungenügenden Verfügbarkeit proteinbasierender Daten für K-RAS wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vitro*-System der K-RAS-gesteuerten onkogenen Transformation aufgebaut und der Einfluss unterschiedlicher K-RAS-Onkoproteinvarianten auf die Proteinexpressionssignatur mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese (2-DE) untersucht. Zusätzlich wurde die funktionelle Bedeutung differentiell exprimierter Genprodukte für den K-RAS-induzierten Phänotyp charakterisiert. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Antigenprozessierung in Tumorentitäten, die ein mutiertes K-ras-Gen tragen (Atkins, D. *et al.*, 2004). Deshalb wurde anhand des *in vitro*-Modells der Einfluss verschiedener K-RAS-Onkoproteine auf die Expression der MHC-Klasse-I-Komplexe untersucht und mögliche molekulare Ursachen der Onkogen-beeinflussten Antigenprozessierung geklärt.

3.1 Etablierung eines *in vitro*-Zellmodells der onkogenen Transformation

Klinische Befunde und *in vivo*-Studien zeigten eine Korrelation zwischen der Position der aktivierenden K-ras-Mutation und dem jeweiligen Tumorphänotyp (Guerrero, S. *et al.*, 2000; Bazan, V. *et al.*, 2002; Guerrero, S. *et al.*, 2002). Da für die onkogene Transformation von immortalisierten Nagerzellen bereits die Einführung eines Onkogens ausreichend ist (Newbold, R. F. und Overell, R. W., 1983; Spandidos, D. A. und Wilkie, N. M., 1984; Hahn, W. C. *et al.*, 1999), wurde die murine, embryonale

Fibroblastenzelllinie NIH3T3 als Parentalzelllinie gewählt. Durch die Transfektion dieser Zelllinie mit verschiedenen Allelen des humanen *K-ras4B*-Gens wurde ein murines *in vitro*-System onkogener Transformation etabliert, in dem die Veränderung des Proteinexpressionsmusters allein durch das (Proto-)Onkogen angetrieben wird. In den folgenden Abschnitten wird die Konstruktion und Charakterisierung dieses Modellsystems dargestellt.

3.1.1 Aufbau des *in vitro*-Modells

Für die Isolierung wildtypischer und mutierter *K-ras*-cDNS standen mehrere humane Karzinomzelllinien zur Verfügung, deren *K-ras*-Genstatus bekannt war (Delp, K. *et al.*, 2000). Die Klonierung der unterschiedlichen *K-ras*-cDNS-Sequenzen erfolgte mit einem für *K-ras4B*-spezifischen Oligonukleotidpaar aus den humanen Kolonkarzinomzelllinien SW-480, DLD-1 und Colo-699. Dazu wurde Gesamt-RNS aus den einzelnen Zelllinien isoliert und die nach Reverser Transkription gebildeten *K-ras*-cDNS durch PCR vervielfältigt. Das jeweilige Amplifikat wurde isoliert, aufgereinigt und über Topoisomerase-II-Klonierung in den Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert. Nach Transformation in *E. coli* DH5 α -Zellen wurde das jeweilige *K-ras*-Konstrukt über BamHI/NotI-Klonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRESHyg ligiert. Dadurch gelangt die *K-ras*-cDNS unter der Kontrolle des konstitutiven Zytomegalie (CMV)-Promotors. Die Einführung der Punktmutation in Kodon 61 von *K-ras* erfolgte mittels PCR-vermittelter ortsspezifischer Mutagenese in die *K-ras*-cDNS des Expressionsplasmids pIRESHyg-*K-ras*-wt. Die Integrität der *K-ras*-cDNS-Konstrukte wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Klonierung der Expressionsvektoren ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Zur Herstellung des transgenen Systems wurden die Vektoren mit SspI linearisiert. Anschließend wurden die einzelnen Expressionsplasmide in die embryonale, murine Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 durch Lipofektion stabil transfiziert. Nach Selektion stabiler Klone unter Verwendung von Hygromycin wurde die Integration der jeweiligen *K-ras*-Konstrukte mittels genomischer PCR durch ein Oligonukleotidpaar, das im CMV-Promotor und in der humanen *K-ras*-cDNS bindet, und nachfolgender Sequenzierung des Amplikons nachgewiesen. Die durch stabilen Gentransfer erzeugten Zelllinien werden im Folgenden je nach Aminosäuresubstitution im K-RAS-(Onko)protein als Wt (transfiziert mit wildtyp-K-

ras), G12V (transfiziert mit einer aktivierenden Punktmutation in Kodon 12), G13D (transfiziert mit einer aktivierenden Punktmutation in Kodon 13) und Q61H (transfiziert mit einer aktivierenden Punktmutation in Kodon 61) bezeichnet. Als Leervektorkontrollzelllinie dienten mit dem Vektorrückgrat transfizierte NIH3T3-Zellen.

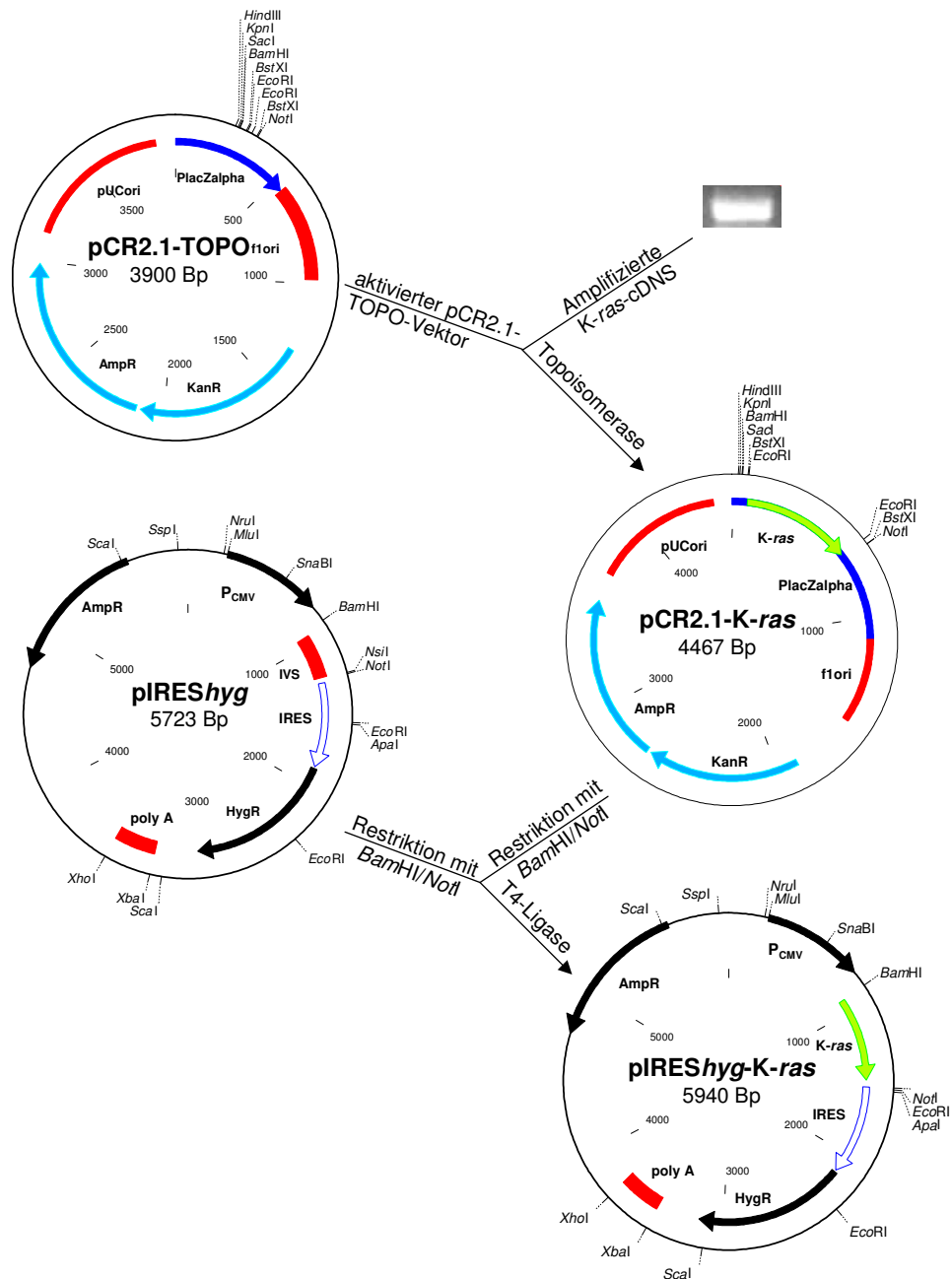


Abb. 3.1: Konstruktion der K-ras-Expressionsvektoren.

Die cDNS-Sequenz der unterschiedlichen K-ras-Allele wurde durch PCR vervielfältigt und mit Hilfe von Topoisomerase II in den Vektor pCR2.1 kloniert. Anschließend erfolgte die Restriktion von pCR2.1-K-ras mit BamHI sowie NotI und die Ligation in den ebenfalls restringierten Expressionsvektor piREShyg. Das Expressionskonstrukt piREShyg-K-ras^{Q61H} wurde abweichend durch ortsspezifische Mutagenese aus piREShyg-wt-K-ras generiert (nicht gezeigt).

Die genetischen Charakteristika der einzelnen Zelllinien sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Charakteristika der Zelllinien des *in vitro*-Modellsystems.

Zelllinie	Vektor	Kodonsequenz 12;13;61*	resultierender Aminosäureaustausch*
NIH3T3	-	kein exogenes K- <i>ras</i>	-
Vektor	pIRES <i>hyg</i>	kein exogenes K- <i>ras</i>	-
Wt	pIRES <i>hyg</i>	GGT; GGC; CAA	-
G12V	pIRES <i>hyg</i>	GTT; GGC; CAA	Val ; Gly; Gln
G13D	pIRES <i>hyg</i>	GGT; GAC ; CAA	Gly; Asp ; Gln
Q61H	pIRES <i>hyg</i>	GGT; GGC; CAT	Gly; Gly; His

*Mutationen in der Wildtyp-K-*ras*-cDNS und die daraus resultierenden Aminosäuresubstitutionen wurden hervorgehoben.

3.1.2 Bestimmung der funktionellen K-*ras*-Expression

Die Funktionalität der Expressionsvektoren wurde mittels Western Blot-Analyse von Gesamtproteinlysaten der einzelnen Zelllinien untersucht. Wie aus Abb. 3.2A ersichtlich, war die Gesamt-RAS-Expression in den K-*ras*-Transfektanten im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (NIH3T3 und Vektor) verstärkt. Zur Untersuchung des Aktivierungsstatus der exprimierten K-RAS-Varianten wurde GTP-gebundenes RAS-Protein durch eine Affinitätsaufreinigung mit einem GST-RAF-1-RBD-Fusionsprotein, wie in Material und Methoden beschrieben, isoliert und die Menge an GTP-gebundenem RAS durch Immunoblotanalysen mittels RAS-spezifischem Antikörper bestimmt. Im Gegensatz zum Gesamt-RAS-Expressionsstatus konnte GTP-gebundenes, aktives RAS-Protein nur in den mit dominant-positiven K-*ras*-Mutanten transfizierten Zelllinien detektiert werden (Abb. 3.2B). Aufgrund der vergleichbaren Gesamt-RAS-Proteinmenge scheint die Position der aktivierenden Punktmutation das RAS-GTP-Niveau zu beeinflussen: So zeigten die G12V-Zellen die größte Menge an aktiviertem RAS-Protein, während in den Q61H-Fibroblasten, innerhalb dieser Gruppe, die geringste RAS-GTP-Menge detektiert wurde. In diesem Fall wurde die β -Aktinmenge des jeweiligen Rohextrakts als Ladekontrolle verwandt (Abb. 3.2B).

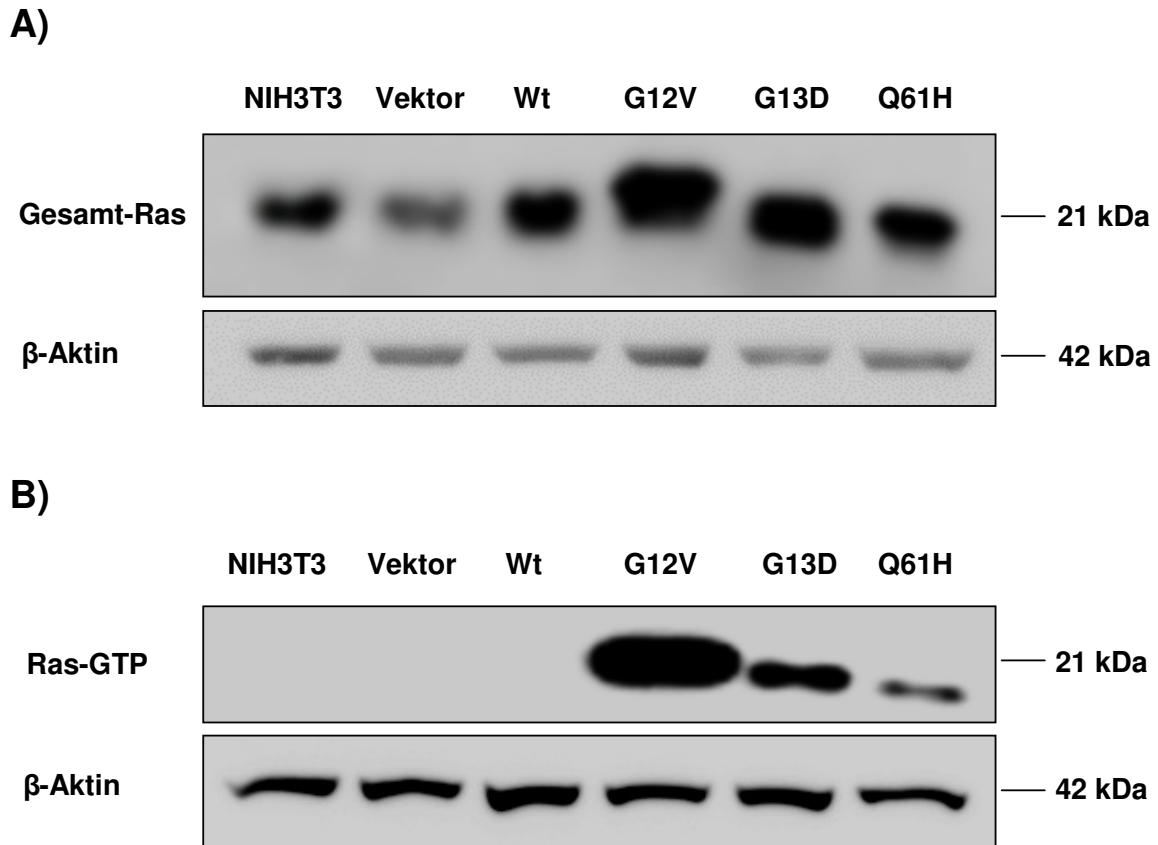


Abb. 3.2: Expressionsanalyse von Gesamt-RAS und GTP-gebundenem-RAS.

A) Die verschiedenen Zelllinien wurden in MEM kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % geerntet. 50 μ g Gesamtprotein/Zelllinien wurden mittels 12-%iger SDS-PAGE separiert und die Expression aller RAS-Proteine durch Immunfärbung mit einem anti-RAS-Antikörper nachgewiesen. Die Immunfärbung des β -Aktin-Proteins diente als Ladekontrolle.

B) Aktiviertes GTP-gebundenes RAS-Protein wurde durch die Affinitätsbindung an ein GST-RAF-1-RBD-Fusionsprotein aus den einzelnen Zelllinien isoliert. Es wurden gleiche Proteinmengen der RAS-GTP-Isolate aus den verschiedenen Zelllinien über 12-%ige SDS-PAGE getrennt und durch Immunfärbung mit einem anti-RAS-Antikörper detektiert. Die Immunfärbung des β -Aktin-Proteins diente als Ladekontrolle.

3.1.3 Einfluss der verschiedenen K-RAS-Varianten auf Morphologie, Proliferations- und Wachstumsverhalten

3.1.3.1 K-RAS-induzierte morphologische Veränderungen

Nach der Transfektion mit K-ras-Expressionskonstrukten zeigten sich starke morphologische Unterschiede in den K-ras-Transfektanten im Vergleich zu der Parentalzelllinie und den Leervektortransfektanten. So wiesen die Kontrollzelllinien eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie, mit einer ebenen Struktur und kleinen Zellfortsätzen auf. Dagegen zeigten sich nach der Überexpression von proto-onkogenem K-ras beginnende morphologische Veränderungen, wie die Auflösung

der planaren Zellstruktur und eine Erhöhung des Kern/Plasma-Verhältnisses. Durch die Überexpression von dominant-positiven *K-ras*-Allelen wurde die Ausprägung spindelförmiger Zellkörper in den Zelllinien G12V, G13D und Q61H induziert. Zusätzlich ist die Ausbildung langer Zellfortsätze für den Phänotyp dieser drei Zelllinien charakteristisch (Abb. 3.3).

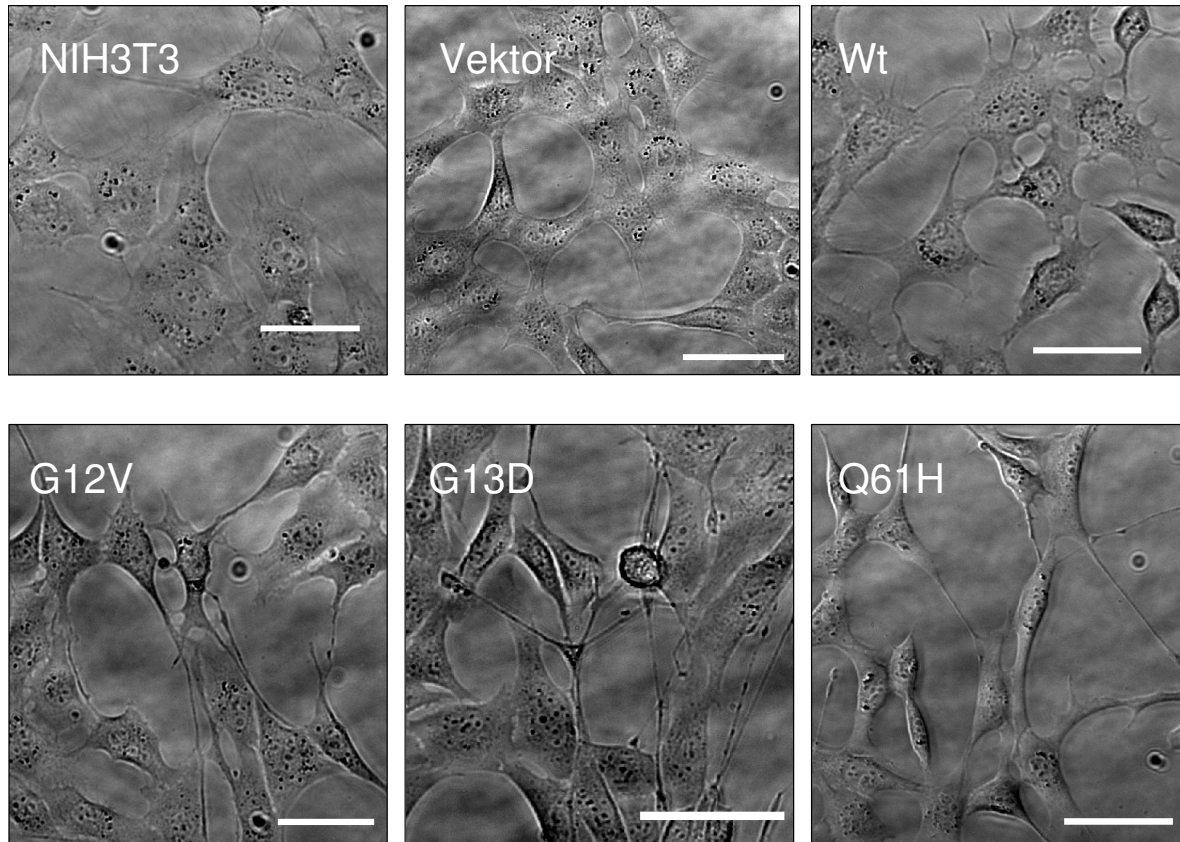


Abb. 3.3: Morphologie der K-RAS-Transformanten und Kontrollzelllinien.

Die Abbildung zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Zelllinien. Die weiße Skalierung entspricht 50 μm .

3.1.3.2 Proliferationsverhalten von *K-ras*-Transfektanten und Kontrollzellen

Ein weiteres Merkmal transformierter Zellen ist eine durch das Onkoprotein gesteigerte Proliferationsrate. Zur Untersuchung des Einflusses der Überexpression der verschiedenen *K-ras*-Allele auf das Wachstumsverhalten in 10 % FKS-haltigem Medium wurden die Verdopplungszeiten der generierten *K-ras*-Transfektanten sowie der parentalen NIH3T3- als auch der Leervektorkontrollzelllinie durch den Umsatz des Tetrazoliumsalzes XTT bestimmt. Wie aus der größeren Steigung der Wachstumskurven der *K-ras*-Transfektanten in Abbildung 3.4 ersichtlich, führte die Dosiserhöhung des Wildtyp-Allels und die Überexpression der unterschiedlich

mutierten *K-ras*-Allele zu einer im Durchschnitt um ca. zwei bis vier Stunden verkürzten Generationszeit.

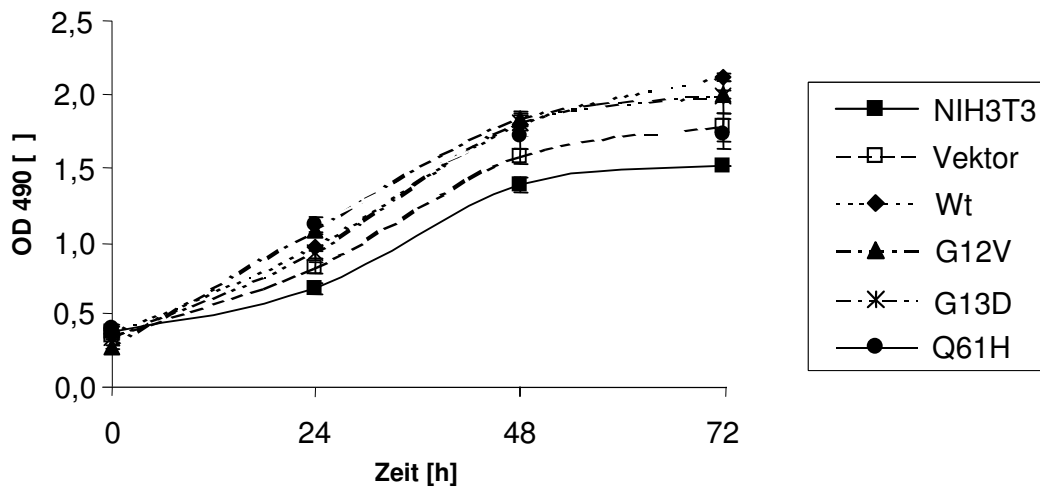


Abb. 3.4: Proliferationsanalyse von *K-ras*-Transfektanten und Kontrollzelllinien unter Normalbedingungen.

$2,5 \times 10^3$ Zellen pro Zelllinie wurden in Pentaplikaten auf eine 96-Lochplatte in 10 % FKS-haltigem MEM ausgesät und über 4 Tage alle 24 Stunden der Umsatz des Tetrazoliumsalses XTT als Indikator für die Zellzahl photometrisch bei 490 nm bestimmt. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Tabelle 3.2 aufgelistet, benötigte die Parentalzelllinie $21,9 \pm 1,4$ bzw. die Leervektorkontrolle $21,9 \pm 0,3$ h zur Verdopplung, während in der mit Zelllinie Wt eine Generationszeit von $18,9 \pm 1,0$ h gemessen wurde. In den Zelllinien, die onkogenes *K-ras* exprimierten, ergaben sich folgende im Vergleich zu den Kontrollen verkürzte Generationszeiten $19,7 \pm 1,0$ h für G12V, $17,6 \pm 1,5$ h für G13D und $20,7 \pm 2,5$ h für Q61H.

Tabelle 3.2: Ermittelte Verdopplungszeiten von Kontrollzelllinien und *K-ras*-Transfektanten.

Zelllinie	Generationszeit [h]
NIH3T3	$21,9 \pm 1,4$
Vektor	$21,9 \pm 0,3$
Wt	$18,9 \pm 1,0$
G12V	$19,7 \pm 1,0$
G13D	$17,6 \pm 1,5$
Q61H	$20,7 \pm 2,5$

Aus drei unabhängigen Wachstumskurven wurden Mittelwerte und Standardabweichungen für die Generationszeit der einzelnen Zelllinien bestimmt.

Als weiteres Kennzeichen des Wachstumsverhaltens Onkogen-transformierter Zellen wurde die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren anhand reduzierter FKS-Konzentrationen überprüft. Abbildung 3.5 zeigt das Ergebnis der Proliferationsanalyse von Kontroll- und *K-ras*-transfizierten Zelllinien bei Inkubation mit unterschiedlich konzentriertem FKS-haltigem Kulturmedium. Bei einer FKS-Konzentration von 0,10 % teilten sich nur die Zelllinien Wt, G12V und G13D, während die Parentalzelllinie, Leervektorkontrolle sowie die Zelllinie Q61H eine Wachstumsarretierung aufwiesen. Höhere FKS-Konzentrationen konnten die Zellteilung dieser Zellen induzieren. Allerdings war die Proliferationsrate bis zu einer untersuchten FKS-Konzentration von 0,50 % deutlich geringer als bei Wt-, G12V- und G13D-Zellen.

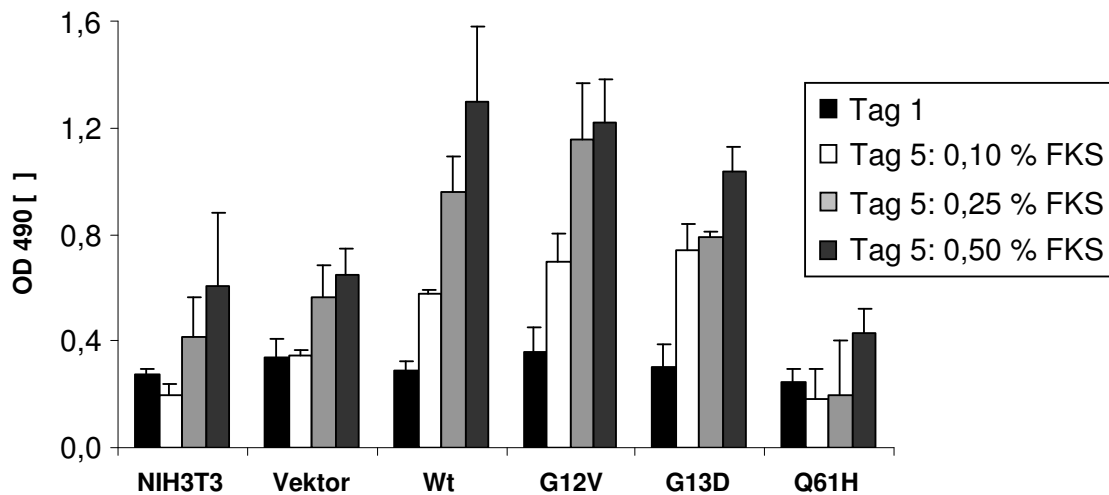


Abb. 3.5: Proliferationsanalyse von *K-ras*-Transfektanten und Kontrollzelllinien bei reduzierten FKS-Konzentrationen.

Das Proliferationsverhalten der Zelllinien bei reduzierten FKS-Konzentrationen wurde analog zu Versuch 3.4 durchgeführt. Jedoch wurde nach 12 Stunden das Medium entfernt, einmal mit Medium ohne FKS gewaschen und in parallelen Versuchsreihen Kulturmedium mit 0,10 bzw. 0,25 und 0,50 % FKS auf die Zellen gegeben. Nach 5-tägiger Inkubation wurde die Proliferation durch die Bildung von Formazanfarbstoff photometrisch erfasst. Das Diagramm zeigt die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

3.1.3.3 Einfluss der K-RAS-Varianten auf verankerungsunabhängiges Wachstum

Ein Charakteristikum der malignen Transformation ist die Fähigkeit ohne Bindung an einer festen Matrix zu proliferieren. Dieser Parameter wurde qualitativ anhand des Wachstums in so genanntem Weichagar überprüft. Wie Abbildung 3.6 zeigt, konnten nur bei mit K-*ras*G12V-transfizierten Fibroblasten vitale Zellkolonien angefärbt werden. Dies bedeutet, dass nur diese Transfektanten zu einem verankerungsunabhängigen Wachstum befähigt sind.

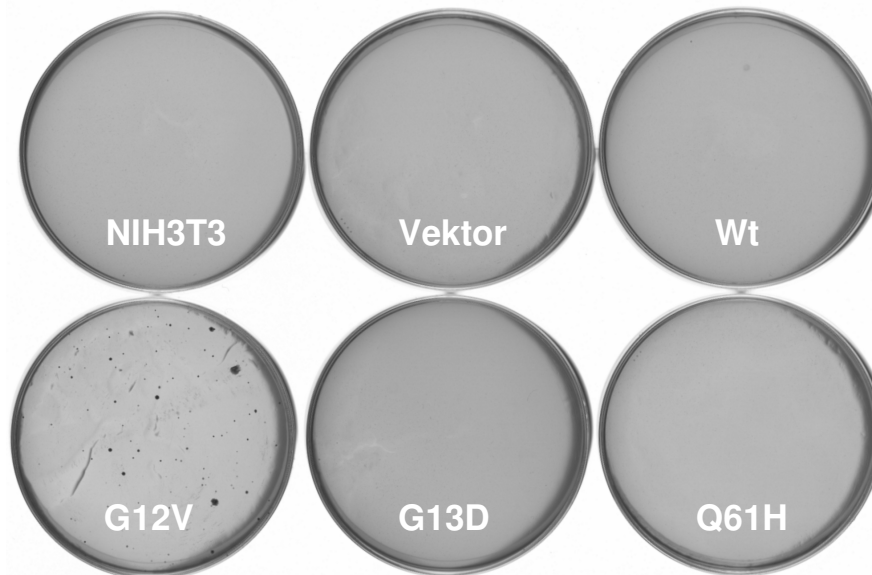


Abb. 3.6: Analyse des verankerungsunabhängigen Wachstums der verschiedenen Transfektanten und Kontrollzelllinien.

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurden jeweils 2×10^4 Zellen pro Zelllinie in Triplikaten, in 0,3-%igem Weichagarmedium suspendiert, ausgesät und für vier Wochen bei 37 °C und 5 % CO₂ Partialdruck in einem feuchten Inkubator kultiviert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

3.1.3.4 Zusammenstellung der Zellcharakteristika des *in vitro*-Modells

Anhand Tabelle 3.3 kann zusammengefasst festgestellt werden, dass die Überexpression dominant-positiver K-*ras*-Allele zu einem unterschiedlichen zellbiologischen Verhalten im Vergleich zu Parentalzellen, Leervektorkontrollzellen sowie größtenteils zu wildtyp-K-*ras*-überexprimierenden Zellen führt. Neben den in Abschnitt 3.1.3 dargestellten Veränderungen zeigten die Zelllinien G12V, G13D und Q61H die Ausbildung von Foci (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.3: Eigenschaften der hergestellten K-RAS-Zelllinien im Vergleich zur Parentalzelllinie NIH3T3.

Eigenschaft	Vektor	Wt	G12V	G13D	Q61H
veränderte Morphologie	-	(+)	+	+	+
Fokusbildung	-	-	+	+	+
verkürzte Generationszeit	-	+	+	+	+
verankerungsloses Wachstum	-	-	+	-	-
Proliferation in 0,1 % FKS-haltigem Medium	-	+	+	+	-

-: keine Änderung, +: Änderung zur angegebenen Eigenschaft

3.2 Analyse des Einflusses von K-RAS auf die Signaltransduktion

Wichtige Signalkaskaden der (K)-RAS-vermittelten Transformation sind der MAPK (Mitogen-aktivierter Protein Kinase)-Weg sowie der durch Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) gesteuerte Akt-Weg (Ellis, C. A. und Clark, G., 2000; Weinberg, R. A., 2007). Der Aktivierungsgrad dieser Signalwege lässt sich anhand des Phosphorylierungsgrades an bestimmten Serin-, Threonin- und Tyrosinresten der einzelnen Kinasen analysieren. Neben der Phosphorylierungsanalyse spezifischer Kinasen kann der „globale Aktivierungszustand“ über eine Immunfärbung mit Antikörpern, die unabhängig von der Peptidsequenz phosphorylierte Serin-, Threonin- und Tyrosinreste erkennen, bestimmt werden.

3.2.1 Evaluation des globalen Aktivierungszustandes der einzelnen Zelllinien mittels Western Blot-Analyse

Da bei der onkogenen Transformation insbesondere der Anteil phosphorylierter Tyrosinreste von Proteinen erhöht ist (Blume-Jensen, P. und Hunter, T., 2001), wurde das Tyrosinphosphorylierungsniveau der unterschiedlichen Zelllinien miteinander verglichen. Hierzu wurden Gesamtproteinzelllysate aus den einzelnen Zelllinien hergestellt und Immunoblotanalysen mit anti-phospho-Tyrosinantikörpern durchgeführt. Dabei zeigten sich in den Zelllinien G12V, G13D und Q61H zwischen 30 und 90 kDa mehrere Proteinbanden mit verstärkter Tyrosinphosphorylierung im Vergleich zu Parental-, Leervektor-Kontrollzellen und der Zelllinie Wt. Im Gegensatz dazu wurde im Molekulargewichtsbereich von etwa 15 kDa eine Proteinbande

detektiert, die in den Parental-, Leervektor- und Wt-Zellen stärker phosphoryliert wird (Abb. 3.7). Diese Ergebnisse sprechen für eine Deregulation der Signaltransduktion nach der Überexpression von konstitutiv aktivem K-RAS-Onkoprotein.

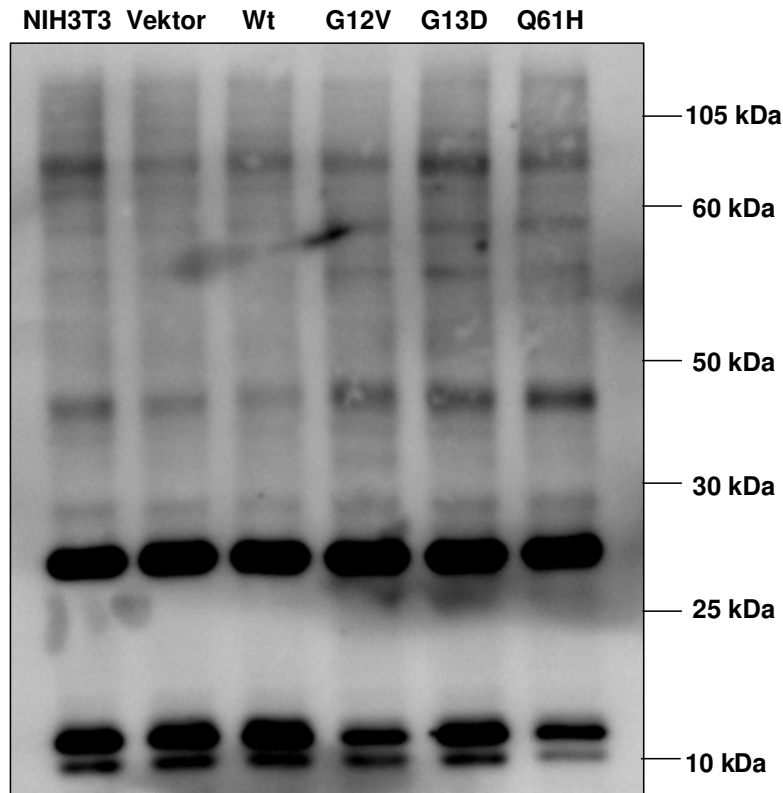


Abb. 3.7: Analyse des Tyrosinphosphorylierungsgrades in Kontrollzellen und K-ras-Transfektanten.

50 µg Gesamtzelllysat/Zelllinie wurden in einem 12-%igen Acrylamidgel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit einem phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper angefärbt.

3.2.2 Verstärkte Aktivität des MAPK-Weges nach K-RAS-Überexpression

Die Signalkaskade des MAPK-Weges ist v. a. für die Proliferationsregulation von Bedeutung (Daum, G. *et al.*, 1994). Der Aktivierungsgrad des MAPK-Weges wurde anhand der Phosphorylierung des RAS-Effektor-Moleküls RAF-1 an Ser259 sowie des Phosphorylierungsniveaus der MAP-Kinasen ERK1 und 2 an Tyr204 überprüft. Außerdem wurde der Gesamtexpressionsstatus von ERK1 und 2 durch die Immunfärbung gegen ein nicht-phosphoryliertes Epitop analysiert. Die Überexpression von Wildtyp und mutiertem K-ras führen zu einer Aktivierung des MAPK-Weges, die sich in einem erhöhten Anteil an phosphoryliertem RAF-1 sowie von ERK 1 und 2 in allen K-ras-Transfektanten gegenüber der Parentalzelllinie und

der mit dem Leervektor transfizierten Kontroll-Zelllinie zeigt. Darüber hinaus war die Gesamtexpression von ERK2 in den K-*ras*-Transfektanten erhöht (Abb. 3.8).

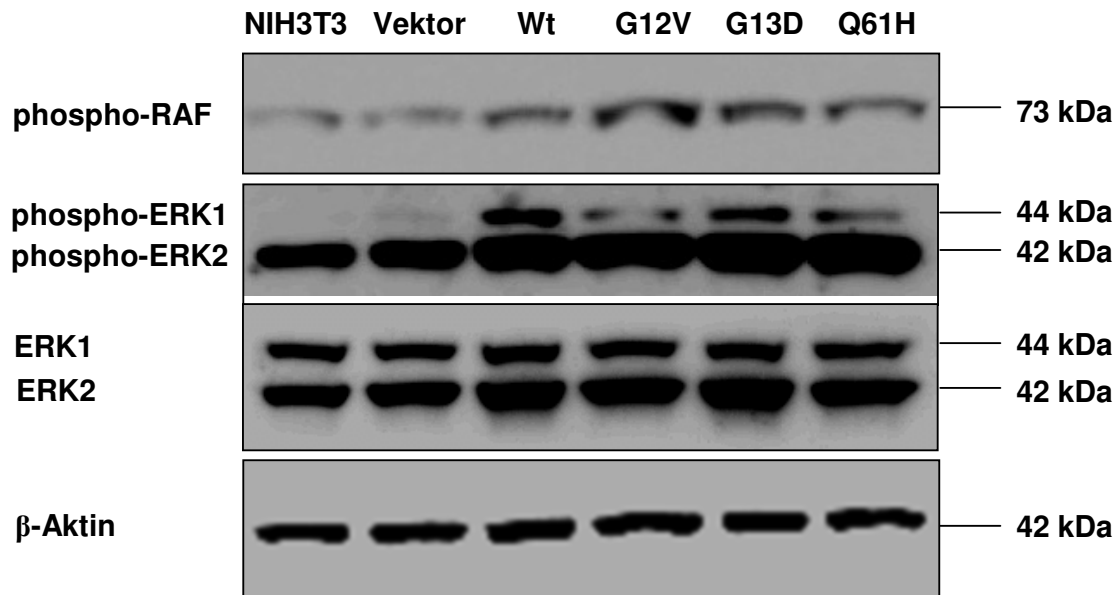


Abb. 3.8: Aktivitätsanalyse des MAPK-Weges.

50 µg Gesamtzelllysate/Zelllinie wurden durch Immunblotanalysen mit Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen von RAF-1, ERK1/2 sowie gegen Gesamt-ERK1/2-Protein analysiert. Die Immunfärbung von β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Beispiel aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2.3 Verstärkte Aktivierung des PI3-K/AKT-Weges nach onkogener K-*ras*-Überexpression

Der PI3-K/AKT-Signalweg beeinflusst die Sensitivität der Zelle gegenüber dem programmierten Zelltod. Der Aktivierungsgrad dieser Signalkaskade wurde anhand der Menge der an phosphorylierten regulatorischen Untereinheit p85 der PI3-K (Tyr 458), AKT-Kinase-Moleküle (Ser 473) sowie der Glykogensynthasekinase-3β (GSK-3β, Ser 9) überprüft. Durch die Phosphorylierung wird GSK-3β inaktiviert. Durch diese Inhibierung der GSK-3β werden anti-proliferative und pro-apoptische Signalwege inhibiert.

Wie aus Abbildung 3.9 ersichtlich, führte die Überexpression von onkogenem K-*ras* zu einer verstärkten Aktivierung des PI3-K/AKT-Weges in den Zelllinien G12V, G13D und Q61H, die sich in einem erhöhten Phosphorylierungsgrad der p85-Untereinheit sowie der AKT-Kinase widerspiegelt. Außerdem war die Menge an phosphorylierten GSK-3β-Molekülen in den onkogenen Transfektanten im Vergleich zu den Kontrollzelllinien erhöht.

Die Aktivierung dieses Signalweges lässt eine verstärkte Apoptoseresistenz in den Transfektanten mit konstitutiv aktivem K-RAS vermuten.

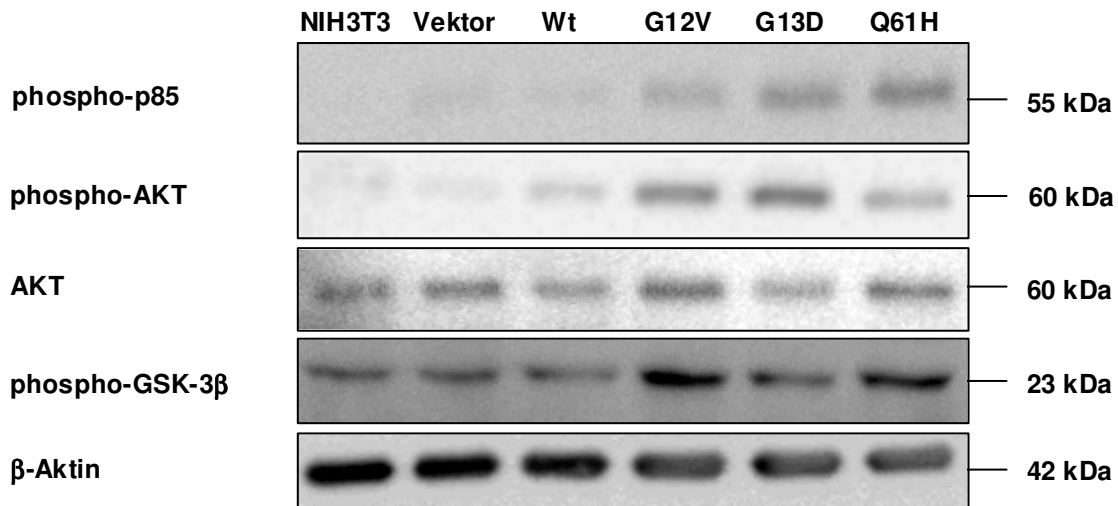


Abb 3.9: Aktivitätsanalyse des PI3-K/AKT-Weges.

50 µg Gesamtzelllysat der verschiedenen Zelllinien wurden durch 10- bzw. 12-%ige SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen der regulatorischen PI3-K-Untereinheit p85, AKT, GSK-3β sowie gegen nicht-phosphoryliertes AKT immungefärbt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl eine verstärkte Aktivierung des MAPK- als auch des PI3-K/AKT-Weges detektiert wurde. Für den MAPK-Weg lässt dieses Ergebnis auf eine erhöhte Proliferationsrate der *K-ras* exprimierenden Zelllinien schließen und bestätigt damit die in Abschnitt 3.1.3.2 gezeigte verkürzte Generationszeit dieser Zelllinien. Die Aktivierung des PI3-K/AKT-Weges deutet auf eine verstärkte Apoptoseresistenz der Zelllinien G12V, G13D und Q61H hin. Dieses Phänomen wurde durch funktionelle Analysen näher untersucht und stellt eine Erklärungsmöglichkeit für die in Abschnitt 3.5 dargestellten Ergebnisse dar. Die Aktivierung dieser beiden Signalwege ist für die Transformation durch onkogenes RAS essentiell (Weinberg, R. A., 2007) und stimmt damit mit den in Kapitel 3.1.3 beschriebenen phänotypischen Veränderungen überein.

3.3 Analyse des Einflusses von K-RAS auf die MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung und -präsentation

Es wird postuliert, dass die onkogene Transformation zu einer verminderten Expression von Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie (APM) führt und daraus eine verringerte MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression resultiert (Lohmann, S. *et al.*, 1996; Seliger, B. *et al.*, 1998; Herrmann, F. *et al.*, 2004). Daher wurde untersucht, ob die Transformation mit onkogenem K-RAS einen ähnlichen „Immune Escape“-Phänotyp nach sich zieht.

3.3.1 Verringerung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression durch K-RAS

Die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression wurde in den verschiedenen K-RAS-Transformanten mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines anti-H2-spezifischen Primärantikörpers, der den Haplotypen H2-L^q erkennt, quantifiziert. Die Histogramme eines repräsentativen Experiments sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

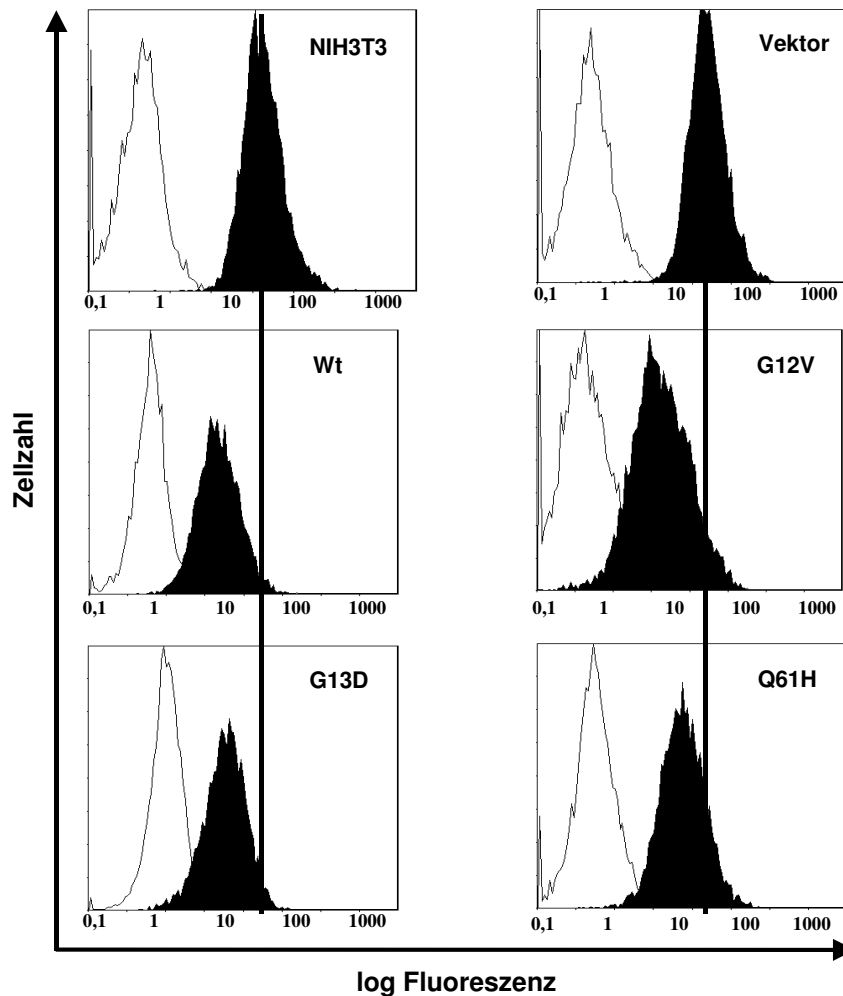


Abb. 3.10: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression des H2-L^Q-Lokus.

Die unterschiedlichen Zelllinien wurden entweder mit IgG2A- oder H2-L^Q-Antikörpern inkubiert und die Oberflächenexpressionen durchflusszytometrisch, wie in Material und Methoden beschrieben, analysiert. Weiße Histogramme: Fluoreszenz der IgG2A-Kontrolle, schwarze Histogramme: Fluoreszenz des H2-L^Q-Lokus.

Die Überexpression von wildtyp und mutiertem *K-ras* führt zu einer starken Verringerung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression im Vergleich zu NIH3T3 und Vektorkontrollzelllinie, die eine ähnliche Oberflächenexpression aufwiesen. Zur Quantifizierung dieses Effektes wurden aus mehreren unabhängigen Experimenten Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Wie in Abbildung 3.11 gezeigt, führte die Überexpression der verschiedenen *K-ras*-Varianten zu einer um mindestens 30-60 % verringerten Expression des Haplotypen H2-L^Q.

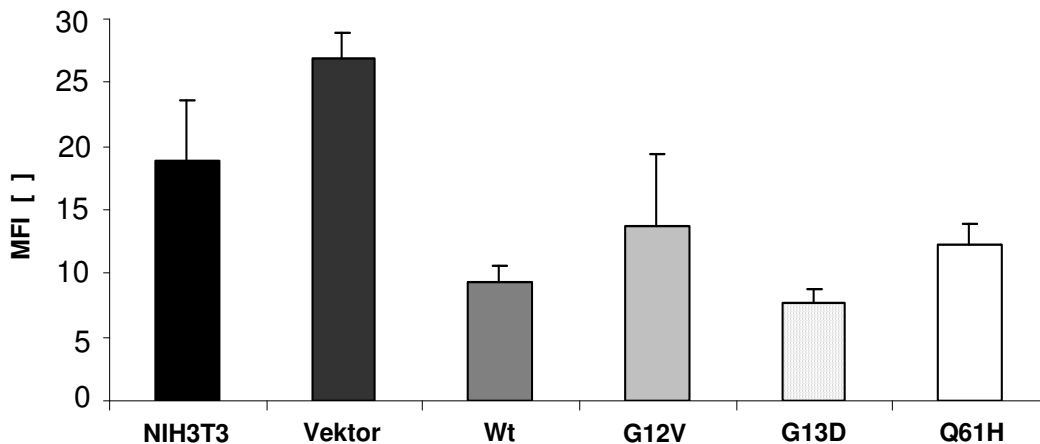


Abb. 3.11: Expressionsvergleich des MHC-Klasse-I-Haplotypen H2-L^q.

Jeweils 5×10^5 Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden mit einem Antikörper gegen H2-L^q immungefärbt und die spezifische Fluoreszenz gegen eine IgG2A-Kontrolle abgeglichen. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

3.3.2 K-RAS reprimiert die Expression bestimmter APM-Gene

Einer defizienten MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression können verschiedene zelluläre Mechanismen zugrunde liegen. In menschlichen Tumoren wurden beispielsweise neben Mutationen und Deletionen des β 2-Mikroglobulins (β 2-M) und einer verringerten Expression der schweren Kette auch Herunterregulationen bzw. Funktionsverluste von APM-Komponenten nachgewiesen (Seliger B. *et al.* 2002). Daher wurde untersucht, ob die Expression der Antigenprozessierungsmoleküle durch K-RAS inhibiert wird. Zur möglichen Detektion beeinträchtigter Komponenten wurden sowohl quantitative mRNA-Expressionsanalysen als auch semiquantitative Western Blot-Analysen durchgeführt. Zunächst wurde die Expression von schwerer MHC-Kette H2-L^q und β 2-M mittels qRT-PCR überprüft. Wie aus Abbildung 3.12 hervorgeht, war die mRNA-Menge der schweren Kette H2-L^q in den K-RAS-Zelllinien vergleichbar mit dem der Parentalzelllinie bzw. der Leervektorkontrolle. Die β 2-M-Expression zeigte ebenfalls ähnliche konstitutive Transkriptmengen außer in der Zelllinie G13D, bei der eine tendenzielle Heraufregulation der β 2-M-mRNA-Menge ermittelt wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die verringerte MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nicht auf reduzierte H2-L^q - bzw. β 2-M-Transkriptmengen zurückgeführt werden.

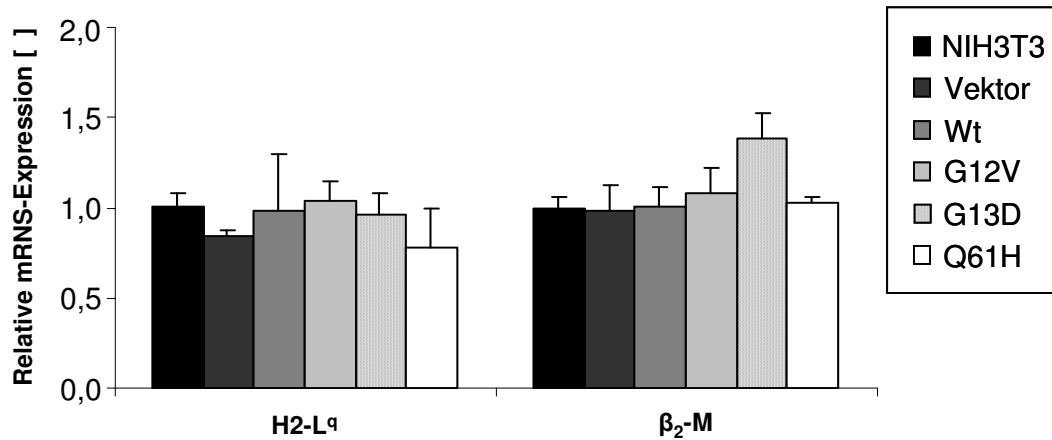


Abb. 3.12 Echtzeit-quantitative RT-PCR-Analysen von schwerer Kette und β2-Mikroglobulin.

Gleiche Mengen Gesamt-RNA wurden wie in Material und Methoden beschrieben, revers transkribiert und die cDNS der Zielgene mit den im Anhang (Tabelle C) angegebenen Oligonukleotiden in den verschiedenen Zelllinien amplifiziert. Die mRNA-Niveaus wurden jeweils gegen β-Aktin normalisiert. Die Expression der Parentalzelllinie wurde auf 1 gesetzt. Das Diagramm repräsentiert Durchschnittswerte von drei unabhängigen Experimenten.

Daher wurde die Expression der wesentlichen Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie, d. h. des Proteasoms, des TAP-Transporters sowie assoziierter Chaperone überprüft. Wie aus den Ergebnissen der qPCR-Analyse der konstitutiven Proteasomuntereinheiten X, Y und Z sowie der IFN-γ-induzierbaren Einheiten PA 28α und β in Abbildung 3.13 zu sehen, waren die unterschiedlichen Proteasomuntereinheiten relativ homogen exprimiert. Eine Ausnahme stellt die Proteasomuntereinheit Z dar, die in der Zelllinie G13D etwa eine Verdopplung der Transkriptmenge zeigte. Eine tendenzielle Minderexpression der PA 28α-Untereinheit wurde in den Zelllinien G13D und Q61H festgestellt. Allerdings hatte diese Minderexpression keine detektierbaren Auswirkungen auf die Expression des Genproduktes (Abb. 3.16).

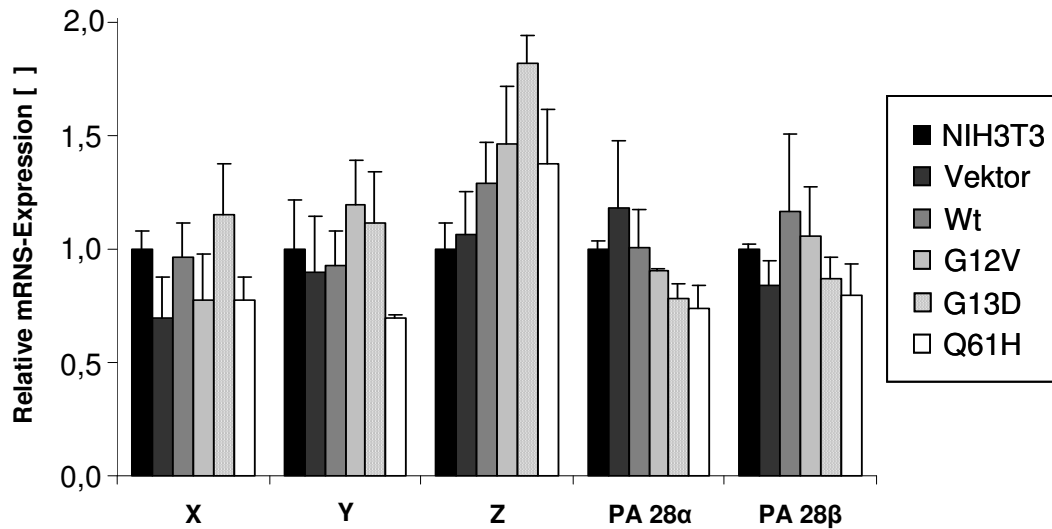


Abb. 3.13 Echtzeit-quantitative RT-PCR-Analysen von Komponenten des Proteasoms.
Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abbildung 3.12 beschrieben.

Die Quantifizierung der mRNA-Menge des ABC-Transporters ergab relativ gleichmäßige Transkriptexpressionen der beiden Komponenten TAP1 und 2 (Abb. 3.14).

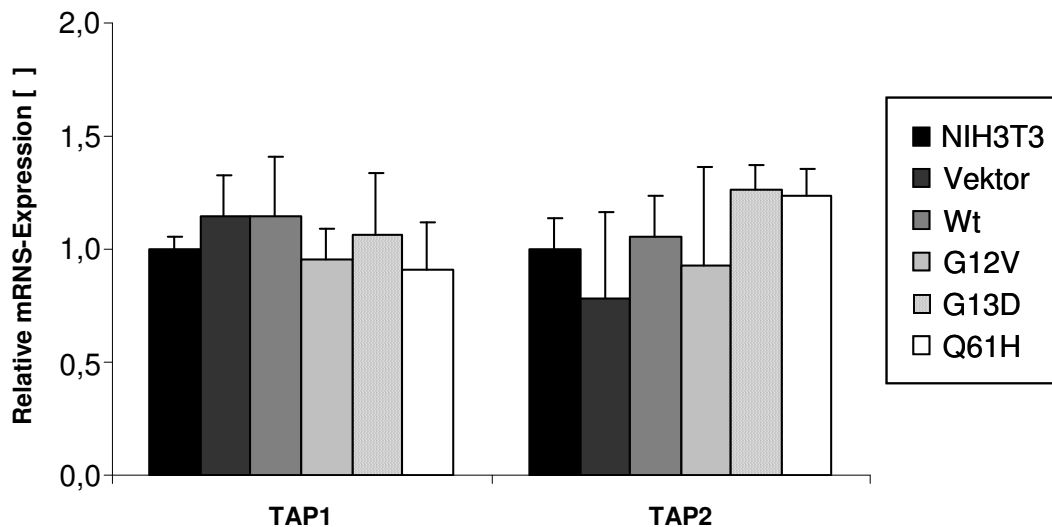


Abb. 3.14 Echtzeit-quantitative RT-PCR-Analysen des TAP-Transporters.
Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abbildung 3.12 beschrieben.

Zur korrekten Assemblierung des Peptidladungskomplexes werden verschiedene Chaperone sowie die Oxidoreduktase ERp57 benötigt. Die qRT-PCR-Analyse dieser APM-Komponenten ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Die Expression von ERp57 und Calnexin wurde durch die *K-ras*-Expression nicht beeinträchtigt. Eine Reduktion der Calretikulintranskriptmenge konnte nur in der Zelllinie Q61H nachgewiesen werden.

Dagegen war die mRNA-Menge des molekularen Faltungshelfers Tapasin in den *K-ras*-Transfektanten G12V, G13D und Q61H auf ca. 50 % des Niveaus der Parentalzellen bzw. der Leervektorkontrolle erniedrigt.

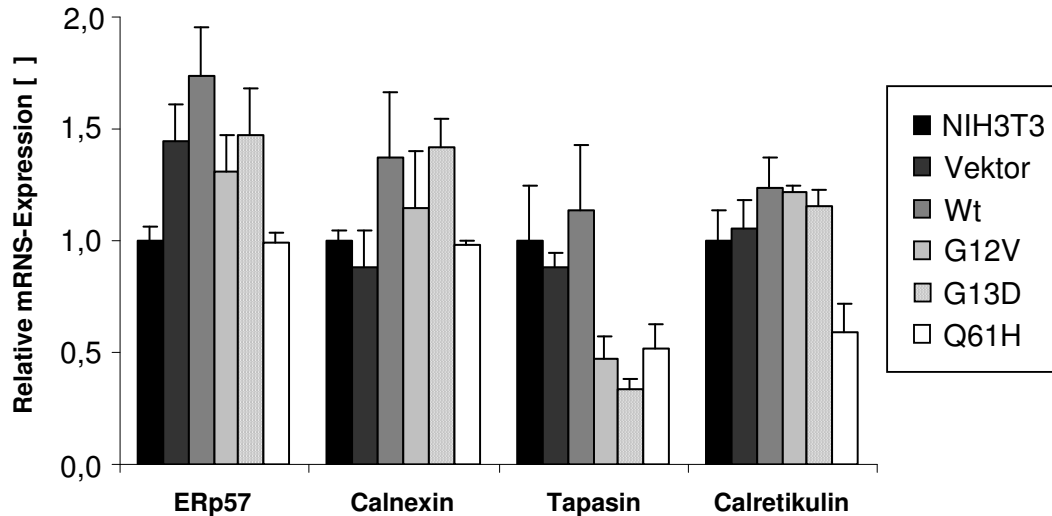


Abb. 3.15 Echtzeit-quantitative RT-PCR-Analysen verschiedener Chaperone der APM und ERp57.

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abbildung 3.12 beschrieben.

Zur Überprüfung ob die verringerte Tapasin-Transkriptmenge mit der Proteinmenge korreliert, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Immunoblotanalyse dieses Chaperons korrelierte mit den Ergebnissen der qRT-PCR-Analyse und zeigt eine deutliche Minderexpression des Tapasinproteins in den Zelllinien G12V, G13D und Q61H (Abb. 3.16). Da Tapasin ein entscheidendes Element des Peptidladungskomplexes darstellt und dabei insbesondere den TAP-Transporter stabilisiert, wurde untersucht, ob die Reduktion der Tapasinexpression in einer Destabilisierung dieses ABC-Transporters resultiert. Wie Abbildung 3.16 zeigt, konnte auf Proteinebene eine signifikante Verringerung von TAP1 nachgewiesen werden.

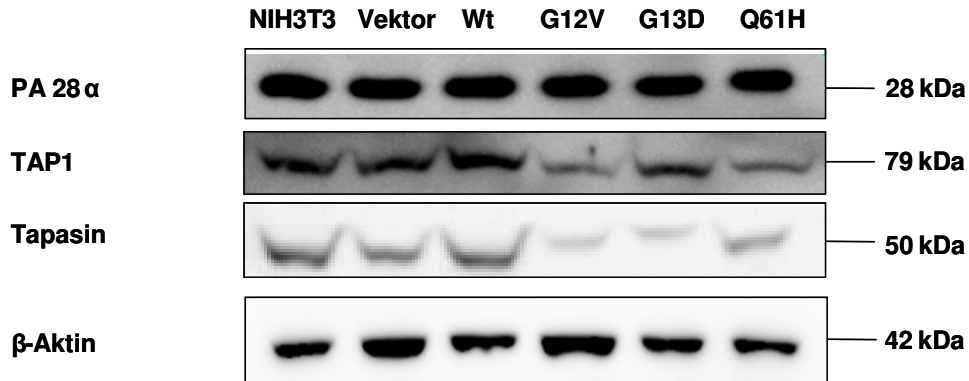


Abb. 3.16: Immunoblotanalysen von PA 28 α , TAP1 und Tapasin.

Gleiche Mengen Gesamtprotein wurden aus *K-ras*-Transfektanten und Kontrollzellen isoliert und nach Separierung durch SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Visualisierung der Zielproteine erfolgte durch die in Material und Methoden angegebenen spezifischen Antikörper. In der Abbildung ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten gezeigt.

Die reduzierte Tapasin- und TAP1-Expression bieten damit eine Erklärungsmöglichkeit für die in Kap. 3.3.1 beschriebene MHC-Klasse-I-Oberflächenminderexpression. Dagegen konnte der Mechanismus der supprimierten MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in der Zelllinie Wt durch die Expressionsanalyse der APM-Komponenten nicht aufgeklärt werden.

3.4 Komparative Analyse des Proteinexpressionsprofils

Die Etablierung des verwendeten *in vitro*-Modellsystems ermöglicht den Einfluss der unterschiedlichen K-RAS-Varianten auf das Proteinexpressionsmuster im Vergleich mit den Kontrollzelllinien zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Analyse die klassische 2D-Gelelektrophorese (2-DE) eingesetzt. Wie aus Abbildung 3.17 hervorgeht, ist der theoretische pI des Mausproteoms bimodal verteilt und zeigt dabei zwei Scheitelpunkte bei pH 5,5 und pH 9,5, während das Molekulargewicht der meisten Proteine im Durchschnitt ca. 40 kDa beträgt (Knight, C. G. *et al.*, 2004).

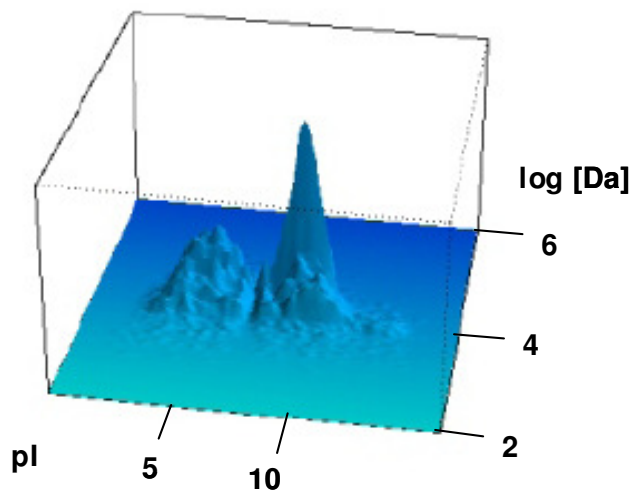


Abb 3.17: *In silico*-Verteilung des Mausproteoms.

Das Diagramm zeigt die theoretische Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Proteine nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht (verändert nach Knight *et al.*, 2004).

Zur Erfassung möglichst aller Proteine wurde der pH-Bereich von 4-7 und der pH-Bereich von 6-11 separat analysiert und zur Auftrennung in der 2. Dimension für beide pH-Bereiche eine 13-%ige Polyacrylamidmatrix gewählt. Nach der Separierung wurden die Proteine unter Verwendung von unterschiedlichen Färbemethoden, wie Coomassie-, Silber- bzw. Fluoreszenzfärbung, visualisiert. Die Dokumentation der Gele erfolgte mittels eines Hochauflösungsscanners bei einer Auflösung von 300 dpi. Der Proteinexpressionsvergleich zwischen Kontrollzellen und K-ras-Transfektanten wurde mit Hilfe des Auswerteprogramms Proteomweaver (BioRad, München) durchgeführt. Die Identifizierung differentiell exprimierter Proteine erfolgte durch massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF-MS. Der Ablauf der Proteomanalysen ist in Abbildung 3.18 schematisch als Flussdiagramm dargestellt.

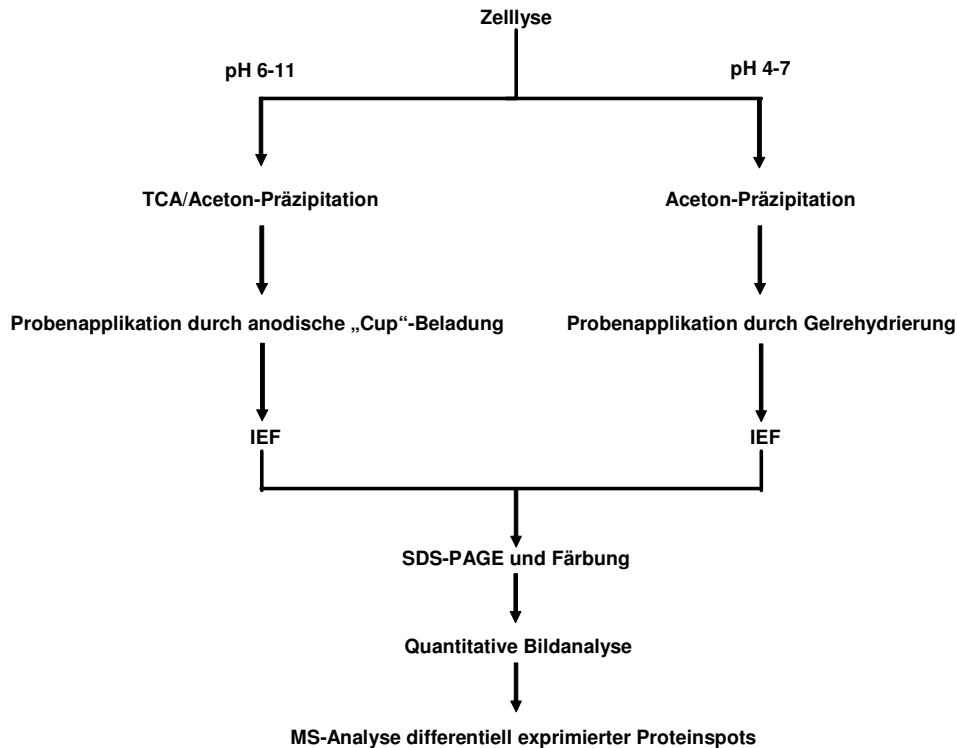


Abb. 3.18: Schematische Darstellung des Ablaufs der durchgeführten Proteomanalysen.

Die Proteomanalysen wurden mit mindestens zwei biologischen Replikaten durchgeführt. Proteinspots, die in beiden Experimenten die gleiche Regulation zeigten, wurden als differenziell exprimiert betrachtet. Außerdem wurde die technische Reproduzierbarkeit durch mindestens drei individuelle 2-D-Gele pro Zelllinie für jedes biologische Replikat abgesichert. Zur statistischen Absicherung der differenziell exprimierten Proteine wurde der t-Test herangezogen.

3.4.1 Auftrennung des Proteoms im sauren bis neutralen pH-Bereich (pH 4-7)

Zur Auftrennung von Proteinen mit saurem bis neutralem pI wurde das Zelllysate in Solubilisierungspuffer gelöst. Nach IEF und SDS-PAGE konnten jeweils ca. 800 Proteinspots durch Färbung mit RuBPS in den einzelnen Zelllinien detektiert werden. Die Datenanalyse erfolgte, wie in Material und Methoden beschrieben, mit Hilfe des Auswerteprogramms Proteomweaver. In Abbildung 3.19 ist repräsentativ der Vergleich von Parentalzelllinie und der K-RAS-Transformanten G12V durch softwaregestützte Übereinanderlagerung der beiden Expressionsprofile dargestellt.

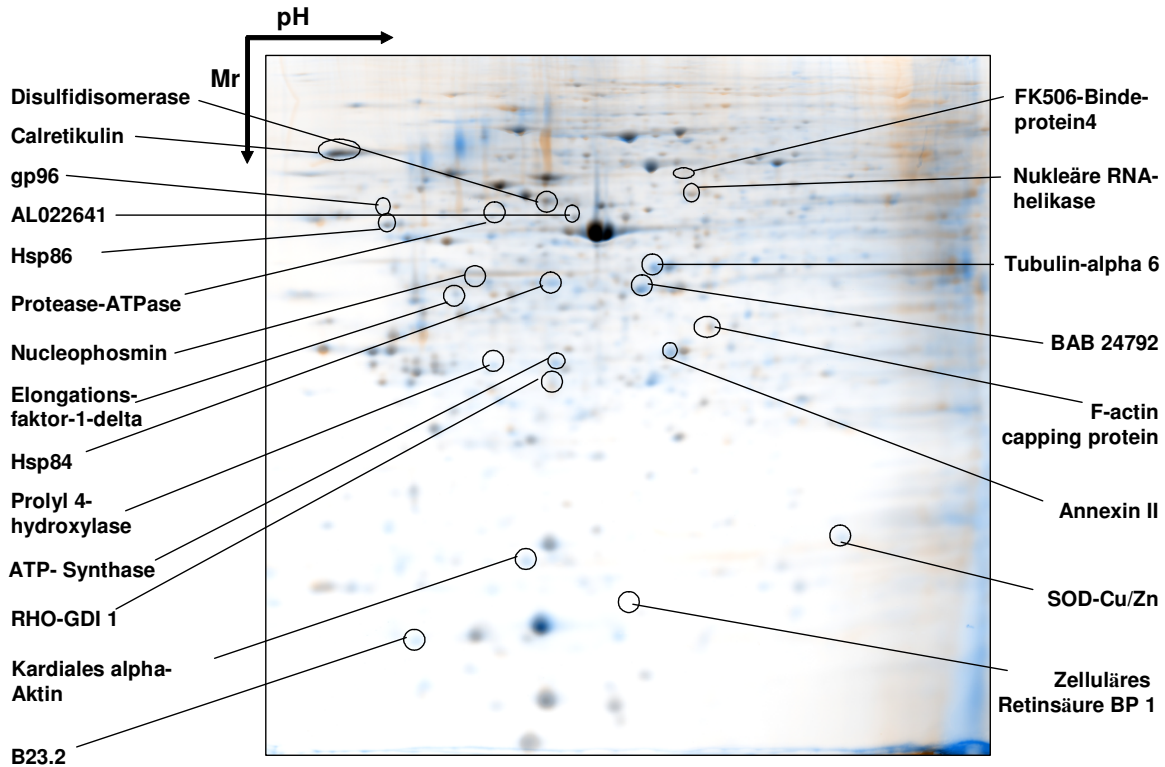


Abb. 3.19: Repräsentativer Vergleich des Proteoms von NIH3T3-Zellen und der Onkogen-transformierten Zelllinie G12V im pH-Bereich von 4-7.

Die beiden Zelllinien wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert und die extrahierten Proteine über eine 2D-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels Fluoreszenzfärbung visualisiert und die Proteinmuster durch das Programm Proteomweaver (Version 3.1) miteinander verglichen. Das Bild zeigt die Übereinanderlagerung der beiden Expressionsprofile. Gleich stark exprimierte Proteine sind schwarz dargestellt. Blau gefärbte Proteine werden in der Zelllinie G12V nicht oder in deutlich geringerem Maße exprimiert als in der Parentalzelllinie, während für braun gefärbte die umgekehrte Situation vorliegt. Differenziell exprimierte Proteine wurden hervorgehoben.

Proteine mit verdoppelter Mehr- oder Minderexpression wurden als differenziell exprimiert betrachtet und der massenspektrometrischen Analyse zugeführt. Die Funktionalität des Auftrennungsverfahrens konnte durch den Vergleich von beobachteten und theoretisch ermittelten pI- und Mr-Werten bestätigt werden. Die Anzahl der regulierten Gene variierte zwischen den verschiedenen Transfektanten im Vergleich zur Parentalzelllinie. Während in der Zelllinie G12V die Expression von 52 Proteinen moduliert vorlag, waren nur 14 Proteine in der wildtyp-K-ras-überexprimierenden Zelllinie Wt reguliert. Dabei waren die differenziell exprimierten Proteine in den verschiedenen K-ras-Zelllinien in den meisten Fällen gleichermaßen reguliert. In Abbildung 3.20 ist exemplarisch der Expressionsvergleich von kardialem alpha-Aktin, Calretikulin, nukleärem Phosphoprotein B23.2 sowie der Prolyl-4-

hydroxylase dargestellt. Die Peptidmassenfingerabdrücke und Peptidsequenzierungen der regulierten Proteine aus dem pH-Bereich 4-7 wurden durch das Labor von Dr. Roland Kellner (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die identifizierten Zielproteine sind in Tab. 3.4 mit ihrem Datenbankeintrag, isoelektrischen Punkt, Molekulargewicht, Sequenzabdeckung/MASCOT-Score, ihrer Regulation, der subzellulären Lokalisation sowie ihrer Funktion zusammengefasst. Die Regulationsfaktoren, Variationskoeffizienten (CV) sowie die statistische Analyse (t-test) können im Anhang (Tabelle A) entnommen werden.

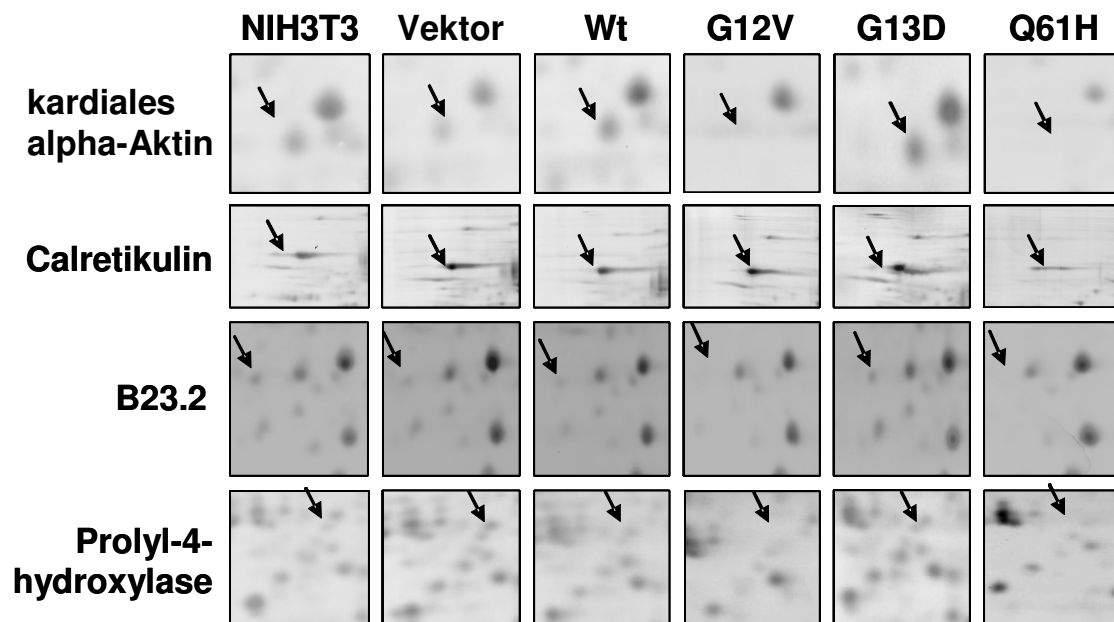


Abb. 3.20: Expressionsmuster ausgewählter Proteine in den verschiedenen Zelllinien. Dargestellt sind Ausschnitte aus den 2D-Gelen der einzelnen Zelllinie für kardiales alpha-Aktin, Calretikulin, B23.2 und Prolyl-4-hydroxylase.

Tabelle 3.4: Differentiell exprimierte Proteine im pH-Bereich 4-7.

Protein	Swiss-Prot/ NCBI-Nr.	pI/Mr	Score/ Sequenz- abdeckung	Regulation	Subzelluläre Lokalisation	Funktion
RHO-GDI 1	Q99PT1	5,12/23400	84/46 %	- Wt	Zytoplasma	Aktivitätsregulation der RHO- Proteine
Hsp86	P07901	4,93/39900	78/30 %	+ G13D, - Q61H	Zytoplasma, Melanosom	Chaperon
Hsp84	P11499	4,97/83300	48/23 %	- G12V, - Q61H	Zytoplasma, Melanosom	Chaperon
gp96	P08113	4,74/92500	65/20 %	- G12V, - Q61H	ER, Melanosom	Chaperon
Prolyl 4-hydroxylase	P09103	4,79/57000	90/37 %	- G12V, - Q61H	ER, Membran	Oxidoreduktase
Calretikulिन	NP_031617	4,33/48000	184/35 %	- Q61H	ER	Chaperon
Superoxiddismutase Cu/Zn	P08228	6,03/14000	87/45 %	- Wt, - Q61H	Zytoplasma	Oxidoreduktase
Disulfidisomerase	AAH06865	5,00/48100	87/41 %	- G13D	ER, Melanosom	Oxidoreduktase
Nukleophosmin 1	Q61937	4,62/32600	65/28 %	- G12V, - G13D, □- Q61H	Nukleus	assoziiert mit Ribonukleoproteinen
Tubulin-alpha 6	NP_033474	4,96/49900	n. b.*	- G12V, - Q61H	Zytoskelett	Mikrotubuliumaufbau
Kardiales alpha-Aktin	AAA37166	5,30/16800	60/37%	- G12V, - Q61H	Zytoplasma, Zytoskelett	Mikrotubuliumaufbau
F-actin capping protein beta	P47757	5,47/31200	213/41%	+ G12V	Zytoskelett	Bindung von Aktinfilamenten
ATP-Synthase	XP_122128	5,19/56300	164/37%	+ G12V, + Q61H	Mitochondrium	ATP-Synthase
Protease ATPase	NP_032973	5,87/49200	82/23%	- G12V, - Q61H	Zytoplasma	Teil des Proteasomkomplexes
Annexin II	Q35639	5,33/34000	63/35%	- Wt, - G12V, □- Q61H	Extrazelluläre Matrix	Phospholipase A2-inhibitor □
FK506-Bindeprotein4	P30416	5,54/51400	77/25%	+ Wt, + G13D	Nukleus, Zytoplasma	intrazellulärer Steroidrezeptortransport
Phospho-protein B23.2	XP_125539	4,92/17300	80/25%	- G12V, - Q61H	Nukleus	Chromatin-dekondensierendes Protein
Nukleäre RNA-Helikase	Q8VDW0	5,46/49100	n. b.*	+ G12V, + G13D	Nukleus	ATP-abhängige Helikase
Elongationsfaktor-1- delta	BAB 30841	5,31/20000	73/25%	- G12V, - Q61H	Zytoplasma	Proteinbiosynthese
zelluläres Retinsäure-Bindeprotein1	NP_038524	5,30/15500	114/63%	+ G12V, + Q61H	Zytoplasma	Retinsäurebindung und-transport
A1022641	A1022641	5,51/46400	71/26%	- G13D, - Q61H	ER	Thioredoxin-ähnliches Protein
BAB24792	BAB24792	5,56/32300	86/41%	- G12V, - Q61H	Zytoskelett	Mikrotubuliumaufbau

Aufgelistet sind die Datenbank-Zugangsnummer, Molekulargewicht (Mr) und isoelektrischer Punkt (pI), Regulation, subzelluläre Lokalisation sowie die Funktion des identifizierten Proteins.

3.4.2 Auftrennung der Proteine im pH-Bereich von 6-11

Eine Schwierigkeit stellt die isoelektrische Fokussierung von basischen Proteinen dar. Während der isoelektrischen Fokussierung wandert das reduzierende Agens DTT aus dem basischen pH-Bereich Richtung Anode (Hoving, S. *et al.*, 2002). Dies resultiert in einer schlechten Auflösung ab einem pH >7, da es zu einer Aggregation der Proteine mit alkalischem pI kommt. Die Analysentiefe, d. h. die Anzahl der im basischen pH-Bereich aufgelösten Proteine wurde daher durch eine Kombination aus der Anreicherung von basischen Proteinen (Gorg, A. *et al.*, 1998) und dem Einsatz von Hydroxyethylidisulfid (Olsson, I. *et al.*, 2002) bei der isoelektrischen Fokussierung verbessert. Wie aus den Proteinexpressionsmustern von K-*ras*-Transfektanten und Kontrollzellen in Abbildung 3.21 ersichtlich, konnte dadurch eine Auflösung über den kompletten pH-Gradienten erzielt werden.

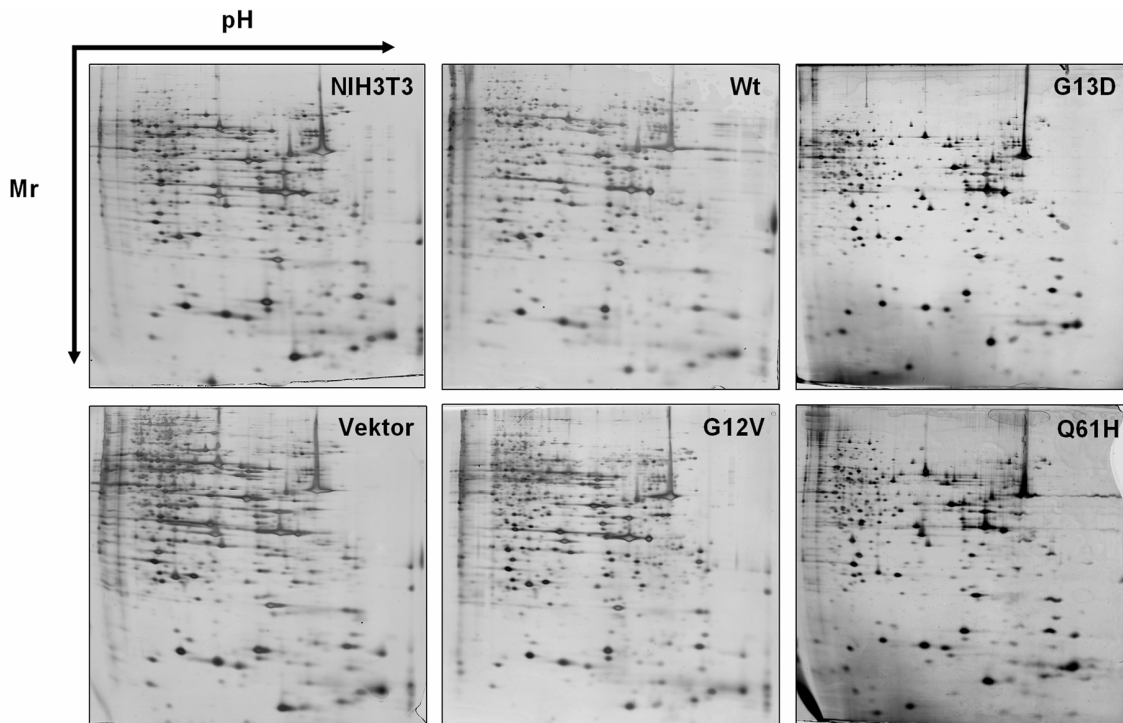


Abb. 3.21: Vergleich des Expressionsmusters der Zelllinien im pH-Bereich 6-11.

Nach TCA/Aceton-Präzipitation wurden die Proteine in modifiziertem Solubilisierungspuffer gelöst und durch anodische „Cup“-Beladung in zuvor rehydratisierte IPG-Streifen des pH-Bereichs 6-11 appliziert. Nach IEF wurden die Proteine in einem 13-%igen Acrylamidgel nach ihrer Größe separiert und die Proteine anschließend durch Silberfärbung visualisiert. Das Proteinexpressionsmuster der verschiedenen *ras*-transfizierten Zelllinien sowie der Leervektorkontrollzelllinie wurde analog zu den Analysen in Kapitel 3.4.1 mit dem der Parentalzelllinie NIH3T3 mit Hilfe des Programms Proteomweaver verglichen.

Wie in Abbildung 3.22 repräsentativ für die Überlagerung des Proteinexpressionsmusters der Parentalzelllinie und der K-RAS-Transformanten G12V gezeigt, konnten mit diesem Ansatz mehrere differentiell exprimierter Proteinspots detektiert werden. Die Anzahl der differentiell exprimierten Gene betrug in den verschiedenen Zelllinien zwischen 38 und 42 mit größtenteils ähnlicher Regulation. Die selektierten Zielproteine wurden über MALDI-TOF-MS-Analysen mit darauffolgender Datenbanksuche identifiziert. Die Lokalisation einiger dieser Proteine ist in Abbildung 3.22 hervorgehoben.

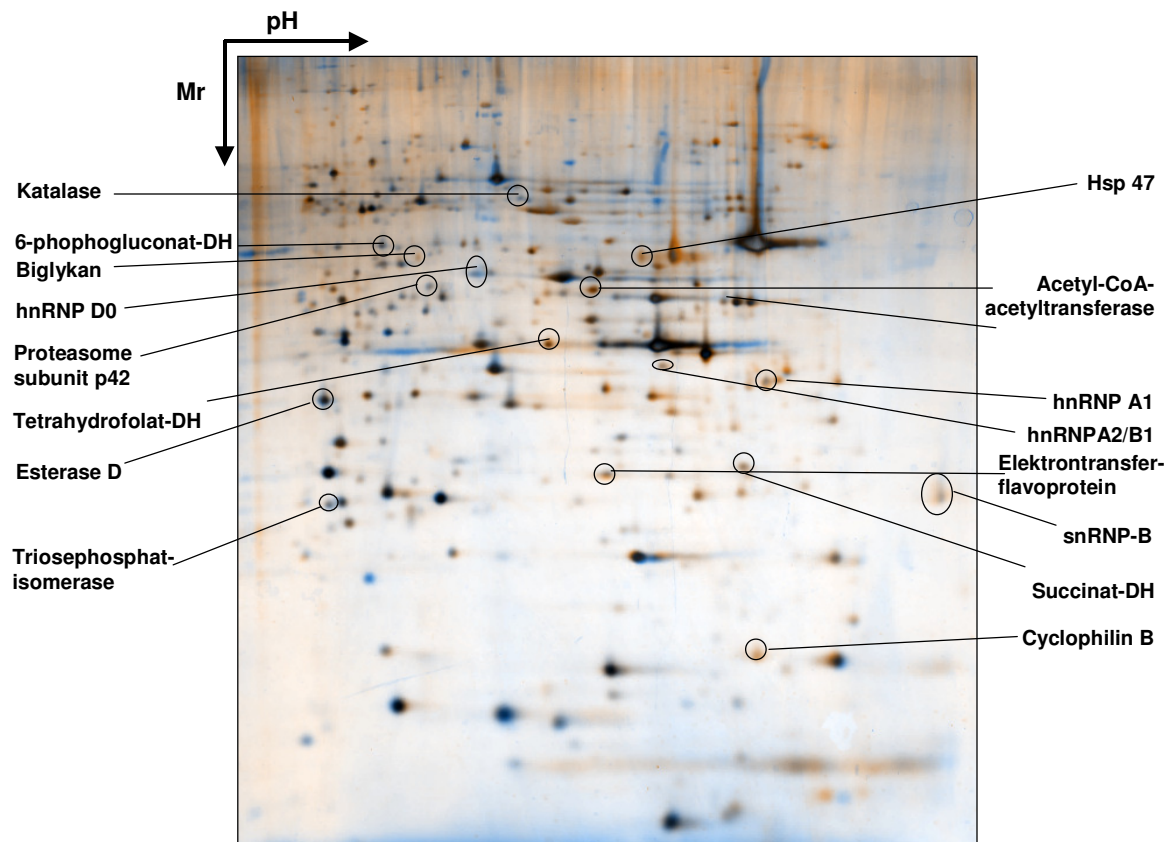


Abb. 3.22: Repräsentativer Vergleich des Proteoms von NIH3T3-Zellen und der Onkogen-transformierten Zelllinie G12V im pH-Bereich von 6-11.

Die beiden Zelllinien wurden bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Nach der Anreicherung der alkalischen Proteinfraktion wurden die Proteine mit anodischer „Cup“-Beladung in den IPG-Streifen appliziert, fokussiert und nach dem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert und die Proteinmuster durch das Programm Proteomweaver (Version 3.1) miteinander verglichen. Das Bild zeigt die Übereinanderlagerung der beiden Expressionsprofile. Gleich stark exprimierte Proteine sind schwarz dargestellt. Braun gefärbte Proteine werden in der Zelllinie G12V nicht oder in deutlich geringerem Maße exprimiert als in der Parentalzelllinie, während für blau eingefärbte Proteine die umgekehrte Situation vorliegt. Die Lage differentiell exprimierter Proteine wurde hervorgehoben.

Der Peptid-Massen-Fingerabdruck (PMF) des Proteins hnRNP A2/B1 ist in Abbildung 3.23 exemplarisch dargestellt. In diesem Fall führte die Analyse der erhaltenen m/z-Werte mit der MASCOT-Suchmaschine bei einer Sequenzabdeckung von 45 % zur Identifikation des heterogenen Ribonukleoproteins A2/B1.

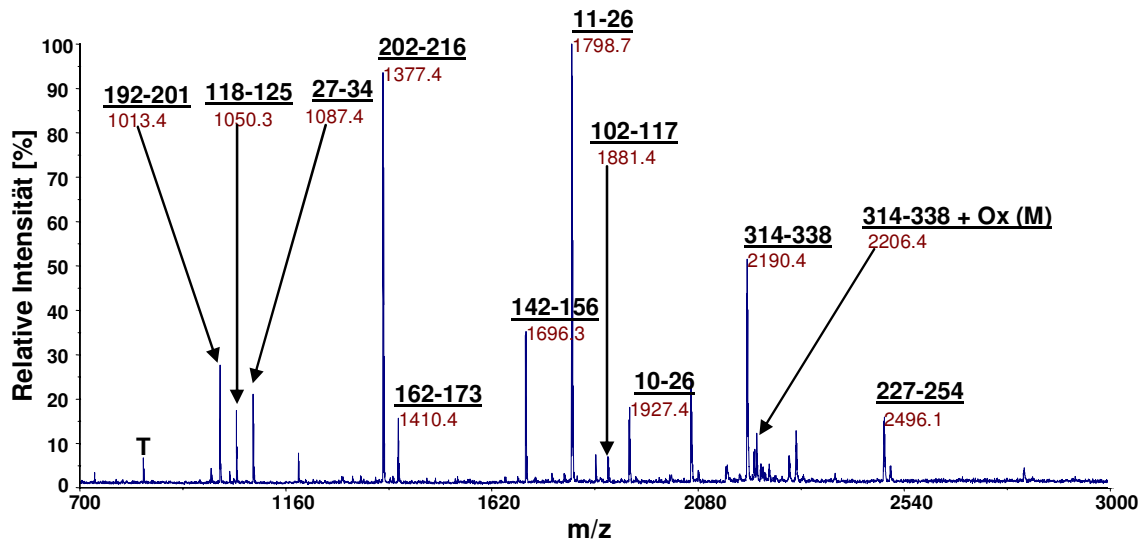


Abb. 3.23: PMF-Analyse von hnRNP A2/B1.

Das Diagramm zeigt das annotierte Massenspektrum der tryptischen Peptide von hnRNP A2/B1. Nach der 2-DE wurde der korrespondierende Proteinspot aus dem 2D-Gel ausgeschnitten und mit Trypsin hydrolysiert. Die resultierenden Peptide wurden extrahiert und mit Matrix kokristallisiert. Die der Proteinsequenz zugeordneten Peptide sind mit ihren m/z-Werten und der korrespondierenden Aminosäuresequenz gekennzeichnet. T, Trypsin-Autolysis-Peptid; Ox (M), oxidierter Methioninrest.

Insgesamt konnte durch die MS-Analysen ein Satz von 29 unterschiedlich exprimierten Proteinen im alkalischen pH-Bereich identifiziert werden. Die Regulationsfaktoren sind zusammen mit der Standardabweichung sowie der statistischen Analyse mittels t-Test im Anhang in Tabelle B aufgelistet. Die Funktion der differentiell exprimierten Proteine ist in Tab. 3.5 zusammen mit ihrem SwissProt-Datenbank-Eintrag, der Sequenzabdeckung, dem MASCOT-Score und der subzellulären Lokalisation zusammengefasst. Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, stellen Proteine aus Kern und Mitochondrien einen Großteil der identifizierten, differentiell exprimierten Gene. Der Großteil der differentiell exprimierten Proteine dieses pH-Bereichs übernimmt wichtige Aufgaben im Metabolismus und bei der Regulation der Genexpression.

Ergebnisse

Tabelle 3.5: Eigenschaften der identifizierten differentiell exprimierten Proteine im Bereich von pH 6-11.

Protein	SwissProt-Nr.	pI/Mr	Score/ Sequenz- abdeckung	Regulation	Subzelluläre Lokalisation	Funktion
Esterase D	Q9CWI4	6,70/31300	97/58%	+ G12V, G13D, Q61H	Zytoplasma	Formaldehyd Metabolismus
Katalase	P24270	7,72/59800	92/32%	+ Wt, G12V, G13D	Peroxisom	ROS Entgiftung
Biglykan	P28653	6,83/41600	76/27%	- G12V, G13D, Q61H	Extrazelluläre Matrix	Assemblierung von Kollagenfasern
Hsp 47	Q8BV87	8,88/46500	2,13/42%	- G12V, G13D, Q61H	ER	Kollageninteraktion
Cyclophilin B	P24369	9,48/22700	66/54%	- G12V, G13D, Q61H	ER, Melanosom	cis-trans Isomerisierung von Peptiden
hnRNP A1	P49312	9,27/34200	56/28%	- G12V, Q61H + Wt	Nukleus, Zytoplasma	prä-mRNS-Pozessierung
hnRNP A2/B1	Q91ZFR9	8,97/37400	103/45%	+ Wt	Nukleus	prä-mRNS-Pozessierung
hnRNP D0	Q60668-03	7,61/38400	69/30%	+ Wt, G12V	Nukleus	Bindung von RNS mit ARE-Motiven
hnRNP I	Q8BGJ5	9,22/56900	2,06/36%	- Wt, G12V, G13D, Q61H	Nukleus	mRNS-Pozessierung, Spleißen
hnRNP L	Q8R081	6,65/60100	78/22%	+ Wt	Nukleus	prä-mRNS-Pozessierung
Spleißfaktor 3A Untereinheit 2	Q62203	9,55/50000	57/23%	- G12V, G13D, Q61H	Nukleus	prä-mRNS-Pozessierung
snRNP-B	P27048	10,91/23800	82/25%	- G12V, G13D, Q61H	Nukleus	prä-mRNS-Pozessierung
FUSE-Bindprotein 1	Q91WJ8	7,73/68500	2,02/27%	+ G13D	Nukleus	Regulation der <i>myc</i> -Expression
Tetrahydrofolat-DH/cyclohydrolase	P18155	8,98/37900	62/53%	- Wt, G12V, G13D, Q61H	Mitochondrium	Vitamin B9-Stoffwechsel
Transaminase A	P05202	9,13/47400	54/38%	+ G12V	Mitochondrium	Aminosäurestoffwechsel
Elektronen transfer flavoprotein, beta	Q9DCW4	8,25/27600	69/45%	- G12V, Q61H + Wt	Mitochondrium	Elektronenakzeptor von Dehydrogenasen
Aconitase 2	Q99KI0	8,08/85500	74/23%	- G12V	Mitochondrium	Trikarbonsäurezyklus
Succinat-DH	Q9CQA3	8,96/32600	59/31%	- Wt, G13D, Q61H	Mitochondrium	Trikarbonsäurezyklus
Citratsynthase	BAB63945	8,72/51700	96/24%	+ Wt	Mitochondrium	Trikarbonsäurezyklus
Fumarase	P97807	9,12/54600	45/19%	- G13D, Q61H	Mitochondrium	Trikarbonsäurezyklus
Acety-CoA-acetyltransferase	Q8QZT1	8,71/44800	87/43%	- G12V, G13D, Q61H	Mitochondrium	Ketorkörpermetabolismus
6-P-gluconate-DH	Q9DCD0	6,81/53200	54/21%	+ G12V, G13D, Q61H	Zytoplasma	Pentosephosphatweg
Triosephosphat-isomerase	P17751	6,90/26700	50/26%	+ G12V, G13D	Zytoplasma	Glykolyse
Pyruvatkinase M2	P52480	7,19/58400	65/16%	+ G12V, G13D, Q61H	Zytoplasma	Glykolyse
Elongationsfaktor-1-alpha	P10126	9,10/50100	54/17%	- G12V, Q61H	Zytoplasma	Proteinbiosynthese
Calcylin-Bindprotein	Q9CXW3	7,64/26500	59/62%	+ Wt, Q61H	Nukleus, Zytoplasma	Kalzium-abhängige Ubiquitinierung
Proteasomuntereinheit p42	P62334	7,09/44200	108/59%	+ Wt, G12V, Q61H	Nukleus, Zytoplasma	Degradation ubiquitinerter Proteine
Annexin I	P10107	6,97/38700	63/32%	+ G12V, Q61H	Nukleus, Zytoplasma	Regulation der Phospholipase A2 Aktivität
Rab-35	Q6PHN9	8,52/23300	66/46%	- Wt, G12V, G13D, Q61H	Membran, Melanosom	GTPase

Aufgelistet sind die Datenbank-Zugangsnummer, Molekulargewicht (Mr) und isoelektrischer Punkt (pI), Regulation, subzelluläre Lokalisation sowie die Funktion des identifizierten Proteins.

3.4.3 Validierung differentiell exprimierter Proteine

Zur Validierung des Einflusses von K-RAS auf das veränderte Expressionsprofil der identifizierten Proteine wurden diese mittels quantitativer RT-PCR- und/oder Western Blot-Analysen evaluiert.

Wie in Abbildung 3.24 exemplarisch für acht identifizierte differentiell exprimierte Proteine gezeigt, konnte die Bestimmung des mRNS-Transkriptniveaus die Ergebnisse der Proteomanalyse für das Expressionsverhalten der meisten Zielgene bestätigen. So war die Biglykan-Transkriptmenge bei allen K-*ras*-Transfektanten durchschnittlich auf 50 % des Niveaus der Parentalzelllinie bzw. der Leervektorkontrolle erniedrigt. Die Mindereexpression in der Zelllinie Wt weicht dabei von den mit der 2-DE erzielten Ergebnissen ab. Hier liegt möglicherweise eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene vor.

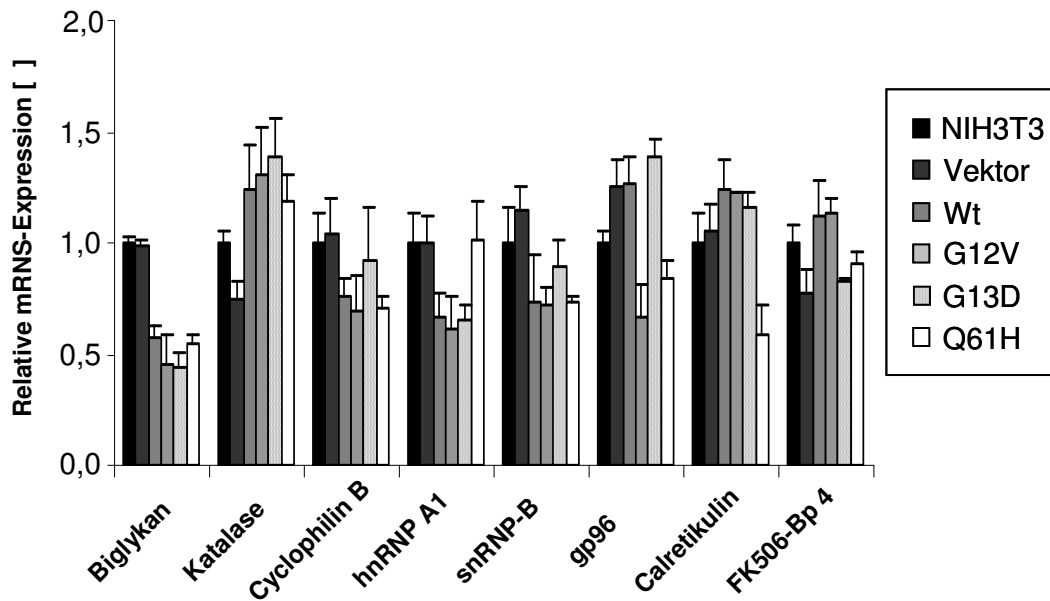


Abb. 3.24: Validierung differentiell exprimierter Gene mittels quantitativer RT-PCR.

Gleiche Mengen Gesamt-RNS der einzelnen Zelllinien wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, revers transkribiert und die cDNS der verschiedenen Zielkomponenten mit spezifischen Oligonukleotidpaaren (siehe Anhang) amplifiziert. Die mRNS-Spiegel wurden gegen den jeweiligen β -Aktin-Spiegel normalisiert. Das Expressionsniveau in der Parentalzelllinie wurde auf 1 gesetzt. Das Diagramm repräsentiert Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

Allgemein kann festgehalten werden, dass die Unterschiede zwischen Kontrollzelllinien und Transfektanten auf Transkriptionsebene nicht so deutlich waren wie auf Proteinebene. Dafür sind vermutlich verschiedene Faktoren, wie die Stabilität der mRNS und/oder posttranskriptionelle bzw. -translationelle Regulationen verantwortlich. Das Expressionsniveau wurde bei der Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern zusätzlich über Western Blot-Analysen validiert. Wie aus Abbildung 3.25 hervorgeht, unterstützt die Immunfärbung in den meisten Fällen die Ergebnisse aus den 2-DE-Experimenten. Allerdings war bei diesen Analysen in der Zelllinie Q61H die stärkste Heraufregulation der Katalase-Expression aller *K-ras*-Transfektanten zu beobachten, während in der Proteomanalyse eine nicht-signifikante Hochregulation in den Q61H-Zellen detektiert wurde.

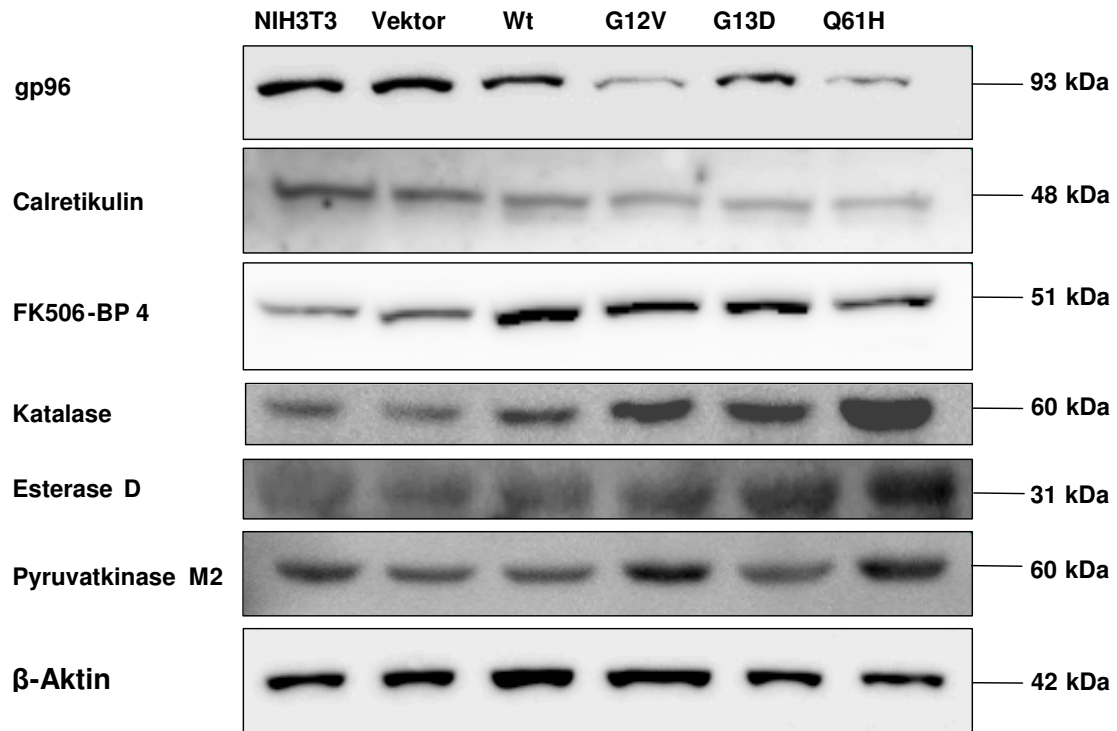


Abb. 3.25: Validierung differentiell exprimierter Gene mittels Immunoblot-Analysen. Gleiche Proteinmengen aus Gesamtzelllysaten wurden mit Antikörpern gegen gp96, Calretikulin, FK506-Bp, Katalase, Esterase D und Pyruvatkinase M2 analysiert. Die Immunfärbung gegen β -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.5 Funktionelle Analyse differentiell exprimierter Gene

Die Identifizierung der durch K-RAS in ihrer Expression deregulierten Gene führte zu folgenden Fragestellungen:

Hat die modulierte Expression mehrerer Oxidoreduktasen einen Einfluss auf die Redoxhomöostase in den Onkogen-transformierten Zellen?

Resultiert die erhöhte Esterase D-Expression in einer verstärkten Toleranz der K-RAS-Transformanten gegenüber Formaldehyd?

Diese Hypothesen wurden mittels funktioneller Experimentalansätze, wie Zytotoxizitäts- und Proliferationsanalysen überprüft.

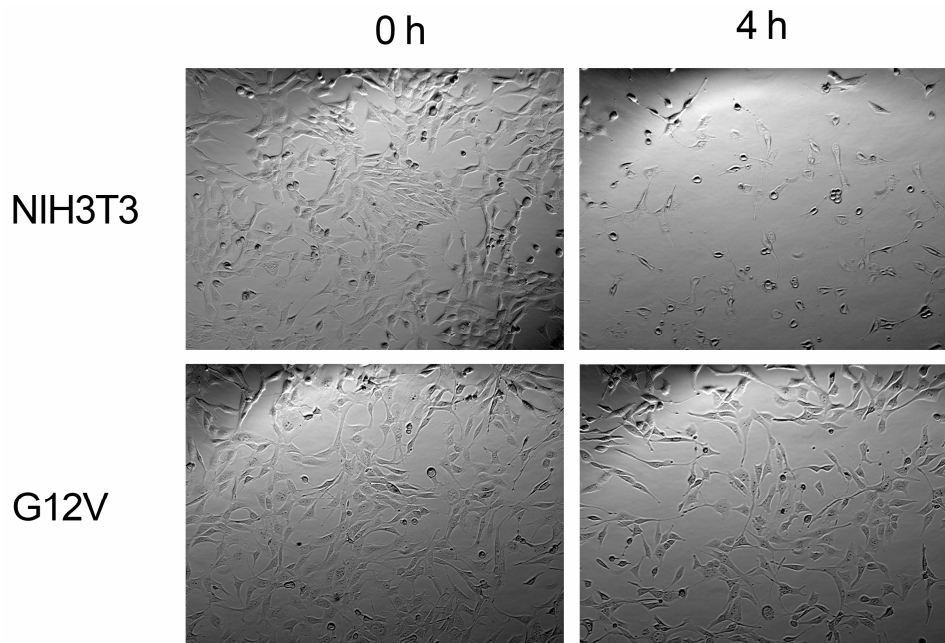
3.5.1 Toleranz K-RAS-transformierter Zellen gegen reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Die Heraufregulation der Katalase sowie die verstärkte Expression von 6-phosphogluconat-Dehydrogenase, die auf eine verstärkte Aktivität des Pentosephosphatzyklus und damit auf eine verstärkte Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten hindeuten, führten zu der Hypothese, dass die Onkogen-transformierten Zelllinien eine erhöhte Resistenz gegenüber ROS besitzen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde der Einfluss verschiedener Wasserstoffperoxidkonzentrationen auf das Überleben von *K-ras*-Transfektanten und Kontrollzellen analysiert. Wie in Abbildung 3.26A repräsentativ für die parentalen NIH3T3- und G12V-Zellen dargestellt, zeigten die mikroskopischen Aufnahmen einen verstärkten Zelltod in den Kontrollzelllinien NIH3T3 und Leervektor sowie der wildtypisches *K-ras*-überexprimierenden Zelllinie Wt und der onkogenes *K-ras*-überexprimierenden Zelllinie Q61H. Dagegen waren die auf Zelltod hindeutenden morphologischen Veränderungen in den Zelllinien G12V und G13D geringer ausgeprägt.

Die unterschiedliche Toleranz gegen ROS spiegelt sich auch in Vitalitätsanalysen wider. Wie aus Abbildung 3.26B hervorgeht, bedingt Wasserstoffperoxid eine dosisabhängige Zelllyse in den verschiedenen Zelllinien. Die Zelllinien G12V und G13D tolerierten höhere Konzentrationen an H₂O₂ im Vergleich zu den Kontrollzelllinien. So betrug die LD50-Dosis für Leervektor- und Wt-Zellen etwa 35 µM H₂O₂ nach sieben Stunden, während die Vitalität der Zelllinien G12V und G13D bei dieser Konzentration nur in einem geringen Maße beeinträchtigt wurde.

Überraschenderweise reagierte die mit mutiertem *K-ras*-transfizierte Zelllinie Q61H ähnlich wie die mit dem Leervektor transfizierten Fibroblasten gegen den durch H_2O_2 -induzierten oxidativen Stress.

A)



B)

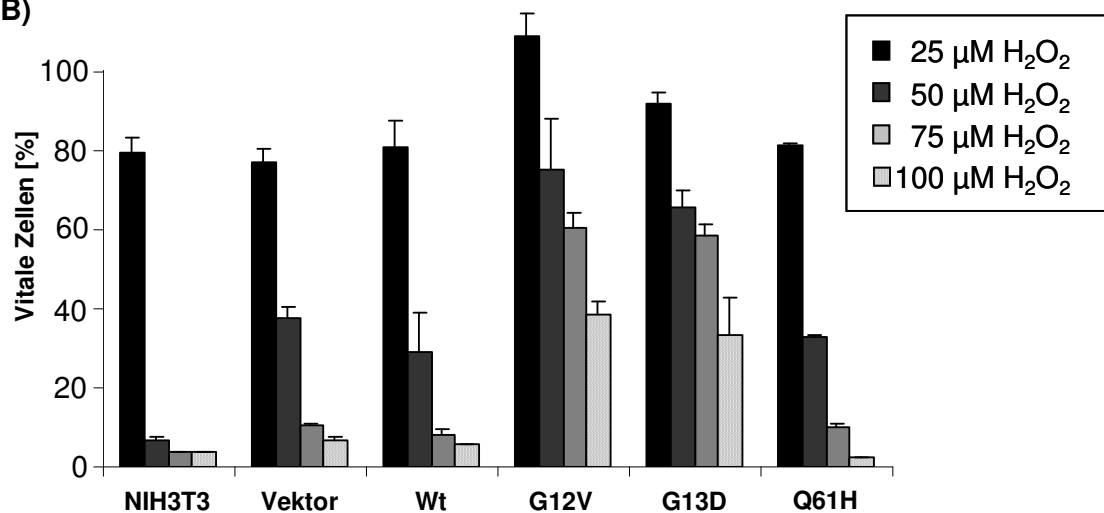


Abb. 3.26: Analyse des zytotoxischen Einflusses von Wasserstoffperoxid als ROS-Modellsubstanz auf *ras*-Transfektanten und Kontrollzellen.

A) Morphologische Analyse nach Behandlung mit H_2O_2 . NIH3T3 und G12V-Zellen wurden mit 100 μM H_2O_2 behandelt und die Zellmorphologie nach 0 und 4 Stunden unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 100-facher Vergrößerung analysiert.

B) Zytotoxizitätsanalyse nach Behandlung mit H_2O_2 . 5×10^3 Zellen einer jeden Zelllinie wurden in Triplikaten in 96-Lochplatten ausgesät. Nach 12 Stunden wurde jede Zelllinie in parallelen Ansätzen mit 0, 25, 50, 75 bzw. 100 μM H_2O_2 inkubiert. Nach sieben Stunden erfolgte die Bestimmung des prozentualen Anteils vitaler Zellen kolorimetrisch durch den Umsatz des Tetrazoliumsalzes XTT. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Der Effekt der H_2O_2 -Behandlung auf das Proliferationsverhalten wurde durch den Umsatz des Tetrazoliumsalzes XTT kolorimetrisch verfolgt. Wie aus Abbildung 3.27 für den Vergleich von NIH3T3-Zellen mit der Onkogen-transformierten Zelllinie G12V hervorgeht, wies die Parentalzelllinie bei einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ H_2O_2 eine um 24 Stunden verlängerte „lag“-Phase und zeigte reprimiertes Wachstum. Die Proliferation der G12V-Zellen war nicht signifikant beeinträchtigt.

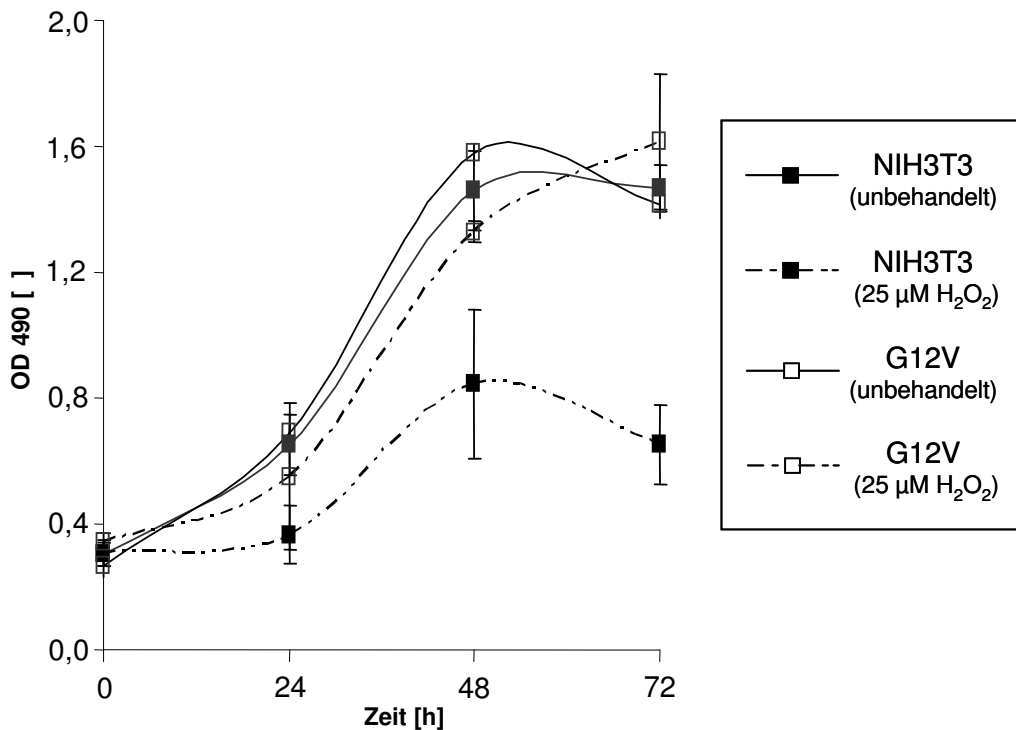


Abb. 3.27: Proliferationsanalyse unter H_2O_2 -induziertem Stress.

$2,5 \times 10^3$ Zellen wurden in $100 \mu\text{l}$ Medium in Triplikaten auf 96-Lochplatten ausgesät. Nach 12 Stunden wurden jeweils $100 \mu\text{l}$ Medium, das mit oder ohne $50 \mu\text{M}$ Wasserstoffperoxid supplementiert war, hinzugefügt. Nach jeweils 24 Stunden wurde die Proliferation durch den Umsatz des Tetrazoliumsalzes XTT zu Formazan auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 490 nm bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Um zu überprüfen, ob die verstärkte Katalase-Expression an der RAS-induzierten ROS-Resistenz beteiligt ist, wurde die Toleranz der einzelnen Zelllinien gegen H_2O_2 nach selektiver Supprimierung der Katalase-Expression durch RNA-Interferenz analysiert. Wie in Abbildung 3.28 gezeigt, führte die Verringerung der Katalaseexpression in den Zelllinien G12V und G13D zu einer signifikanten Steigerung der Zytotoxizität. Nach Stilllegung der Katalase-Expression war der zytotoxische Einfluss in den Zelllinien G12V und G13D um das sieben- bzw. zweifache gesteigert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Heraufregulation der Katalase-Expression einen potentiellen Mechanismus für die ROS-Toleranz K-RAS-transformierter Zellen darstellt.

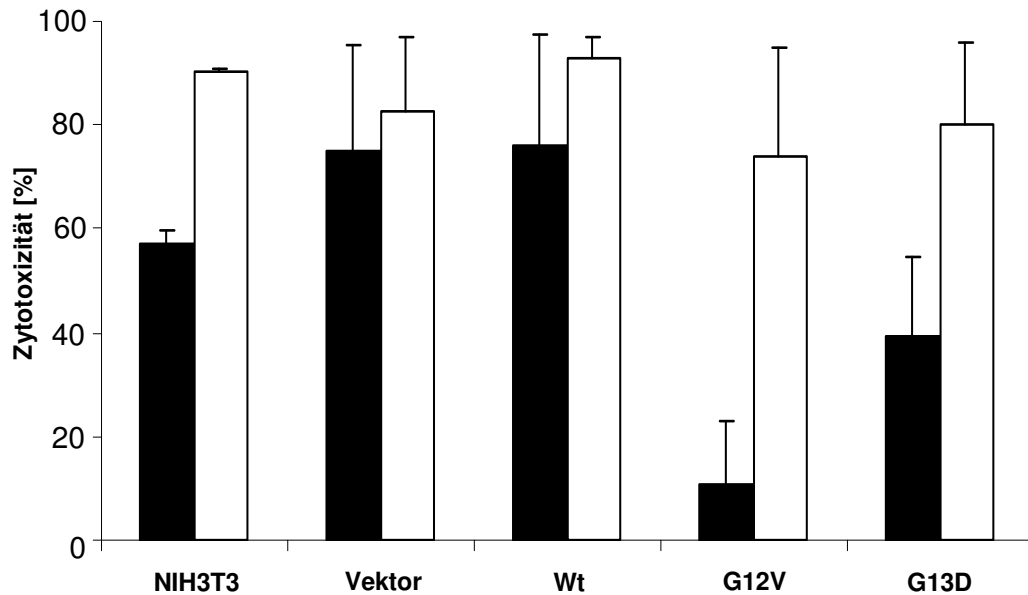


Abb. 3.28: Zytotoxizitätsanalyse nach Supprimierung der Katalase-Expression durch RNA-Interferenz.

Die Zelllinien wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit siRNS transfiziert und anschließend die Zytotoxizität analog zu Abbildung 3.26B bestimmt. *Schwarze Säulen*: Zytotoxizität nach Transfektion mit unspezifischer siRNS; *Weißer Säulen*: Zytotoxizität nach Transfektion mit Katalase-spezifischer siRNS. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

3.5.2 Analyse des intrazellulären Glutathionspiegels

Die Resistenz der Zelllinien Wt, G12V und G13D gegenüber ROS führte zu der Frage, ob dieser Effekt allein auf eine verstärkte Expression von Redoxenzymen, wie z. B. Katalase und/oder durch einen erhöhten Spiegel an Reduktionsäquivalenten in diesen Zelllinien zurückzuführen sei. Ein Schlüsselindikator für das Redoxgleichgewicht einer Zelle ist der intrazelluläre Glutathionspiegel (Griffith, O. W., 1999). Daher wurde die Glutathionstoffmenge der verschiedenen Zelllinien bestimmt und gegen die Gesamtproteinmenge normalisiert. Wie Abbildung 3.29 zeigt, war die Glutathionkonzentration in den K-ras-transfizierten Zelllinien signifikant erhöht. In der Parentalzelllinie und der Leervektorkontrolle betrug er 25 ± 6 bzw. 29 ± 6 nmol Glutathion/mg Protein. Die mit wt-K-ras-transfizierten Fibroblasten zeigten mit 62 ± 5 nmol Glutathion/mg Protein ungefähr eine Verdopplung der intrazellulären Glutathionmenge, während in den Onkogen-exprimierenden Zelllinien G12V, G13D und Q61H Glutathionstoffmengen von 85 ± 10 , 122 ± 34 bzw. 78 ± 4 nmol/mg Protein detektiert wurden. Damit war der Glutathionspiegel in den Onkogen-transformierten Fibroblasten um mehr als das 2,5-fache im Vergleich zu den Kontrollzelllinien erhöht.

Dieses Ergebnis legt eine Glutathion-abhängige Detoxifikation von ROS und xenobiotischen Substanzen nahe.

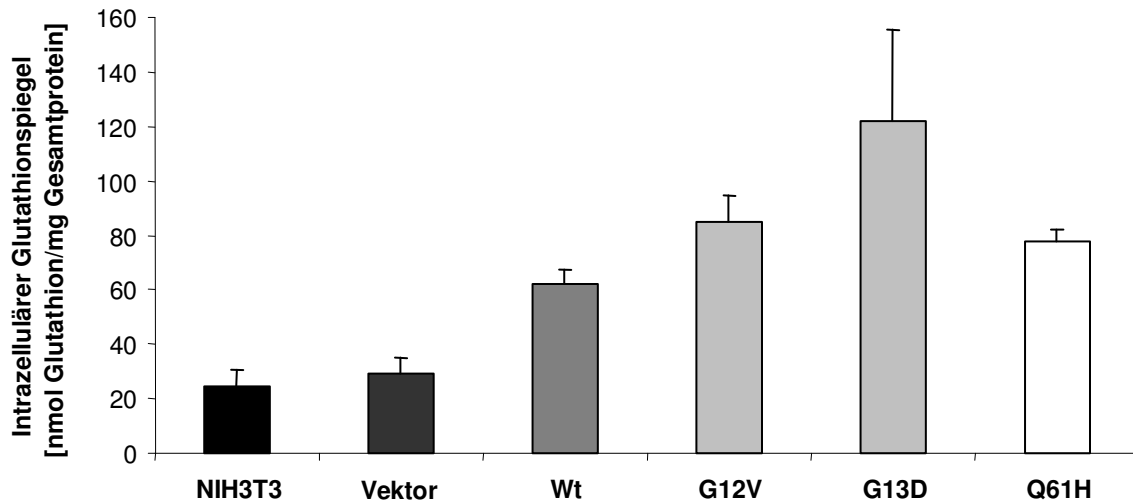


Abb. 3.29: Analyse des Glutathionspiegels der verschiedenen Zelllinien.

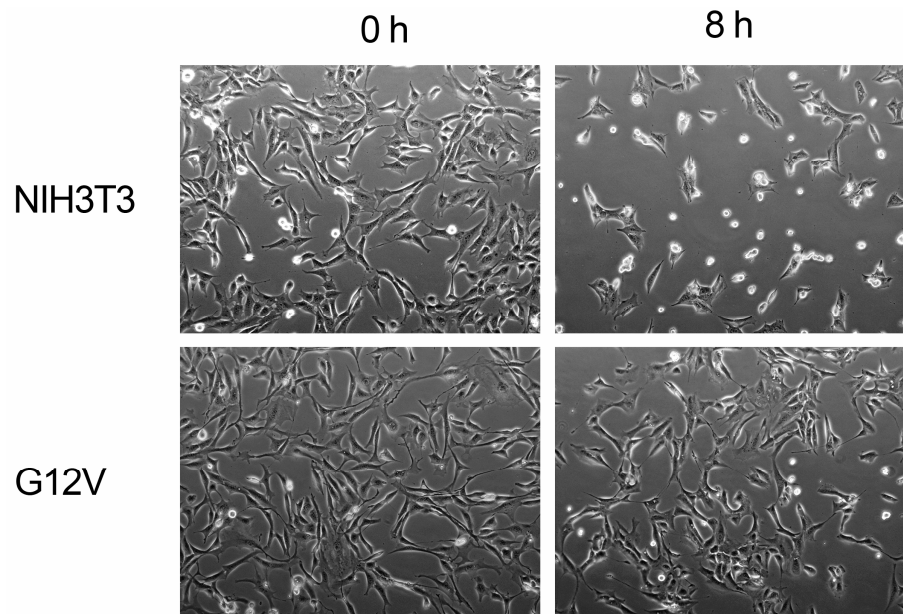
2×10^6 Zellen der einzelnen K-ras-Transfektanten und Kontrollzelllinien wurden pro Petrischale ausgesät und der intrazelluläre Glutathionspiegel nach 48 Stunden, wie im Kapitel Material und Methoden angegeben, bestimmt und auf die Gesamtproteinmenge normalisiert. Aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Der intrazelluläre Glutathionspiegel ist als die Stoffmenge Glutathion/mg zelluläres Protein ausgedrückt.

3.5.3 Resistenz K-RAS-transformierter Zellen gegen Formaldehyd

Der erhöhte Glutathionspiegel und die verstärkte Expression der S-formyl-glutathionhydrolase (Esterase D) in den Zelllinien G12V, G13D und Q61H führten zu der Frage, ob K-RAS in diesen Transfektanten Formaldehydresistenzmechanismen aktiviert. Daher wurden die verschiedenen Zelllinien analog zu den Untersuchungen zum Einfluss von ROS mit verschiedenen Formaldehydkonzentrationen behandelt. In Abbildung 3.30A ist der Einfluss einer Formaldehydkonzentration von 200 μ M auf die Zellintegrität von Kontrollzellen und K-RAS-transformierten Zellen exemplarisch am Vergleich von NIH3T3- und G12V-Zellen durch mikroskopische Aufnahmen dokumentiert. Der beobachtete verstärkte Zelltod in der Parentalzelllinie wurde durch Vitalitätsanalysen weiter spezifiziert. Wie Abbildung 3.30B darstellt, zeigten NIH3T3- und Leervektor-Kontrollzellen bei geringeren Konzentrationen einen verstärkten Zelltod. So verursachte eine Konzentration von 50 μ M Formaldehyd nach 7 Stunden eine Zellyserate von ca. 25 % in NIH3T3- und Leervektor-Fibroblasten, während die Vitalität der G12V- und G13D-Zellen nicht signifikant beeinflusst wurde. Eine erhöhte Toleranz gegenüber diesem Xenobiotikum konnte in den Zelllinien Wt und Q61H im

Vergleich zu den Kontrollzellen ermittelt werden. Jedoch verhielten sich diese Zellen sensitiver gegen Formaldehyd als G12V- und G13D-Zellen.

A)



B)

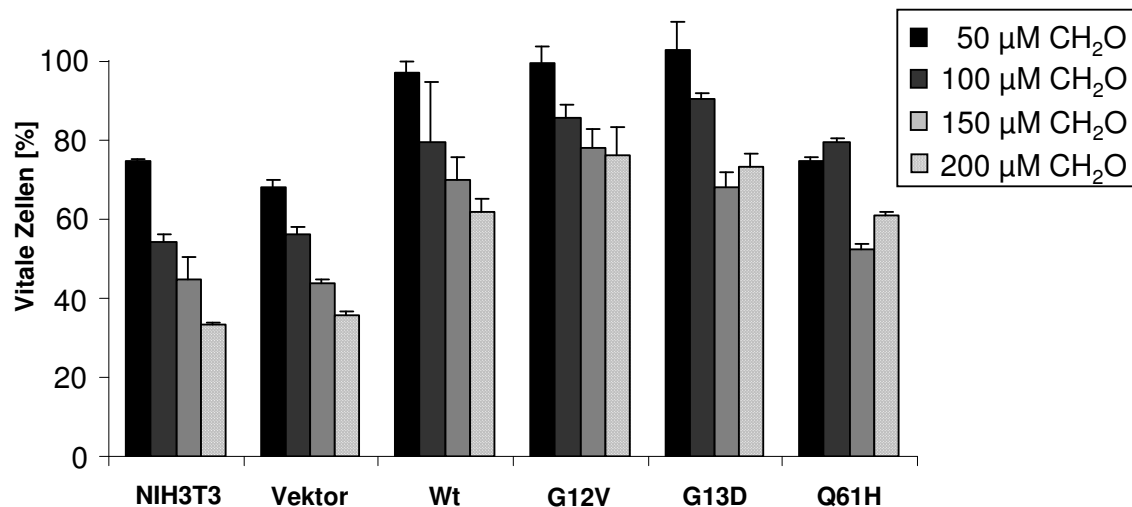


Abb. 3.30: Analyse des zytotoxischen Einflusses von Formaldehyd auf *ras*-Transfektanten und Kontrollzellen.

A) Morphologische Analyse nach Behandlung mit Formaldehyd. NIH3T3 und G12V-Zellen wurden mit 200 µM Formaldehyd behandelt und die Zellmorphologie nach 0 und 8 Stunden unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 100-facher Vergrößerung analysiert.

B) Zytotoxizitätsanalyse nach Behandlung mit Formaldehyd. 5×10^3 Zellen wurden in Triplikaten in 96-Lochplatten ausgesät. Nach 12 Stunden wurde jede Zelllinie in einem Versuchsansatz mit unterschiedlichen Formaldehydkonzentrationen behandelt. Nach sieben Stunden erfolgte die Bestimmung des Anteils vitaler Zellen durch die XTT-Konversion. Der Graph zeigt den Einfluss der unterschiedlichen Formaldehydkonzentrationen auf die Vitalität der einzelnen Zelllinien. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

Des Weiteren wurde neben der Dosisabhängigkeit die Wirkung von Formaldehyd auf das Proliferationsverhalten untersucht. Wie Abbildung 3.31 für den Vergleich der Zelllinie G12V mit den parentalen Fibroblasten zeigt, war der Übergang von „lag“- zur logarithmischen Wachstumsphase in den NIH3T3-Zellen bei einer Konzentration von 50 μM Formaldehyd um 24 Stunden verzögert.

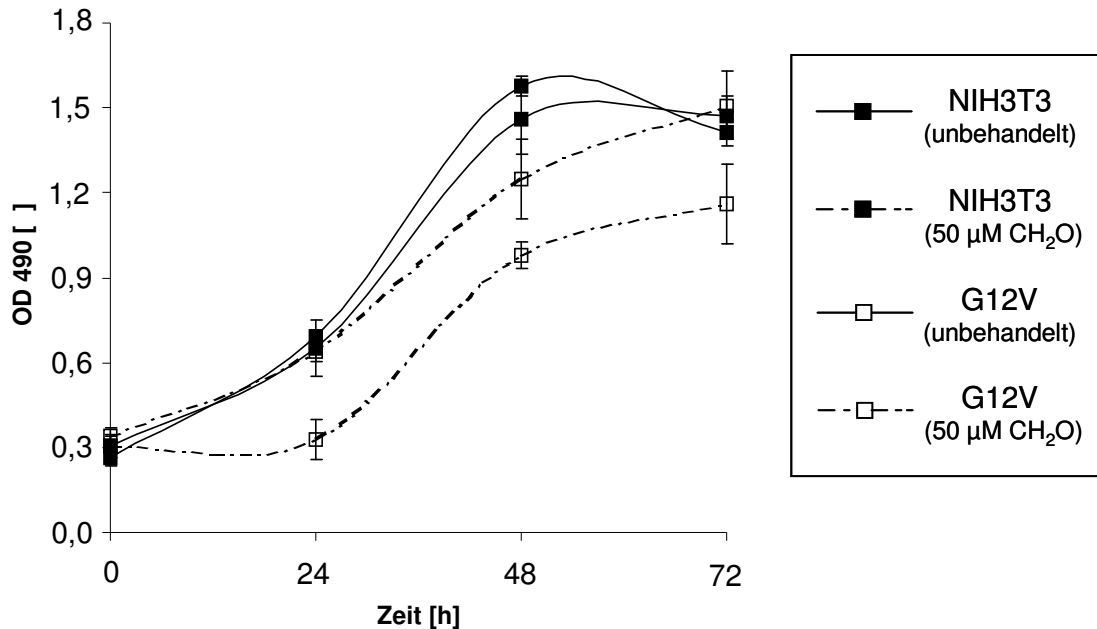


Abb. 3.31: Proliferationsanalyse unter Formaldehyd-induziertem Stress.

$2,5 \times 10^3$ Zellen wurden in Triplikaten in je 100 μl Medium auf 96-Lochplatten ausgesät. Nach 12 Stunden wurden jeweils 100 μl Medium, das mit 100 μM Formaldehyd supplementiert war, hinzugefügt. Zur Kontrolle wurde einem weiteren Ansatz 100 μl Medium hinzugefügt. Nach jeweils 24 Stunden wurde die Proliferation durch den Umsatz des Tetrazoliums Salzes XTT zu Formazan mit einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 490 nm bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

In welchem Umfang die erhöhte Formaldehydresistenz der Onkogenen Transformanten tatsächlich auf die vermehrte Esterase D-Konzentration zurückzuführen sei, wurde mittels RNS-Interferenzstudien analysiert. Dazu wurde nach siRNS-induzierter Supprimierung der Esterase D-Expression der Einfluss von 200 μM Formaldehyd auf das Toleranzniveau der einzelnen Zelllinien durch Zytotoxizitätsanalysen bestimmt. Wie aus Abbildung 3.32 hervorgeht, führte die Verringerung der Esterase D-Expression im Vergleich zu den mit unspezifischer siRNS durchgeführten Kontrollen zu einem signifikanten Anstieg der Zytotoxizität in den G12V- und G13D-Transformanten. Dagegen war in den mit Esterase D-siRNS-transfizierten Wt-Zellen relativ zur Kontrolle keine Sensitivitätssteigerung gegenüber

Formaldehyd zu beobachten. In diesem Experiment war die Formaldehyd-induzierte Zytotoxizität in den mit Esterase D-siRNS-transfizierten G12V- und G13D-Zellen und den mit unspezifischer siRNS transfizierten Kontrollzelllinien vergleichbar. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die beiden onkogenen K-RAS-Varianten die verstärkte Formaldehydtoleranz durch die Hochregulation der Esterase D-Expression induzieren.

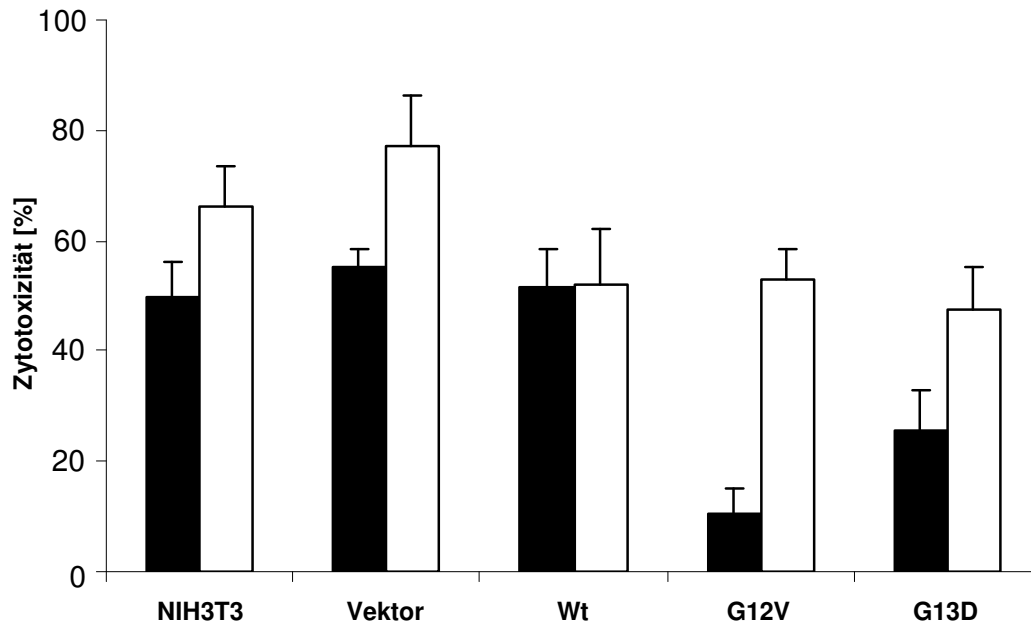


Abb. 3.32: Zytotoxizitätsanalyse nach Supprimierung der Esterase D-Expression durch RNS-Interferenz.

Die Zelllinien wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit siRNS transfiziert und anschließend die Zytotoxizität analog zu Abbildung 3.30B bestimmt. *Schwarze Säulen:* Zytotoxizität nach Transfektion mit unspezifischer siRNS; *Weißer Säulen:* Zytotoxizität nach Transfektion mit Esterase D-spezifischer siRNS. Im Diagramm sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

3.5.4 Onkogene K-ras-Expression vermittelt Resistenz gegen H₂O₂-induzierte Apoptose

Der oxidative Stress bzw. die Xenobiotikabehandlung können Apoptose induzieren. Daher wurden die verschiedenen Zelllinien analog zu den Zytotoxizitätsanalysen behandelt bzw. unbehandelt kultiviert. Anschließend wurde die Aktivität der Effektorcaspasen 3 bzw. 7 durch die Abspaltung des Tetrapeptids DEVD von einem profluoreszenten Rhodaminsubstrat bestimmt.

Wie aus Abbildung 3.33 hervorgeht, zeigten die Parentalzelllinie, Leervektorkontrolle und die wt-K-ras-überexprimierende Zelllinie nach der Behandlung mit 100 µM H₂O₂

im Vergleich zu den onkogenen Transformanten eine signifikant erhöhte Caspase 3/7-Aktivität. So war die Aktivität der beiden Effektorcaspasen der NIH3T3-Zellen etwa um den Faktor 11 im Vergleich zu unbehandelten NIH3T3-Zellen erhöht. Für die Leervektor- und Wt-Zelllinien wurde eine ca. 8-fach erhöhte Enzymaktivität detektiert. Dagegen zeigten die mit onkogenem K-*ras*-transfizierten Zelllinien eine zwei- bis dreifache Steigerung der Caspaseaktivität. Dies bedeutet eine ca. 2,5- bis 4-fach erhöhte Apoptosisresistenz nach onkogener K-*ras*-Überexpression gegen 100 μM H_2O_2 . Diese Daten legen eine durch onkogenes K-RAS-vermittelte Resistenz gegen die ROS-induzierte Apoptose nahe. Bemerkenswerterweise war die Caspaseaktivität der Zelllinie Q61H nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid auf dem Niveau der Zelllinien G12V und G13D. Dieses Ergebnis deutet zusammen mit dem Ergebnis der Zytotoxizitätsanalysen (Kapitel 3.5.1) auf einen Caspase-unabhängigen Zelltod dieser Zelllinie hin. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass in allen Zelllinien keine Aktivitätsänderung dieser Enzyme nach Behandlung mit Formaldehyd detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

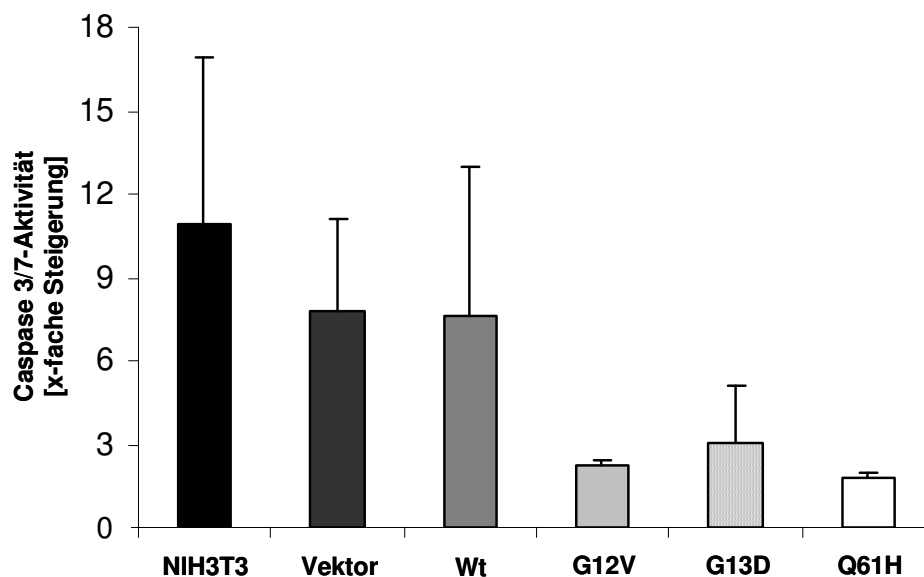


Abb. 3.33: Resistenz onkogener K-RAS-Transformanten gegenüber H_2O_2 -mediierter Apoptose. Jeweils 1×10^4 Zellen wurden in Triplikaten auf eine 96-Loch-Platte ausgesät und mit $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 behandelt. Nach 8 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die zelluläre Caspase 3/7-Aktivität durch Spaltung eines profluoreszenten Substrates mittels eines Fluoreszenzlesegerätes ermittelt. Die Caspaseaktivitäten wurden in jedem Experiment gegen die jeweils unbehandelten Zellen normalisiert. Aus drei unabhängigen Versuchen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die K-RAS-vermittelte Änderung des Genexpressionsprofils der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 auf Proteinebene durch einen „Top-down“-Ansatz mittels 2-DE und anschließender massenspektrometrischer Identifizierung differentiell exprimierter Zielstrukturen analysiert. Die erzielten Resultate sollten zu einem besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen onkogener Signaltransduktion und veränderter Genexpression beitragen. Durch den Vergleich des Gesamtexpressionsprofils der *K-ras*-Transfektanten mit den Kontrollzelllinien konnten 51 Proteine identifiziert werden, deren Expression durch K-RAS signifikant moduliert wird und die damit potentiell zur malignen Transformation beitragen könnten. Basierend auf diesem systembiologischen Ansatz wurden funktionelle Analysen durchgeführt, die den Kenntnisstand der Xenobiotika-Detoxifikation und des Einflusses von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Onkogen-transformierten Zellen verbesserten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von (proto-)onkogenem *K-ras* zu einer Beeinträchtigung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression führt und somit einen putativen „Immune escape“-Phänotyp darstellt. Dieses Phänomen war auf die Mindereexpression bestimmter APM-Komponenten zurückzuführen. Die Ergebnisse der Arbeit sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

4.1 Induktion der onkogenen Transformation nach *K-ras*-Überexpression

4.1.1 K-RAS-Überexpression induziert morphologische und zellbiologische Veränderungen

Als Modellsystem für die onkogene Transformation wurden NIH3T3-Zellen ausgewählt, da bei dieser immortalisierten Nagerzelllinie die Einführung eines Onkogens zur Komplettierung des malignen Phänotyps ausreicht (Shih, C. *et al.*, 1979; Shih, C. *et al.*, 1981; Land, H. *et al.*, 1983). Damit bietet dieses Zellmodell die Möglichkeit, den Einfluss eines spezifischen Onkogens auf die deregulierte Signaltransduktion und die daraus resultierende aberrante Genexpression der onkogenen Transformation zu analysieren. Zur Konstruktion des Systems wurden wildtypische und mutierte *K-ras*-Allele aus menschlichen Karzinomzelllinien isoliert

bzw. über ortsspezifische Mutagenese hergestellt und unter die Kontrolle des konstitutiven Zytomegalievirus (CMV)-Promotors gestellt. Anschließend wurden die unterschiedlichen *K-ras*-Expressionsvektoren stabil in NIH3T3-Zellen transfiziert und Klone selektiert.

Die transgene Expression der unterschiedlichen *K-ras*-Varianten wurde durch Immunfärbungen überprüft (siehe Kapitel 3.1.2). Bei diesen Untersuchungen konnte eine relativ homogene Gesamt-RAS-Expression in allen Zelllinien festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war die Menge an GTP-gebundenen RAS-Molekülen am größten in den Zelllinien, die mutiertes *K-ras* exprimierten, während in den Kontrollzellen und der Wt-*K-ras*-Transfektante kein aktiviertes RAS detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen einer Arbeit, bei der der Anteil aktivierter RAS-Moleküle nach wildtyp-*ras*-Überexpression in NIH3T3-Zellen bei 0,25-0,30 % lag, während nach Überexpression von onkogenem *ras* die relative Menge GTP-gebundener RAS-Proteine 29 % betrug (Scheele, J. S. *et al.*, 1995). Die heterogene GTP-RAS-Expression kann darauf zurückgeführt werden, dass überexprimiertes wildtypisches RAS zwischen aktiver und inaktiver Form wechseln kann. Dominant-positive *ras*-Mutationen führen dagegen zu konstitutiver Aktivierung der GTPase (Cox, A. D. und Der, C. J., 1997; McCormick, F., 1998; Bos, J. L. *et al.*, 2007).

Die Überexpression der unterschiedlichen *K-ras*-cDNAs, führte zu mehreren morphologischen Veränderungen, die teilweise eine onkogene Transformation der NIH3T3-Fibroblasten begründen. Zum einen zeigten die mit *K-ras*-transfizierten Zellen eine spindelförmige Gestalt und bildeten lange Zellfortsätze aus, während die Parentalzelllinie und Leervektor-Kontrolle durch eine planare Zellstruktur mit kürzeren Zellausläufern charakterisiert waren. In der Zelllinie Wt war diese Morphologie schwächer ausgeprägt als in den Zelllinien G12V, G13D und Q61H. Darüber hinaus hatte die Überexpression von Wt-*K-ras* sowie die der onkogenen *K-ras*-Genvarianten eine Verkürzung der Generationszeiten zur Folge. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen von Guerrero und Mitarbeitern, die den gleichen Einfluss der Überexpression von wildtyp-K-RAS und der Onkoproteine K-RAS G12V und K-RAS G13D auf das Wachstumsverhalten muriner Fibroblasten demonstrierten (Guerrero, S. *et al.*, 2000). Für die onkogenen Transformanten beobachteten die Autoren eine Verdopplungszeit von ca. 20 Stunden, während sich Parentalzelllinie und Leervektorkontrolle alle 27 Stunden teilten. Während der Wert für die *K-ras*-

transfizierten Zellen mit dem in dieser Arbeit ermittelten übereinstimmt, zeigten NIH3T3-Zellen und mit dem Vektorrückgrat transfizierte NIH3T3-Zellen in der vorliegenden Arbeit eine um ca. fünf Stunden verkürzte Verdopplungszeit. Dieser Unterschied ist möglicherweise auf unterschiedliche Kultivierungsbedingungen zurückzuführen.

Zur weiteren Charakterisierung des K-RAS-induzierten Phänotyps der Transfektanten wurde die Fähigkeit zum verankerungslosen Wachstum überprüft. Bei diesem Ansatz konnte lediglich die Zelllinie G12V in Weichagar proliferieren. Diese Mutation in Kodon 12 konnte in der bereits erwähnten Studie ebenfalls einem aggressiveren Phänotyp zugeordnet werden (Guerrero, S. *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass in der Arbeit von Guerrero auch Fibroblasten mit einer Kodon 13-Mutation verankerungsunabhängig wachsen konnten. Die Diskrepanz ist möglicherweise auf den unterschiedlichen experimentellen Ansatz der beiden Arbeiten zurückzuführen. So verwendeten Guerrero und Koautoren polyhämbeschichtete Kulturschalen, während in der vorliegenden Arbeit die Proliferation in Weichagar untersucht wurde.

Da eine reduzierte Proliferationsabhängigkeit von Wachstumsfaktoren ein Charakteristikum Onkogen-transformierter Zellen darstellt (Hanahan, D. und Weinberg, R. A., 2000) wurden die Zelllinien des *in vitro*-Modells in Gegenwart verringerter FKS-Konzentrationen kultiviert. Bei diesem Versuch teilten sich die Zelllinien Wt, G12V und G13D noch bei einer FKS-Konzentration von 0,1 %, während in den Kontroll- sowie Q61H-Zellen nach fünf Tagen kein Wachstum detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis legt die Induktion autokriner Wachstumssignale dieser K-ras-Transfektanten nahe. Das abweichende Proliferationsverhalten der Zelllinie Q61H unter diesen Bedingungen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Substitution dieser Aminosäure neben der Suppression der GTPase-Aktivität die Interaktion mit bestimmten Effektormolekülen verhindert. Dies könnte eine mögliche Erklärung für das relativ seltene Auftreten dieser K-ras Mutation in humanen Tumorentitäten sein (Edkins, S. *et al.*, 2006).

4.1.2 Deregulierte Signaltransduktion in den K-ras-Transfektanten

Die konstitutive Aktivierung bestimmter Signalkaskaden ist für die onkogene Transformation entscheidend (Ellis, C. A. und Clark, G., 2000). Daher wurde der

Aktivierungsgrad des MAPK- sowie des PI3-K-Weges anhand der Phosphorylierung bestimmter Kinasen analysiert.

Der MAPK-Weg stellt eine wichtige stromabwärts gelegene Effektor-Kaskade von RAS dar, die in der Tumorprogression Proliferation, Invasion und Metastasierungsprozesse steuert (Leicht, D. T. *et al.*, 2007). Zahlreiche Studien konnten die essentielle Bedeutung der RAF/MEK/ERK-Kaskade für den RAS-medierten Transformationsprozess zeigen (Troppmair, J. *et al.*, 1994; Ulku, A. S. *et al.*, 2003). Zum einen können RAF-1, MEK und ERK-Proteine ohne Kinaseaktivität die RAS-vermittelte Signalweiterleitung und Transformation blockieren (Kolch, W. *et al.*, 1991; Cowley, S. *et al.*, 1994; Westwick, J. K. *et al.*, 1994), zum anderen erzeugen konstitutiv aktive RAF-1-Mutanten hohe Transformationseffizienzen in Nagerfibroblasten (Bonner, T. I. *et al.*, 1985; Stanton, V. P., Jr. *et al.*, 1989). Des Weiteren können NIH3T3-Zellen durch eine konstitutiv aktivierte MAPK-Kinase transformiert werden (Mansour, S. J. *et al.*, 1994). Außerdem zeigten Untersuchungen in *C. elegans* und *D. melanogaster*, dass dominant-positive Mutationen in RAF-, MEK- oder ERK-Homologen RAS-Defizienzen kompensieren können (Han, M. *et al.*, 1993; Tsuda, L. *et al.*, 1993; Lu, X. *et al.*, 1994).

Die Untersuchung der MAPK-Signaltransduktionskaskade durch die semi-quantitative Analyse des Anteils der phosphorylierten RAF-1- sowie ERK1/2-Moleküle ergab eine verstärkte Aktivierung beim Vergleich aller K-*ras*-transfizierten Zelllinien mit der Parental- sowie der Leervektorkontrollzelllinie. Dieser Effekt war selbst in der Wt-K-*ras*-Transfektante, die keinen signifikant erhöhten RAS-GTP-Spiegel aufwies, zu beobachten. Dieses Ergebnis unterstreicht die funktionelle RAS-Expression in allen K-*ras*-transfizierten Zelllinien. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass ein hyperaktiver MAPK-Weg als Ursache für die Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition hyperplastischer Zellen beschrieben wurde (Janda, E. *et al.*, 2002).

Der PI3-K/AKT-Weg ist an der Regulation verschiedener Prozesse beteiligt, die Überleben, Proliferation und Wachstum steuern (Vivanco, I. und Sawyers, C. L., 2002). Durch die Interaktion mit RTK oder aktiviertem RAS kann die PI3-K aktiviert werden und PIP₃ generieren. Dadurch kann AKT an die Plasmamembran rekrutiert und durch PDK aktiviert werden. Daraus resultiert die Inhibierung zahlreicher an der Apoptose beteiligter Proteine, wie BAD und Glykogensynthasekinase-3β (GSK-3β). Die Phosphorylierung des pro-apoptotischen Bcl2-Familienmitgliedes BAD

unterbindet die Ausbildung eines nicht-funktionellen Heterodimers aus BAD und Bcl-XI, wodurch Bcl-XI seine anti-apoptotische Wirkung ausüben kann (Datta, S. R. *et al.*, 1997). Aktivierte GSK-3 β kann durch die Inhibierung von CREB und anderen Transkriptionsfaktoren die Freisetzung des CBP-Protein bewirken. In Folge dessen kann das CBP-Protein an p53 binden und Apoptose induzieren (Grimes, C. A. und Jope, R. S., 2001). Daneben beeinflusst dieser Signalweg die Proliferation durch die Regulation der Zellzyklusmaschinerie, indem durch die Inhibierung der GSK-3 β der proteasomale Abbau der Cyclin-abhängigen Kinase1 (CDK1) verhindert wird.

In der vorliegenden Arbeit war eine verstärkte Phosphorylierung der regulatorischen PI3-K-Untereinheit p85 der *K-ras*-Transfektanten zu beobachten. Diese Phosphorylierung verringert den inhibitorischen Effekt von p85 und führt so zur Aktivierung der PI3-K (Cuevas, B. D. *et al.*, 2001), die sich in der verstärkten Phosphorylierung der AKT-Kinase im Vergleich zu Parentalzelllinie und Leervektorkontrolle widerspiegelte. Die Aktivierung der AKT-Kinase resultierte in einer verstärkten, inhibitorischen Phosphorylierung der GSK-3 β in den Zelllinien G12V, G13D und Q61H. Damit deuten diese Ergebnisse auf eine verstärkte Apoptoseresistenz dieser Zelllinien hin, die teilweise durch die erhöhte Resistenz gegenüber Xenobiotika und ROS (siehe Kap. 3.5) reflektiert wurde.

Die erhöhte Aktivität dieser spezifischen Signalkaskaden stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien von *in vitro*-Modellen H-RAS-vermittelter Transformation überein (Park, J. W. *et al.*, 2006; Ji, H. *et al.*, 2007) und bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die morphologischen Veränderungen der *ras*-Transfektanten. Darüber hinaus korreliert der Aktivierungsgrad dieser Signalkaskaden mit der vermehrten Menge an aktivierten RAS-Molekülen in den mit onkogenem *K-ras* transfizierten Zelllinien.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die morphologischen, zellbiologischen Veränderungen sowie die verstärkte Aktivierung des MAPK- und PI3-K-Weges die onkogene Transformation der mit dominant-positivem *K-ras* transfizierten Zellen anzeigt. Damit stand ein *in vitro*-Modell der onkogenen Transformation zur Verfügung mit dem die RAS-abhängige (De-)regulation der Proteinexpression untersucht werden konnte.

4.2 K-RAS induziert einen „Immune escape“-Phänotyp

4.2.1 Die Überexpression von onkogenem und proto-onkogenem *K-ras* resultiert in einer MHC-Klasse-I-Minderexpression

Verschiedene Studien zeigten, dass die Überexpression verschiedener Onkogene die MHC-Klasse-I-Expression invers beeinflusst (Seliger, B. und Pfizenmaier, K., 1989; Lohmann, S. *et al.*, 1996; Seliger, B. *et al.*, 1997; Lollini, P. L. *et al.*, 1998; Seliger, B. *et al.*, 1998; Herrmann, F. *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte für die Überexpression verschiedener (proto-)onkogener *K-ras*-Allele ebenfalls eine Herabregulation der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression gefunden werden. Die Reduktion betrug, verglichen mit der Leervektor-Kontrollzelllinie, zwischen ca. 50 und 70 %. Bemerkenswerterweise tritt dieser Effekt unabhängig davon auf, ob onkogenes oder proto-onkogenes *K-ras* überexprimiert wird. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede der verschiedenen durch Punktmutationen erzeugten konstitutiv aktiven K-RAS-Onkoproteine auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression festgestellt werden. Diese Resultate entsprechen einer Untersuchung von Lohmann und Koautoren, die in 3T3-Fibroblasten mit dominant-positiver *H-ras*-Überexpression eine 40-50-%ige Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression detektieren konnten. Damit scheint das Expressionsniveau der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nicht RAS-isoformspezifisch reguliert zu werden. Die Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Moleküle konnte in den *ras*-Transfektanten durch die Induktion mit IFN- γ rekonstituiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies legt den Einfluss transkriptioneller und posttranskriptioneller Regulationen für die Verringerung der MHC-Klasse-I-Membranexpression nahe. Diese Prozesse werden dabei nicht vom MAPK- bzw. PI3-K-Weg gesteuert, da die Blockade dieser Signaltransduktionskaskaden mit U0126 und Wortmannin zu keiner Erhöhung der Klasse-I-Membranexpression führte (Daten nicht gezeigt). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die ermittelte nicht-zytotoxische Inhibitorkonzentration nicht hoch genug war, um einen signifikanten Effekt auf diese Signalkaskaden zu erzielen. Eine alternative Erklärung bestünde in der K-RAS-vermittelten Regulation der Expression verschiedener APM-Komponenten über einen anderen Signalweg, der durch die eingesetzten Inhibitoren nicht beeinflusst wird. Des Weiteren wäre eine unspezifische Hemmung anderer (Signal-)Moleküle denkbar, die die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression stimulieren. Die Herunterregulation der Klasse-I-

Oberflächenexpression war auch nicht durch die Hemmung der K-RAS-Prozessierung mit Farnesyltransferaseinhibitoren in den K-*ras*-Transfektanten zu korrigieren (Daten nicht gezeigt). Dies ist darauf zurückzuführen, dass K-RAS im Gegensatz zu H-RAS alternativ durch Geranylgeranyltransferase I prenyliert werden kann (Lerner, E. C. *et al.*, 1997; Fiordalisi, J. J. *et al.*, 2003).

4.2.2 Onkogene K-*ras* Überexpression führt zur Verringerung der Transkript- und/oder Proteinmenge bestimmter APM-Gene

Zur Klärung der (molekularen) Ursachen, die die Reduktion der Klasse-I-Oberflächenexpression bewirken, wurden die Expressionsniveaus der APM-Komponenten miteinander verglichen. Bei diesen Untersuchungen war für die schwere Kette des MHC-Moleküls, β_2 -Mikroglobulins (β_2 -M) und die Bestandteile des Proteasoms keine RAS-vermittelte Expressionsmodulation festzustellen. Dagegen konnte für den molekularen Faltungshelfer Tapasin eine um ca. 50-70 % verringerte mRNA-Menge in den Zelllinien G12V, G13D und Q61H im Vergleich zu Parental- und Vektorkontrolle sowie der Zelllinie Wt mittels quantitativer PCR detektiert werden. Diese Expressionsunterschiede konnten durch Western Blot-Analysen auf Proteinebene bestätigt werden. Diesem Chaperon kommt innerhalb des Peptidbeladungskomplexes eine Schlüsselrolle zu (Garbi, N. *et al.*, 2000; Garbi, N. *et al.*, 2003). Zum einen wirkt Tapasin an der Selektion von geeigneten Peptiden für das MHC-Molekül mit (Koch, J. und Tampe, R., 2006). Zum anderen bildet Tapasin mit ERp57 ein Heterodimer, das die Rekrutierung und Peptidbeladung von MHC-Klasse-I- β_2 -M-Heterodimeren beeinflussen kann (Stepensky, D. *et al.*, 2007). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass ERp57 die $\alpha 2$ -Disulfidbrücke der MHC-Klasse-I-Peptidbindungstasche in der Abwesenheit von Tapasin reduziert (Kienast, A. *et al.*, 2007). Dadurch wird die Beladung der MHC-Moleküle mit geeigneten Peptiden verhindert. Durch diese Funktion hält Tapasin das MHC-Molekül in einem peptidrezeptiven Zustand. Diese beiden Eigenschaften machen die in unserem *in vitro*-Modellsystem beobachtete MHC-Klasse-I-Oberflächenmindereexpression verständlich, da mit der verringerten Tapasinmenge aus o. g. Gründen verstärkt unbeladene MHC-Komplexe entstehen, deren Stabilität stark verringert ist (Townsend, A. *et al.*, 1989; Chefalo, P. J. *et al.*, 2003; Garbi, N. *et al.*, 2003). Die Bedeutung von Tapasin für eine zur T-Zell-Aktivierung ausreichende MHC-Klasse-I-Expression wird durch eine Arbeit von Belicha-Villanueva und Mitarbeitern (2008)

weiter unterstützt (Belicha-Villanueva, A. *et al.*, 2008). Diese Studie konnte in einer humanen, Tapasin-defizienten Melanomzelllinie zeigen, dass eine Erhöhung der TAP-Expression die HLA-Klasse-I-Expression nicht erhöht, während die ektopische Überexpression von Tapasin bei geringer TAP-Aktivität zu einer starken Erhöhung der HLA-Klasse-I-Oberflächenexpression führt. Die Herunterregulation dieses Faltungshelfers scheint klinische Relevanz zu haben. So ergaben immunhistochemische Analysen einer Kohorte von 42 Patienten mit Kolorektalkarzinom einen Verlust bzw. eine Verringerung der Tapasinexpression in 80 % der intraepithelialen Neoplasien im Vergleich mit der autologen kolorektalen Mukosa. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit war bei 68 % der Tumorfokales eine Reduktion der TAP-Expression gekoppelt mit dem *K-ras*-Mutationsstatus der Tumoren zu beobachten (Atkins, D. *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte eine reduzierte Tapasinexpression in Pankreaskarzinom-, kleinzelligen Lungenkarzinom-, Kopfhalstumor- und Nierenzellkarzinomzelllinien nachgewiesen werden (Delp, K. *et al.*, 2000; Seliger, B. *et al.*, 2001; Meissner, M. *et al.*, 2005).

Obwohl die TAP1-Proteinmenge in den onkogenen K-RAS-Transformanten reduziert war, konnte keine Modulation der TAP1-Transkriptmenge detektiert werden. Diese Diskrepanz lässt sich durch die Tapasin-vermittelte Stabilisierung des TAP-Transportersystems erklären (Lehner, P. J. *et al.*, 1998; Momburg, F. und Tan, P., 2002). Mehrere Arbeiten zeigten eine Stabilisierung dieses ABC-Transporters in Gegenwart von Tapasin und einen Rückgang der TAP-Expression in Tapasin-defizienten B-lymphoblastoiden Zellen (Garbi, N. *et al.*, 2000; Garbi, N. *et al.*, 2003). Daher könnte onkogenes K-RAS in dem *in vitro*-Modell der vorliegenden Arbeit eine beschleunigte TAP-Degradation durch die Herunterregulation der Tapasinexpression induzieren. Zahlreiche Arbeiten bestätigen einen mit der Überexpression von Onkogenen, wie Her2/Neu und *H-ras*, assoziierten Rückgang der TAP-Expression (Lohmann, S. *et al.*, 1996; Seliger, B. *et al.*, 1997; Herrmann, F. *et al.*, 2004). Die Reduktion war in diesen Arbeiten mit einer Mindereexpression der Proteasom-Untereinheit LMP2 gekoppelt, da die Transkription von LMP2 und TAP durch den gleichen bicistronischen Promotor gesteuert wird (Wright, K. L. *et al.*, 1995). Damit führt die Überexpression von Her2/Neu und *H-ras* zu einer direkten transkriptionellen Regulation der TAP-Expression. Im Gegensatz dazu scheint K-RAS die TAP1-Expression aus o. g. Gründen posttranskriptionell zu modulieren. In diesem

Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass eine TAP-Defizienz die *in vivo*-Tumorigenität von transformierten Zellen erhöht (Johnsen, A. K. *et al.*, 1999; Qin, Z. *et al.*, 2002). Die detektierte Herunterregulation von Tapasin und TAP stellt einen effektiven „Immune escape“-Mechanismus dar, da nach Transfektion der cDNS von schwerer Kette, β_2 -M, Tapasin und TAP in Insektenzellen gezeigt werden konnte, dass die Expression dieser Komponenten für eine MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression ausreichend ist (Schoenhals, G. J. *et al.*, 1999).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die K-RAS-induzierte Minderexpression der MHC-Klasse-I-Oberflächenmoleküle in den Zelllinien G12V, G13D und Q61H sich v. a. auf die Reduktion der APM-Komponente Tapasin zurückführen lässt. Aus der verringerten Tapasinexpression resultieren mehrere synergistische Effekte, die in der Endkonsequenz zu einer Beeinträchtigung der Membranexpression der MHC-Klasse-I-Moleküle führen:

- i) Die Tapasinminderexpression führt dazu, dass die Qualität des Peptidrepertoires beeinträchtigt wird (Paulsson, K. M. und Wang, P., 2004).
- ii) Tapasin kann die ERp57-katalysierte Reduktion einer Disulfidbrücke in der Peptidbindungsfurche des MHC-Moleküls nicht mehr unterbinden, so dass die Peptidbeladung eingeschränkt wird (Kienast, A. *et al.*, 2007).
- iii) Tapasin ist ein zentrales Stabilisierungselement des Peptidladungskomplexes (PLC) (Koch, J. und Tampe, R., 2006). Dies legt die Vermutung nahe, dass aufgrund der verringerten Tapasinexpression in den onkogenen Transformanten die Assemblierung des PLC gestört ist.
- iv) Es kommt zu einer Destabilisierung des TAP-Transporters, der folglich schneller degradiert wird, wodurch ein ausreichender Transport antigener Peptide aus dem Zytoplasma nur noch eingeschränkt möglich sein dürfte (Lehner, P. J. *et al.*, 1998; Tan, P. *et al.*, 2002).

Diese Hypothesen werden durch Untersuchungen an Tapasin^{-/-}-Mäusen gestützt, deren Klasse-I-Oberflächenmoleküle schneller zerfielen (Garbi, N. *et al.*, 2000). Die detektierte Tapasinherunterregulation des vorliegenden *in vitro*-Modells mag eine Erklärung für den häufig beobachteten „Immune escape“ von Tumoren mit mutiertem K-ras bieten, da für eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen eine ausreichende

Präsentation von Antigenen durch MHC-Klasse-I-Moleküle gegeben sein muss. Dieser potentielle Mechanismus ist in Abbildung 4.1 als Flussdiagramm dargestellt.

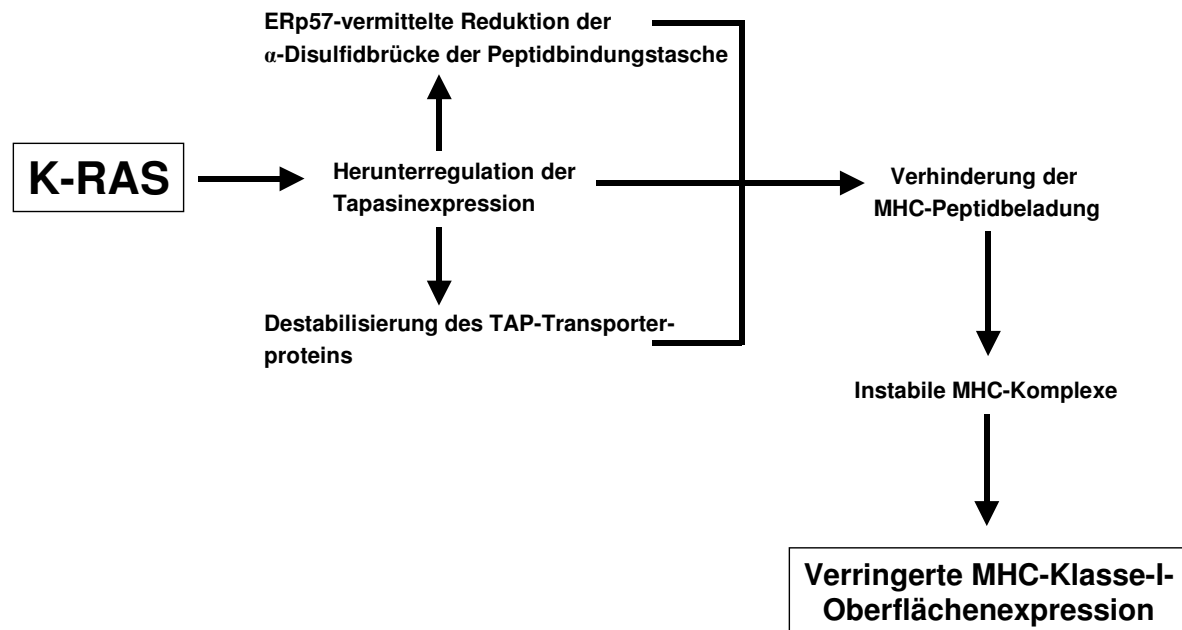


Abb. 4.1: Postulierter Mechanismus der K-RAS-induzierten MHC-Klasse-I-Oberflächenexpressionsverminderung.

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse lassen zusammen mit den Ergebnissen der immunhistochemischen APM-Analysen des Kolorektalkarzinoms die Schlussfolgerung zu, dass K-RAS durch die Inhibierung der Peptidbeladung des MHC-Moleküls für die Entstehung leerer und damit instabiler MHC-Klasse-I-Komplexe sorgt (Townsend, A. *et al.*, 1989), was in der Endkonsequenz zu einer Herabsetzung der Membranexpression führt. Allerdings kann der postulierte Mechanismus die beobachtete Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in der Zelllinie Wt nicht erklären, da keine der untersuchten APM-Komponenten in dieser Zelllinie im Vergleich zur Parentalzelllinie vermindert exprimiert war. In diesem Zusammenhang ist nicht auszuschließen, dass mögliche posttranskriptionelle Regulationsmechanismen eine Expressionsreduktion von schwerer Kette und β_2 -M induzieren, die aufgrund des Fehlens geeigneter Antikörper nicht nachgewiesen werden konnte.

4.3 Identifizierung von Zielgenen der K-RAS-medierten Transformation

Die Verwendung muriner Fibroblasten ermöglichte die Untersuchung eines definierten Proteoms der K-RAS-medierten zellulären Transformation und Signaltransduktion. Obwohl (K)-RAS-Onkoproteine das Genexpressionsprofil beeinflussen, ist der pleiotrope Effekt dieses molekularen Wechselschalters sowie der Einfluss unterschiedlicher *ras*-Mutationen auf die regulierten Gene und die Malignität bestimmter Tumorentitäten nur teilweise verstanden. In den folgenden Abschnitten wird zunächst die Regulation der in dieser Arbeit identifizierten, differentiell exprimierten Proteine mit den Ergebnissen anderer Transkriptom- und Proteomanalysen der RAS-gesteuerten Transformation verglichen. Anschließend wird die funktionelle Bedeutung der modulierten Proteinfamilien einzeln diskutiert.

4.3.1 Vergleich mit verschiedenen Studien der durch RAS deregulierten Signaltransduktion

Die RAS-induzierte Perturbation des globalen Proteinexpressionsmusters wurde bisher v. a. anhand der konstitutiv aktiven H-RAS-Isoform untersucht. Hierzu wurden als Modellsysteme entweder ein humanes Ovarialkarzinommodell oder das NIH3T3-Zellsystem verwendet (Young, T. W. *et al.*, 2004; Jin, B. F. *et al.*, 2006; Park, J. W. *et al.*, 2006; Ji, H. *et al.*, 2007; Young, T. W. *et al.*, 2007). Je nach Studie konnten zwischen 30 und 64 differentiell exprimierte Proteine identifiziert werden. Der Vergleich dieser Studien mit der vorliegenden Arbeit zeigt 5 Proteine, deren Expression von beiden Isoformen gleichermaßen beeinflusst wird, sowie 5 Proteine, die durch K-RAS und H-RAS unterschiedlich reguliert werden. Dabei scheinen die konstitutiv aktiven K-RAS bzw. H-RAS G12V-Varianten die Expression bestimmter metabolischer Enzyme identisch zu beeinflussen. Die Expression der glykolytischen Enzyme Triosephosphatisomerase und Pyruvatkinase M2 (PK-M2) sowie der 6-phospho-Gluconatdehydrogenase wird nach H- und K-*ras*-Überexpression verstärkt. Weiterhin war die Expression von Esterase D sowie von Annexin I in jeweils einer weiteren Proteomstudie hochreguliert. Dagegen wurde für Nukleophosmin, Tubulin beta, F-Actin capping protein, gp96 sowie das zelluläre Retinsäurebindeprotein eine inverse Regulation detektiert. Diese Proteine waren durch RAS im *in vitro*-Modell dieser Arbeit vermindert exprimiert, während Park und Mitarbeiter (2006) eine

verstärkte Expression durch H-RAS G12V nachwiesen. Diese gegenläufige Regulation spiegelt den zum Teil unterschiedlichen Einfluss von H-RAS und K-RAS auf die Genexpression wider. Proteine, die in dieser und anderen Arbeiten der RAS-medierten onkogenen Transformation als differentiell exprimiert identifiziert wurden, sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Vergleich der vorliegenden Arbeit mit weiteren Proteomanalysen der durch RAS deregulierten Signaltransduktion.

Studie	Jin <i>et al.</i> 2006	Park <i>et al.</i> 2006	Ji <i>et al.</i> 2007	Vorliegende Arbeit
Verwendeter pH-Gradient	3-10	4-7	3-10	4-7; 6-11
Verwendete Acrylamidmatrix	13 %	9-16 %	8-18 %	13 %
Identifizierte diff. exprimierte Proteine	44	64	57	51
Untersuchte RAS-Isoform	H-RAS	H-RAS	H-RAS	K-RAS
Zellsystem	NIH3T3	NIH3T3	NIH3T3	NIH3T3
Triosephosphatisomerase	+	n. d.	n. d.	+
6-phospho-Gluconat-DH	+	n. d.	n. d.	+
Pyruvatkinase M2	n. d.	+	+	+
Esterase D	n. d.	n. d.	+	+
Annexin I	n. d.	+	n. d.	+
F-actin capping protein beta	-	n. d.	n. d.	+
Zelluläres Retinsäurebindeprotein	n. d.	n. d.	+	-
gp96	n. d.	+	n. d.	-
Nukleophosmin	n. d.	+	n. d.	-
Tubulin beta	n. d.	+	n. d.	-

Aufgelistet sind die verwendeten pH-Gradienten, die Anzahl der identifizierten differentiell exprimierten Proteine, die untersuchte RAS-Isoform und das verwendete Zellsystem. +: Hochregulation nach RAS-Transformation; -: Herunterregulation nach RAS-Transformation. n. d.: nicht detektiert

Die geringe Überschneidung zwischen den Proteomanalysen zur H-RAS-medierten onkogenen Transformation ist v. a. auf die isoformspezifische Signaltransduktionsaktivität zurückzuführen. Dies konnte 2007 von Young und Mitarbeitern durch den Vergleich von H-RAS- und K-RAS-transformierten, humanen ovariellen Epithelzelllinien gezeigt werden. In dieser Arbeit waren ca. 30 % der durch die beiden Isoformen differentiell regulierten Proteinspots beim Vergleich mit den Parentalzellen identisch (Young, T. W. *et al.*, 2007). Die geringe Schnittmenge der in ihrer Expression modulierten Proteine kann neben dem unterschiedlichen Einfluss der beiden Isoformen auf die Signaltransduktion zumindest teilweise auf die verschiedenen Trennbereiche in erster und zweiter Dimension zurückgeführt werden (Tabelle 4.1).

Hochdurchsatzgenexpressionsanalysen zur RAS-Funktion auf Transkriptebene wurden häufiger durchgeführt (Rajalingam, K. *et al.*, 2007). Die in den ausgewählten Transkriptomstudien und dieser Arbeit detektierten RAS-Zielgene sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. In einer K-RAS-transformierten, ovariellen Epithelzelllinie der Ratte konnten mehr als 200 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Durch die Inhibierung des MAPK und des PI3-K-Weges konnten 79 Gene selektiert werden, die am verankerungsunabhängigen Wachstum und der epithelial-mesenchymalen Transition beteiligt sind (Tchernitsa, O. I. *et al.*, 2004). Eine weitere Studie konnte beim Vergleich H-RAS-, N-RAS- und K-RAS-induzierter/deregulierter Signaltransduktion 26 cDNS-Fragmente identifizieren, die isoformspezifisch reguliert wurden (Zuber, J. *et al.*, 2000). Beim Vergleich der in dieser Arbeit durchgeführten Proteomanalyse mit der Transkriptomanalyse der K-RAS-transformierten Epithelzelllinie waren zwei homologe Gene identisch reguliert: Biglykan und die Proteasomuntereinheit p42. Drei Gene waren in den Transkriptomanalysen und der vorliegenden Arbeit entgegengesetzt reguliert: Triosephosphatisomerase, Vimentin und Annexin I. Die gegenläufige Regulation dieser Zielstrukturen ist möglicherweise auf posttranslational modifizierte Varianten der jeweiligen Polypeptidkette zurückzuführen. So sind zahlreiche Phosphorylierungsstellen des Vimentinproduktes bekannt (Ivaska, J. *et al.*, 2007), die zu mehreren Signalen auf dem 2D-Gel führen können, aber lediglich einen Teil der gesamten Vimentinproteinspezies repräsentieren. Ebenso konnten bei der Proteomanalyse mehrerer Nierenkarzinomzelllinien mit anschließender serologischer Durchmusterung (PROTEOMEX) mehrere Proteinspezies der Triosephosphatisomerase detektiert werden (Lichtenfels, R. *et al.*, 2003).

Tabelle 4.2: Vergleich der Proteomanalyse dieser Arbeit mit Transkriptomanalysen der RAS-Transformation.

Studie	Zuber <i>et al.</i> 2000	Cobellis <i>et al.</i> 2001	Vasseur <i>et al.</i> 2003	Tchernitsa <i>et al.</i> 2004	Vorliegende Arbeit
Diff. exprimierter Zielstrukturen	> 200	57	815	> 200	51
Untersuchte RAS-Isoform	H-RAS	H-RAS	K-RAS	K-RAS	K-RAS
Zellsystem	Rattenfibroblasten	Thyroidzellen	Mausfibroblasten	Rattenepithelzellen	Mausfibroblasten
gp96	-	n. d.	n. d.	n. d.	-
Biglykan	n. d.	n. d.	-	-	-
Proteasomuntereinheit p42	n. d.	n. d.	n. d.	+	+
Triosephosphatisomerase	n. d.	n. d.	n. d.	-	+
Vimentin	-	n. d.	n. d.	+	-
regulatorische Myosinuntereinheit	-	n. d.	n. d.	n. d.	-
Tubulin alpha	n. d.	-	-	n. d.	-
Kardiales alpha-Aktin	n. d.	n. d.	-	n. d.	-
Pyruvatkinase M2	n. d.	+	n. d.	n. d.	+
SOD-Cu/Zn	n. d.	+	n. d.	n. d.	+
Annexin I	n. d.	n. d.	-	n. d.	+
Zelluläres Retinsäure Bindeprotein	-	n. d.	-	n. d.	-

Aufgelistet ist die Anzahl der differentiell exprimierten Gene, die untersuchte RAS-Isoform, das verwendete Zellsystem sowie die Regulation in den unterschiedlichen Studien. +: Hochregulation nach RAS-Transformation; -: Herunterregulation nach RAS-Transformation; n. d. = nicht detektiert.

Neben den aufgeführten Microarrayanalysen wurden weitere Transkriptomanalysen durchgeführt, die u. a. darauf abzielten, die H- und K-RAS- isoformspezifische Expressionsregulation in einer Kolon-Adenom-Zelllinie zu diskriminieren (Roberts, M. L. *et al.*, 2006).

Die Diskrepanz zwischen der Anzahl der detektierten, differentiell exprimierten Zielgene ist auf die technische Limitation der 2-DE zurückzuführen. So können Proteine, die in sehr niedriger Kopienzahl/Zelle vorliegen, mit der 2-DE nicht mehr erfasst werden (Gygi, S. P. *et al.*, 2000). Ebenfalls nicht repräsentiert werden in 2D-Gelen Proteine mit relativ hohem Molekulargewicht ($M_r > 200$ kDa) und relativ kleine Proteine ($M_r < 5$ kDa). Außerdem werden durch die klassische 2-DE Membranproteine nur in sehr geringem Umfang nachgewiesen. Dagegen ist es theoretisch mit „Microarray“-Analysen möglich, die Expression aller bekannten Genloci zu analysieren. Dies spiegelt sich beim Vergleich mit o. g. Transkriptomanalysen beispielsweise bei den Kollagenen ($M_r > 250$ kDa) wider, deren differentielle Expression in der Transkriptomanalyse detektiert werden konnte (Gygi, S. P. *et al.*, 2000). Trotzdem stellen beide Methoden komplementäre Informationen zur Genexpression zur Verfügung, da posttranslationale Modifikationen sowie posttranskriptionelle Regulationen mittels Transkriptomanalysen nicht erfasst werden können. Daher spiegeln sich

Expressionsunterschiede auf der mRNA-Ebene nicht immer zu 100 % auf der Proteinebene wider (Tian, Q. *et al.*, 2004; Brockmann, R. *et al.*, 2007).

4.3.2 Mögliche funktionelle Bedeutung K-RAS-modulierter Zielstrukturen

Die identifizierten differentiell exprimierten Proteine konnten aufgrund ihrer Funktion im Wesentlichen in folgende fünf Gruppen eingeteilt werden: Oxidoreduktasen, metabolische Enzyme, Hitzeschockproteine, Zytoskelettproteine sowie Proteine, die an der Steuerung von Genexpressionsprozessen involviert sind (Abb. 4.2).

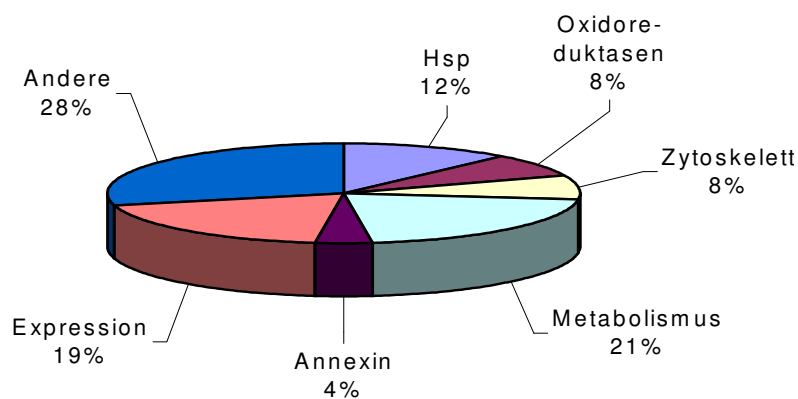


Abb. 4.2: Klassifizierung der differentiell exprimierten Proteine.

Die differentiell exprimierten Proteine wurden ausgehend von ihrer Funktion in verschiedene Proteinfamilien eingeteilt. Die einzelnen Segmente repräsentieren den prozentualen Anteil der jeweiligen Proteinfunktionsklasse.

Im Folgenden sollen die möglichen zellulären Auswirkungen der Expressionsmodulierung dieser Proteine erörtert werden.

4.3.2.1 Genexpressionsregulatorische Proteine

Etwa 20 % der differentiell exprimierten Proteine waren an der Steuerung von Expressionsprozessen beteiligt. Der pleiotrope Effekt der durch K-RAS deregulierten Genexpression wird innerhalb dieser Gruppe durch die veränderten Expressionsprofile der heterogenen Ribonukleoproteine (hnRNP) sowie weiterer an Transkriptionsprozessen beteiligter Proteine, wie dem Spleißfaktor 3A und dem kleinen Ribonukleoprotein B, reflektiert. Die hnRNP-Familie beeinflusst in zahlreichen Tumorentitäten Tumorentstehung und -progression (Carpenter, B. *et al.*, 2006). Mitglieder der kleinen nukleären Ribonukleoprotein- (snRNP-) und hnRNP-Familie bauen zusammen mit der prä-mRNS und weiteren Proteinen das Spleißosom auf

und sind an der Auswahl alternativer Spleißstellen beteiligt (Kramer, A., 1996). Unter den Proteinen, die an der Steuerung von Translationsprozessen beteiligt sind, ist die Herunterregulation des Elongationsfaktors-1 α (EF-1 α) erwähnenswert, da die Unterdrückung der EF-1- α -Expression CHO-Zellen vor H₂O₂-mediertem Stress schützen konnte (Borradaile, N. M. *et al.*, 2006). Damit korreliert die verminderte Expression von EF-1 α mit der verstärkten Resistenz der K-*ras*-Transfektanten gegenüber oxidativem Stress (siehe Kapitel 3.5.1).

Ein möglicher Kandidat über den K-RAS eine aberrante Signaltransduktion induzieren könnte, ist das Proteoglykanmolekül Biglykan. Dieses Protein zeigte in allen Onkogen-transformierten K-RAS-Zelllinien eine starke Herunterregulation. *In vitro*-Untersuchungen zeigten die Bindung dieses extrazellulären Matrixproteins an den Transformierenden Wachstumsfaktor- α (TGF- α) (Hayashi, Y. *et al.*, 2005). Dadurch wird eine Bindung dieses Mitogens an den Epidermiswachstumsfaktorrezeptor (EGF-R) verhindert und so die Induktion stromabwärts liegender Signalkaskaden unterbunden. Die Herabregulation dieses Moleküls legt, basierend auf den Ergebnissen von Hayashi und Koautoren (2005), eine verlängerte Aktivierung des EGF-R-Signalweges durch onkogenes K-RAS aufgrund der erhöhten Menge an freiem TGF- α nahe. Darüber hinaus ist TGF- α wichtig für die Apoptose-Suppression bei der Ablösung humaner Tumorzellen von der Extrazellulären Matrix (Anoikis). Dieses Modell wird durch die Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Voice und Koautoren (1999) gestützt, die eine erhöhte Zellmigration K-*ras*-transfizierter Fibroblasten zeigen konnte. Der Einfluss von K-RAS auf die Biglykanexpression ist deshalb bemerkenswert, weil bei diesem Modell Stimuli „stromaufwärts“ der Signalkaskaden verstärkt würden, was zur Induktion einer autokrinen Signalschleife führen würde.

Des Weiteren wurde die Herunterregulation dieses Gens in einer unabhängigen Transkriptomstudie K-RAS-mediierter Transformation nachgewiesen (Tchernitsa, O. I. *et al.*, 2004).

4.3.2.2 Hitzeschockproteine

12 % der identifizierten, durch K-RAS in ihrer Expression modulierten Gene gehörten zur Klasse der Chaperone. In den meisten Fällen wurde eine Minderexpression der identifizierten Hitzeschockproteine nach K-*ras*-Transfektion festgestellt. Lediglich Hsp 86 war in den G13D-Transfektanten verstärkt exprimiert. Ein im Zusammenhang mit der verringerten Immunogenität der onkogenen Transformanten interessantes Hitzeschockprotein ist gp96. Dieses im ER-Lumen und an der Zelloberfläche lokalisierte Stressprotein gehört zur Klasse der Hsp90-Chaperone und ist in der Lage Antigene für ZTL zu präsentieren (Blachere, N. E. *et al.*, 1997; Srivastava, P., 2002). Dies wurde u. a. durch eine Studie belegt, die eine *in vitro*-Aktivierung und *in vivo*-Expansion von Melanom- und Kolonkarzinom-spezifischen T-Zellen nach Vakzinierung mit gp96 nachweisen konnte (Rivoltini, L. *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass die gp96-Expression RAS-isoformspezifisch reguliert wird: Während eine Proteomstudie mit H-RAS-transformierten NIH3T3-Zellen eine verstärkte Expression dieses Proteins detektierte (Park, J. W. *et al.*, 2006), wurde in der vorliegenden Arbeit eine Herabregulation dieses Hitzeschockproteins sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gefunden. Daher kann aufgrund der inversen gp96-Regulation durch die beiden RAS-Isoformen spekuliert werden, ob durch onkogenes H-RAS transformierte Zellen eine höhere Immunogenität als solche mit onkogenem K-RAS aufweisen und dadurch eher vom Immunsystem erkannt werden. Dies würde die geringe Prävalenz humaner Tumoren mit aktivierenden H-*ras*-Mutationen verständlich machen, da die verstärkte gp96-Expression möglicherweise Defizienzen bestimmter APM-Komponenten, die in einer MHC-Klasse-I-Minderexpression resultieren können, substituieren kann, was zu einer Elimination dieser Tumoren durch ZTL führen könnte. Diese Spekulation würde im Einklang mit einer Studie an lymphoiden Tumorzelllinien des Krallenfrosches stehen, bei der die gp96-Oberflächenexpression mit der Immunogenität der jeweiligen Tumorzelllinie korrelierte (Robert, J. *et al.*, 1999). Damit trägt die Herunterregulation dieser Proteinfamilie möglicherweise zum „Immune escape“-Phänotyp Onkogen-transformierter Zellen bei.

4.3.2.3 Zytoskelettproteine

Etwa ein Zehntel der differentiell exprimierten Proteine war am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt. Die Umstrukturierung des Aktinmikrofilamentsystems besitzt für die Tumorinduktion und -progression entscheidende Bedeutung und integriert eine deregulierte Signaltransduktion in morphologische Veränderungen (Gimona, M., 2008), womit unter Umständen der Phänotyp der *K-ras*-Transfektanten erklärt werden kann. Die Ausbildung längerer Zellfortsätze kann für die Zelllinien G12V und Q61H möglicherweise mit der gesteigerten Expression des „F-actin capping proteins β “ (CP β) erklärt werden. Dieses Protein stellt zusammen mit seiner α -Untereinheit einen Regulator der Aktinfilamentbildung dar. Das Heterodimer bindet an (ältere) stumpfe, membrannahe Enden der F-Aktinfilamente, wodurch die Addition monomerer G-Aktinmoleküle verhindert wird. Durch diese Blockierung wird die Anzahl wachsender stumpfer Enden begrenzt, was monomere G-Aktinfilamentbausteine verfügbar hält. Das Ergebnis sind kurze, starre und stark verzweigte Aktinfilamente, die einen lamellipodienartigen Charakter aufweisen (Wear, M. A. und Cooper, J. A., 2004). Die Bedeutung des CP für die Bildung von Lamellipodien konnte durch Untersuchungen belegt werden, die nach der RNS-Interferenz-medierten CP-Expressionsstilllegung den Verlust der Lamellipodien in der murinen Melanomzelllinie B16F1 beobachteten (Mejillano, M. R. *et al.*, 2004). Interessanterweise wurde eine verminderte Expression dieses Proteins in H-RAS-transformierten NIH3T3-Zellen detektiert (Jin, B. F. *et al.*, 2006). Die inverse Regulation dieses Strukturproteins ist möglicherweise mitverantwortlich für das durch die beiden RAS-Isoformen hervorgerufene unterschiedliche Migrationsverhalten (Voice, J. K. *et al.*, 1999). Diese Spekulation wird gestützt durch eine Arbeit von Hug und Koautoren, die eine erhöhte Motilität in CP-überexprimierenden *Dictyostelium*-Zellen nachwiesen (Hug, C. *et al.*, 1995).

4.3.2.4 Metabolische Proteine

21 % der differentiell exprimierten Proteine ist direkt oder indirekt an der Steuerung metabolischer Prozesse, wie der Glykolyse und dem Trikarbonsäurezyklus, beteiligt. Die veränderte Expression dieser Enzyme deutet auf ein K-RAS-mediertes Umschalten des Stoffwechsels hin. Die möglichen Konsequenzen für die jeweiligen Stoffwechselwege werden im Folgenden gesondert betrachtet.

Glykolyse: Nach der Transfektion mit onkogenem K-*ras* zeigte sich eine verstärkte Expression der Triosephosphatisomerase sowie der Pyruvatkinaseisoform M2 (PK-M2). Die Hochregulation dieser Enzyme impliziert eine verstärkte glykolytische Aktivität, was mit der Warburg-Hypothese übereinstimmen würde, wonach Tumorzellen den überwiegenden Anteil ihrer ATP-Produktion auch unter aeroben Bedingungen über die Glykolyse produzieren (Warburg, O. *et al.*, 1924; Warburg, O., 1956).

Die Mehrexpression dieser glykolytischen Enzyme steht im Einklang mit einer metabolischen Profilanalyse muriner Fibroblasten, die mit in Kodon 12 und in Kodon 13 mutiertem K-*ras* transfiziert waren. Bei dieser Studie unterschied sich der Grad der Glykolyseaktivierung je nach eingeführter K-*ras*-Mutation: So zeigten die in Kodon 12 mutierten Fibroblasten im Vergleich zur Parentalzelllinie eine stärkere Aktivierung als in Kodon 13 mutierte NIH3T3-Zellen. Allerdings substituiert die Mutation in Kodon 12 in dieser Studie im Gegensatz zu der hier vorgestellten Arbeit Glycin zu Cystein (Vizan, P. *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass onkogenes RAS einen Mediator für die Aktivitätssteigerung der M2-Isoform darstellt (Mazurek, S. *et al.*, 2001). Die Bedeutung der PK-M2 für die maligne Transformation konnte durch eine weitere Arbeit belegt werden, die durch RNS-Interferenz die Expression dieser Isoform in humanen Tumorzelllinien ausschaltete und durch die adulte M1-Isoform ersetzte. Dadurch kam es zu einer Revertierung des Warburg-Effektes in diesen Zelllinien und zu einer reduzierten Tumorigenität in einem Xenograft-Modell (Christofk, H. R. *et al.*, 2008). Darüber hinaus trägt das metabolische Umschalten potentiell zur Redoxhomöostase bei, da die für die onkogene Transformation notwendige ROS-Produktion (Irani, K. *et al.*, 1997) durch die vermehrte Produktion des Radikalfängers Pyruvat (Brand, K., 1997) zumindest teilweise ausgeglichen werden kann (siehe auch Abb. 4.3).

Eine Hochregulation der PK-M2 konnte auch in einer Proteomstudie, die das Expressionsprofil von Nierenzellkarzinom- mit korrespondierendem Normalgewebe analysierte, bei der gesamten Patientengruppe evaluiert werden (Unwin, R. D. *et al.*, 2003).

Trikarbonsäurezyklus: Innerhalb des Krebs-Zyklus war die Expression wichtiger Enzyme durch die Position der Aminosäuresubstitution innerhalb der K-RAS-Polypeptidkette teilweise unterschiedlich beeinflusst. So war die Expression der Aconitase in der Zelllinie G12V auf etwa 50 % des Niveaus der Parentalzelllinie

verringert, während in den Zelllinien G13D und Q61H keine signifikant veränderte Expression detektiert wurde. Diese Beobachtung stimmt mit dem Ergebnis der Arbeitsgruppe um Vizan überein, die für murine Fibroblasten mit einer *K-ras*-Kodon 12-Mutation mittels Metabolitenanalyse eine verringerte Aktivität des Trikarbonsäurezyklus detektierten (Vizan, P. *et al.*, 2005). Für die Deaktivierung des Trikarbonsäurezyklus in den G12V-Zellen spricht auch die erhöhte Expression der Transaminase A. Dieses Enzym kann im Trikarbonsäurezyklus durch die Transaminierung von Oxalacetat einen kataplerotischen Effekt erzielen und dadurch diese Verbindung aus dem Zyklus entfernen (Owen, O. E. *et al.*, 2002). Dagegen waren Fumarase und Succinatdehydrogenase in G13D-Zellen der vorliegenden Arbeit vermindert exprimiert. Allerdings beschrieben diese Autoren eine deutliche Aktivitätserhöhung für G13D-Zellen im Vergleich zur Parentalzelllinie. Dieser Unterschied ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass unterschiedliche methodische Ansätze gewählt wurden: Es ist denkbar, dass eine verstärkte Krebszyklusaktivität bei gleicher Enzymexpression durch die Metabolitenanalyse detektiert werden kann.

Pentosephosphatweg: Innerhalb dieses Weges war die Expression der 6-phospho-Gluconat-DH heraufreguliert. Aufgrund des Expressionsanstieges dieses Enzyms wird eine verstärkte Aktivität im nicht-oxidativen, irreversiblen Teil dieses Stoffwechselweges postuliert. Dies würde für eine erhöhte Konzentration von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH sorgen, welche u. a. für die Regeneration von Glutathion mit Hilfe der Glutathionreduktase benötigt wird. Damit könnte indirekt die erhöhte Glutathionkonzentration in den onkogenen Transformanten erklärt werden (siehe 3.5.2).

Des Weiteren war die Expression der Acetyl-CoA-acetyltransferase in den mit onkogenem *K-ras*-transfizierten Zellen im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle und Parentalzelllinie um mehr als das doppelte verringert. Da dieses Protein den ersten Schritt der Ketonkörperbiosynthese katalysiert, spricht seine Minderexpression für eine Stilllegung dieses Stoffwechselweges in den onkogenen Transformanten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die veränderte Expression der metabolischen Enzyme auf eine Umprogrammierung des Stoffwechsels durch onkogenes K-RAS hindeutet.

4.3.2.5 Oxidoreduktasen

Knapp 10 % der differentiell exprimierten Proteine katalysieren Redoxreaktionen. Die differentielle Expression dieser Proteingruppe besitzt für die onkogene Transformation funktionelle Relevanz, da mehrere Studien die Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) für die Induktion und Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps zeigen konnten (Sundaresan, M. *et al.*, 1996; Irani, K. *et al.*, 1997). Dieser Prozess wird durch die Rac-GTPase reguliert: Sundaresan und Mitarbeiter wiesen in NIH3T3-Zellen eine Steigerung der intrazellulären ROS-Spiegel nach transienter Überexpression von konstitutiv aktivem RAS oder Rac1 nach. Außerdem konnte der Anstieg des ROS-Niveaus durch die Expression eines dominant-negativen Rac-Allels inhibiert werden (Sundaresan, M. *et al.*, 1996). Eine weitere Untersuchung zeigte, dass bestimmte phänotypische Eigenschaften, die durch die RAS-vermittelte Transformation hervorgerufen werden, durch RNS-Interferenz gesteuerte Expressionsblockierung des Superoxid-erzeugenden Enzyms Nox1 verhindert werden. Die Expression dieser Oxidase wird durch die RAS-abhängige konstitutive Aktivierung des MAPK-Weges hochreguliert (Mitsushita, J. *et al.*, 2004). Des Weiteren können dauerhaft niedrige ROS-Spiegel die Karzinogenese einleiten, da ROS oxidative Modifikationen der DNS-Basen verursachen, die zu Genmutationen führen können (Dreher, D. und Junod, A. F., 1996). Darüber hinaus scheinen bestimmte ROS-Konzentrationen für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps notwendig zu sein, da die Zugabe des Antioxidans Catechol die Proliferation einer malignen Zelllinie auf Weichagar beeinträchtigte (Jurgensmeier, J. M. *et al.*, 1997). Vor diesem Hintergrund müssen Onkogen-transformierte Zellen für ein Äquilibrium zwischen oxidativem Stress und einer für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps ausreichend „hohen“ ROS-Konzentration sorgen. In diesem Zusammenhang stellen die verstärkte Katalase-Expression sowie die tendenzielle Heraufregulation der Cu/Zn-Superoxiddismutase (Cu/Zn-SOD) in den Zelllinien G12V und G13D zusammen mit dem Anstieg der zellulären Glutathionkonzentration (siehe Kap. 3.5.2) und der postulierten Stoffwechselumstellung (siehe Kap. 4.3.2.4) potentielle Mechanismen zur Stabilisierung der Redoxhomöostase in den K-RAS-transformierten Zellen dar. In Abb. 4.3 ist dieses Modell zur Herstellung des Redoxgleichgewichtes von nicht-transformierten und transformierten Zellen einander gegenübergestellt. Eine vermehrte Katalase-Expression konnte beim Vergleich mehrerer

Pankreaskarzinomzelllinien mit einer wildtypischen Pankreaszelllinie gefunden werden (Cullen, J. J. *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass das Pankreaskarzinom die Tumorentität mit der höchsten Inzidenz für *K-ras*-Mutationen darstellt (Bos, J. L., 1989). Die parallele Heraufregulation von Cu/Zn-SOD und Katalase korreliert mit Arbeiten, die die Bedeutung der gemeinsamen Expression dieser anti-oxidativen Enzyme für den Schutz vor ROS nachwiesen (Amstad, P. *et al.*, 1991).

4.4 Funktionelle Analyse K-RAS-modulierter Proteine

Die Identifizierung bestimmter differentiell exprimierter Proteine lieferte die Basis für hypothesengesteuerte funktionelle Analysen. Mit Hilfe von Zytotoxizitäts- und Proliferationsanalysen sowie Bestimmungen der Aktivität bestimmter Effektorcaspasen konnte dabei eine verstärkte Resistenz der Onkogen-transformierten Zellen gegen ROS und Xenobiotika evaluiert werden.

4.4.1 Onkogene *K-ras*-Überexpression induziert erhöhte Resistenz gegenüber ROS

Die gesteigerte Katalase-Expression sowie der durch die gesteigerte Expression von 6-Phospho-gluconatdehydrogenase scheinbar verstärkt aktivierte Pentosephosphatweg führten zu der Hypothese, dass die RAS-medierte Transformation eine erhöhte Toleranz gegenüber ROS induziert. Anhand der Modellsubstanz H₂O₂ konnte dabei eine verstärkte Resistenz der Zelllinien G12V und G13D mittels mikroskopischer Beobachtungen sowie durch Zytotoxizitätsanalysen festgestellt werden. Der Einfluss auf die Vitalität der Parentalzelllinie, der Leervektorkontrolle sowie der mit wildtypischem *K-ras*-transfizierten Fibroblasten war dabei konzentrationsabhängig. Für diese Resistenz gegen oxidativen Stress ist die Heraufregulation der Katalaseexpression zumindest teilweise verantwortlich, da es nach der siRNS-medierten Stilllegung zu einem starken Anstieg der Wasserstoffperoxid-vermittelten Zytotoxizität in den Zelllinien G12V und G13D kam. Überraschenderweise unterlag die Laktatdehydrogenase-Aktivität der Q61H-Zelllinie ebenfalls einer Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit und war nicht vor dem toxischen Einfluss des Wasserstoffperoxids geschützt. Dies mag mit der verringerten Adhärenz dieser Transfektante zusammenhängen, durch die möglicherweise eine größere Angriffsfläche für

Wasserstoffperoxid geboten wurde. Darüber hinaus wurde weder eine verstärkte Katalase- noch eine verstärkte SOD-Cu/Zn-Expression bei der Proteomanalyse dieser Zelllinie detektiert.

ROS besitzen in niedrigen und mittleren Konzentrationen Signaltransduktionsaktivität und tragen zur Tumorinitiation bei. Die erhöhte ROS-Resistenz reflektiert die Bedeutung dieser Mitogene für den Onkogen-transformierten Phänotyp (Dreher, D. und Junod, A. F., 1996; Genestra, M., 2007). Ohne geeignete Entgiftungssysteme wie beispielsweise das auf Glutathion-Peroxidase/Reduktase basierende System käme es daher zu ernsthaften Schäden innerhalb der Zelle sowie zur Einleitung des Apoptoseprogramms. Daher kann die Toleranz gegenüber H_2O_2 als Bestätigung für das in Abbildung 4.3 postulierte Modell der Redoxhomöostase betrachtet werden. Außerdem trägt die erhöhte ROS-Resistenz Onkogen-transformierter Zellen potentiell zum „Immune escape“ bei, da aktivierte Makrophagen verstärkt H_2O_2 produzieren, die tumorizid wirken können: So konnten Nathan und Koautoren (1979) nachweisen, dass die Makrophagen-gesteuerte Lyse einer Lymphomzelllinie durch die Zugabe von Katalase verhindert werden konnte, während SOD-Zugabe die zytolytische Aktivität nicht beeinträchtigte (Nathan, C. F. *et al.*, 1979).

Des Weiteren steht dieses Phänomen im Einklang mit den Untersuchungen an einer humanen H-RAS-transformierten ovariellen Epithelzelllinie. Die Aktivierung RAS-mediierter Signalwege führte dort zur verstärkten Expression von fünf Enzymen – Peroxiredoxin 3, Thioredoxin peroxidase, Ubiquinon FeS-DH, Selenophosphat synthetase sowie Glyoxalase I - die an der Regulation des Redoxgleichgewichts der Zelle beteiligt sind (Young, T. W. *et al.*, 2004). Damit wird die Resistenz gegenüber oxidativem Stress möglicherweise durch Isoform-spezifische Regulationsmechanismen verursacht. Eine andere Erklärungsmöglichkeit liegt in der unterschiedlichen Spezieszugehörigkeit des untersuchten Zellmodells. Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit mesenchymale Zellen verwendet und in der Arbeit von Young Zellen epithelialer Herkunft. Dennoch scheint die Heraufregulation der Gesamt-Antioxidations-Kapazität ein allgemeines Phänomen RAS-mediierter Transformation zu sein. Damit kann die erhöhte Toleranz gegenüber ROS für unser System zum einen mit der Heraufregulation der Katalase sowie der vergrößerten Glutathionkonzentration in den K-*ras*-Transfektanten (Kap. 3.5.2) erklärt werden.

Der zytotoxische Einfluss von Wasserstoffperoxid führte zu der Frage, ob in den Kontrollzelllinien Apoptose induziert wird. Die Bestimmung der Aktivität der Procaspasen 3 und 7 ergab eine signifikante Erhöhung der Caspase 3/7-Aktivität in der Parentalzelllinie sowie der Leervektorkontrollzelllinie. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der Studie von Young und Mitarbeitern überein, die eine durch H_2O_2 -induzierte Steigerung der Caspase 3-Aktivität detektierten (Young, T. W. *et al.*, 2004).

4.4.2 K-RAS induziert einen erhöhten Glutathionspiegel

Neben der enzymatischen Verteidigung gegenüber ROS verfügen Säugerzellen noch über die Möglichkeit diese über so genannte Antioxidantien wie α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Glutathion zu inaktivieren. Daher stellte sich die Frage, ob die verbesserte ROS-Detoxifizierung in Onkogen-transformierten Zellen auch durch den Redoxstatus reflektiert wird. Reduziertes Glutathion (γ -Glutamyl-cysteinyl-glycin) besitzt eine freie Sulfhydrylgruppe und stellt ein wichtiges Antioxidans in eukaryotischen Zellen dar. Es stellt Reduktionsäquivalente für die durch die Glutathionperoxidase katalysierte Reduktion von H_2O_2 zur Verfügung. Der intrazelluläre Glutathionspiegel kann daher als Indikator für den Schutz der Zelle vor ROS und anderen Xenobiotika genutzt werden.

Eine vermehrte Glutathionsynthese scheint des Weiteren ein Resistenzmechanismus bestimmter Tumoren zu sein (Barranco, S. C. *et al.*, 1990; Chen, E. I. *et al.*, 2007): So konnten Chen und Mitarbeiter (2007) zeigen, dass in Hirnmetastasen, die aus einem humanen Brustkrebsmodell abgeleitet wurden, die Glutathionkonzentration als Antwort auf den Proteasominhibitor Bortezomib signifikant gesteigert wurde. Darüber hinaus scheint die RAS-induzierte Zunahme der Glutathionkonzentration für die Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase transformierter Zellen von essentieller Bedeutung zu sein. So führte die Inhibierung der Glutathionsynthese zur Apoptoseinduktion in H-RAS-transformierten Fibroblasten (Chuang, J. I. *et al.*, 2003). Weiterhin ist zu erwähnen, dass mehrere Arbeiten eine Erhöhung des Glutathionspiegels in verschiedenen Tumorentitäten nachwiesen: So war der durchschnittliche Gesamtglutathiongehalt zwischen normaler Mukosa und Kolonkarzinomzellen in einer Studie annähernd verdoppelt (Mekhail-Ishak, K. *et al.*, 1989). Vergleichbare Glutathionproportionen zwischen Tumor- und Normalgewebe wurden ferner in Brust-, Kopf/Hals-, Lungen- und Hirntumoren gefunden (Perry, R. R.

et al., 1993). Die Ergebnisse der genannten Studien stimmen mit dem *in vitro*-Modell der vorliegenden Arbeit überein: Die Glutathionkonzentration war nach wildtypischer *K-ras*-Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzelllinien etwa verdoppelt, während in den onkogenen K-RAS-Transformanten durchschnittlich etwa eine Verdreifachung detektiert werden konnte. Die erhöhte Glutathionkonzentration trägt potentiell zu dem in Abb. 4.3 postulierten Mechanismus der Redoxhomöostase in den K-RAS-transformierten Zellen bei.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die hier beobachtete Zunahme der Glutathionkonzentration für die Erhaltung des Redoxgleichgewichtes und die Xenobiotikaresistenz der K-RAS-transformierten Zellen eine wichtige Bedeutung hat, die scheinbar ein generelles Phänomen maligner Zellen darstellt.

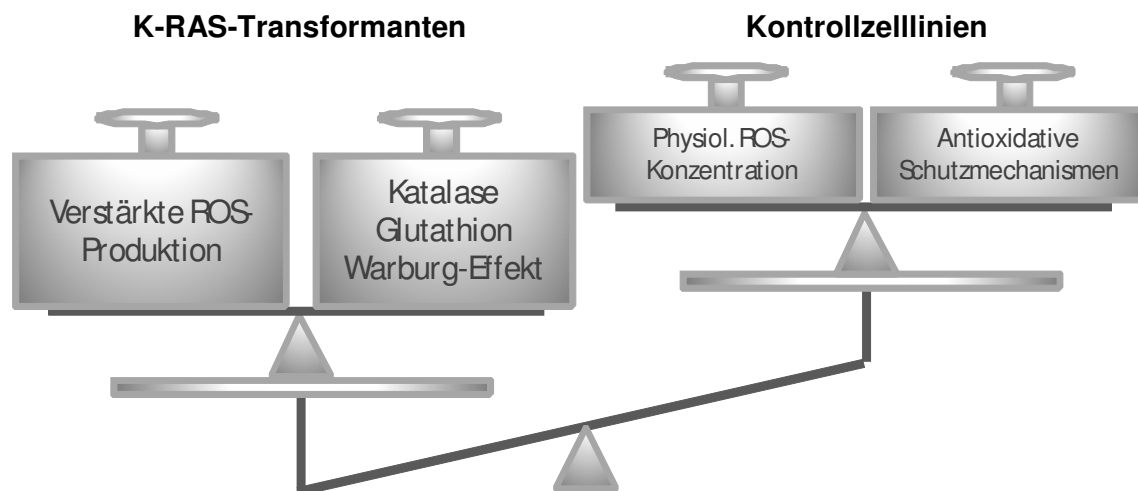


Abb. 4.3: Vergleich der postulierten Mechanismen zur Herstellung des Redoxgleichgewichtes nach K-RAS-Transformation.

Zur Verhinderung zellulärer Schäden aufgrund der verstärkten ROS-Konzentration wird in den K-RAS-Transformanten im Vergleich zu den Kontrollzelllinien verstärkt Katalase und Glutathion exprimiert. Außerdem wird durch die verstärkte glykolytische Aktivität (Warburg-Effekt) in diesen Zellen vermehrt Pyruvat produziert, das als Antioxidans wirken kann.

4.4.3 Resistenz K-RAS-transformierter Zellen gegen Formaldehyd

Neben der erhöhten Resistenz gegenüber ROS kann die vergrößerte Glutathionkonzentration auch als Erklärungsmöglichkeit für die gesteigerte Toleranz der *K-ras*-Transfektanten gegenüber Formaldehyd herangezogen werden, da Glutathion spontan mit Formaldehyd zu S-hydroxymethyl-Glutathion reagieren kann (Abb. 4.4). Dieses Intermediat stellt ein Substrat für die zytosolische Klasse III Alkoholdehydrogenase ADH3 dar, die für die Umwandlung in S-formyl-Glutathion sorgt. Im letzten Schritt dieses Formaldehydabbauweges katalysiert Esterase D die

Spaltung zu Ameisensäure und Glutathion. Esterase D war in den Onkogen-transformierten Fibroblasten hochreguliert, was für eine Induktion dieses Abbauweges durch K-RAS-vermittelte Signalkaskaden spricht. Der direkte Einfluss von Esterase D auf die Toleranz gegen Formaldehyd konnte durch RNS-Interferenzanalysen bestätigt werden. Interessanterweise war nach Supprimierung der Esterase D-Expression in der Zelllinie Wt keine Steigerung der Sensitivität gegen den zytotoxischen Einfluss von Formaldehyd zu beobachten. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf das nicht-veränderte Expressionsniveau in dieser Zelllinie zurückzuführen. Säugerzellen können Formaldehyd neben dem o. g. Weg auch direkt über die mitochondriale Aldehyddehydrogenase II (AIDH2) zu Ameisensäure unter dem Gewinn eines NADH-Moleküls oxidieren (Abb. 4.4) oder es mit der zytosolischen Alkoholdehydrogenase I unter Verbrauch eines NADH-Moleküls zu Methanol reduzieren (Teng, S. *et al.*, 2001). Die Induktion des ADH III-Abbauweges bietet den Transformanten aber den Vorteil, dass ein Reduktionsäquivalent in Form von NADH gewonnen wird, da das anfangs verbrauchte Glutathionmolekül im letzten Schritt des Abbauweges rekonstituiert wird. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass auch eine Mehrexpression der ADH III-Transkriptmenge in den Zelllinien G12V und G13D detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Lokalisation im Mitochondrium stellt die Induktion des Abbauweges durch AIDH2 keine Alternative dar, da sonst zahlreiche zytosolische Proteine durch Formaldehyd geschädigt werden könnten.

Weiterhin bietet die K-RAS-Induktion dieses Stoffwechselweges eine Erklärungsmöglichkeit für die hohe Letalität von Adenokarzinomen der Lunge und des Pankreas bei Rauchern (Schuller, H. M., 2002), da die Tumorzellen bei diesen Kasi einen zusätzlichen Wachstums-/ Überlebensvorteil hätten. Für diese Assoziation sprechen mehrere Studien, die eine erhöhte Frequenz von *ras*-Mutationen in Lungentumorläsionen von Rauchern nachwiesen (Slebos, R. J. *et al.*, 1991; Rodenhuis, S. und Slebos, R. J., 1992). Diese Hypothese wird durch die Proliferationsbeeinträchtigung der Parentalzelllinie in Gegenwart von Formaldehyd gestützt.

Im Gegensatz zu Wasserstoffperoxid äußerte sich der beobachtete zytotoxische Einfluss des Formaldehyds auf die Parentalzelllinie und die Leervektorkontrollzelllinie nicht in einer gesteigerten Caspaseaktivität (Daten nicht gezeigt). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Formaldehyd quervernetzte Proteinstrukturen induzieren kann (Feldman, M. Y., 1973), die in diesem Fall möglicherweise zum Verlust der katalytischen Eigenschaften der Proeffektorcaspasen führen. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit für den zytotoxischen Einfluss dieses Xenobiotikums bestünde in der Nekrose-Induktion.

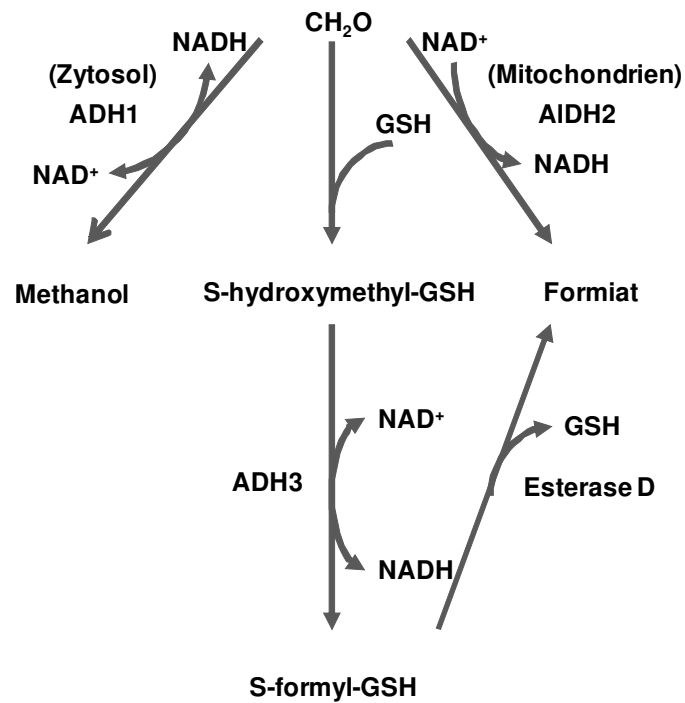


Abb. 4.4: Formaldehydmetabolismus nach Teng *et al.* (2001).
 ADH, Alkoholdehydrogenase; AIDH, Aldehyddehydrogenase; GSH, Glutathion.

5 Zusammenfassung

RAS-Proteine üben als molekulare Wechselschalter durch die Interaktion mit mehreren Signalkaskaden einen pleiotropen Effekt auf die Genexpression aus. Für die Identifizierung der modulierten Gene stellen Hochdurchsatzverfahren ein geeignetes Mittel dar. Dazu konnten in der vorliegenden Arbeit, ausgehend von einem systembiologischen Ansatz zur Dissektion der durch konstitutiv aktives K-RAS-perturbierten Signaltransduktion unter Verwendung der 2-DE ca. 50 regulierte Proteine identifiziert werden. Die differentiell exprimierten Genprodukte konnten v. a. folgenden Kategorien zugeordnet werden: Chaperone, metabolische Enzyme, Oxidoreduktasen sowie Proteine, die an der Steuerung von Expressionsprozessen beteiligt sind. Basierend auf der Identifizierung der modulierten Zielstrukturen war es möglich, mehrere hypothesengesteuerte Modelle zu bearbeiten, die einen veränderten ROS- und Xenobiotikametabolismus bestimmter K-RAS-Transformanten aufzeigen konnten. Die durchgeführten funktionellen Analysen konnten eine verstärkte Resistenz gegen oxidativen Stress und Formaldehyd der K-RAS-transformierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen bestätigen. Außerdem konnte die direkte Beteiligung der differentiell exprimierten Enzyme Katalase und Esterase D mittels RNS-Interferenz an der Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase bzw. dem Formaldehydmetabolismus in den onkogenen Transformanten nachgewiesen werden.

Die Überexpression von Onkogenen ist häufig mit einer defizienten MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression assoziiert, die eine geringere Sensitivität dieser Zellen gegenüber einer ZTL-vermittelten Lyse zur Folge haben kann. In diesem Zusammenhang konnte eine K-RAS-vermittelte Minderexpression der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nachgewiesen werden. Durch die Analyse der Antigenprozessierungskomponenten konnte auf mRNA- und Proteinebene eine signifikante Verringerung der Tapasinexpression als potentielle Ursache für die defiziente Klasse-I-Membranexpression identifiziert werden. Die reduzierte Expression dieses Chaperons hatte eine Destabilisierung des ABC-Transporterproteins TAP zur Folge. Der Ausfall dieser beiden Komponenten stellt damit einen putativen Mechanismus für den „Immune escape“ K-RAS-mutierter Tumore dar.

6 **Ausblick**

Die Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine stellt den Ausgangspunkt für eine Übertragung auf humane Tumorzelllinien dar, wo diese Strukturen – nach entsprechender Validierung – als potentielle diagnostische oder prognostische Marker eingesetzt werden könnten. Des Weiteren könnten sie als mögliche Zielstrukturen für pharmazeutische Eingriffe genutzt werden.

In dieser Arbeit wurden v. a. Gesamtzelllysate hoher Komplexität untersucht. Aufgrund dieser Herangehensweise und den technischen Limitationen der 2-DE konnte daher vermutlich nur ein Teil der modulierten K-RAS-Zielstrukturen dargestellt werden. Um mit dem etablierten Zellsystem weitere durch K-RAS regulierte Proteine identifizieren zu können, sollten zur Verringerung der Probenkomplexität Subproteomanalysen durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang ist v. a. das Membranproteom hervorzuheben, dessen Darstellung, aufgrund der hohen Hydrophobizität seiner Komponenten, mittels klassischer 2-DE problematisch ist. Hierzu könnte durch den Einsatz von gellosen Ansätzen mittels LC-MS/MS in Kombination mit geeigneten Quantifizierungsmethoden, wie z. B. ICPL und SILAC, auch die Expression membranständiger Proteine analysiert werden.

Neben der Analyse von Expressionsunterschieden wäre auch die Identifizierung von K-RAS-abhängigen posttranslationalen Modifikationen von Interesse. Zu einem besseren Verständnis der entkoppelten Signaltransduktion könnte v. a. die Untersuchung des Phosphoproteoms der onkogenen Transfektanten im Vergleich zu den Kontrollzellen beitragen, beispielsweise durch 2D-Western Blot-Analysen mit phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörpern oder mittels LC-MS/MS-Ansätzen nach einer Affinitätsanreicherung proteolytisch erzeugter Phosphopeptide.

Zur weiteren Charakterisierung des putativen „Immune escape“-Phänotyps könnte die ZTL-medierte Lyse in den K-RAS-Transformanten in einem Zytotoxizitätsexperiment überprüft werden. Weiterhin könnten Promotoranalysen für die Aufklärung der verringerten Tapasinexpression in Betracht gezogen werden.

7 Literatur

Al-Mulla, F., *et al.* (1999). Structural differences between valine-12 and aspartate-12 Ras proteins may modify carcinoma aggression. *J Pathol* 187(4): 433-438.

Amstad, P., *et al.* (1991). The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* 30(38): 9305-9313.

Andreyev, H. J., *et al.* (2001). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 85(5): 692-696.

Androlewicz, M. J. & Cresswell, P. (1994). Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* 1(1): 7-14.

Antoniou, A. N., *et al.* (2003). Assembly and export of MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 15(1): 75-81.

Apolloni, A., *et al.* (2000). H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol* 20(7): 2475-2487.

Atkins, D., *et al.* (2004). MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 109(2): 265-273.

Bader, A. G., *et al.* (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 5(12): 921-929.

Bamford, S., *et al.* (2004). The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* 91(2): 355-358.

Barranco, S. C., *et al.* (1990). Changes in glutathione content and resistance to anticancer agents in human stomach cancer cells induced by treatments with melphalan *in vitro*. *Cancer Res* 50(12): 3614-3618.

Bazan, V., *et al.* (2002). Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol* 13(9): 1438-1446.

Belich, M. P., *et al.* (1994). Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr Biol* 4(9): 769-776.

Belicha-Villanueva, A., *et al.* (2008). Differential contribution of TAP and tapasin to HLA class I antigen expression. *Immunology*.

Beurel, E. & Jope, R. S. (2006). The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 79(4): 173-189.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.

- Bivona, T. G., *et al.* (2006). PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell* 21(4): 481-493.
- Blachere, N. E., *et al.* (1997). Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted *in vitro*, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med* 186(8): 1315-1322.
- Blume-Jensen, P. & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411(6835): 355-365.
- Bodemann, B. O. & White, M. A. (2008). Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform. *Nat Rev Cancer* 8(2): 133-140.
- Bonner, T. I., *et al.* (1985). Structure and biological activity of human homologs of the raf/mil oncogene. *Mol Cell Biol* 5(6): 1400-1407.
- Borradaile, N. M., *et al.* (2006). A critical role for eukaryotic elongation factor 1A-1 in lipotoxic cell death. *Mol Biol Cell* 17(2): 770-778.
- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49(17): 4682-4689.
- Bos, J. L. (1998). All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J* 17(23): 6776-6782.
- Bos, J. L., *et al.* (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129(5): 865-877.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brand, K. (1997). Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield. *J Bioenerg Biomembr* 29(4): 355-364.
- Brock, T. D., *et al.* (1994). *Biology of Microorganisms*. 7th ed., Prentice Hall Inc. London.
- Brockmann, R., *et al.* (2007). Posttranscriptional expression regulation: what determines translation rates? *PLoS Comput Biol* 3(3): e57.
- Carpenter, B., *et al.* (2006). The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. *Biochim Biophys Acta* 1765(2): 85-100.
- Casey, P. J. & Seabra, M. C. (1996). Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* 271(10): 5289-5292.
- Chefalo, P. J., *et al.* (2003). Tapasin^{-/-} and TAP1^{-/-} macrophages are deficient in vacuolar alternate class I MHC (MHC-I) processing due to decreased MHC-I stability at phagolysosomal pH. *J Immunol* 170(12): 5825-5833.

- Chen, E. I., *et al.* (2007). Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases. *Cancer Res* 67(4): 1472-1486.
- Choy, E., *et al.* (1999). Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98(1): 69-80.
- Christofk, H. R., *et al.* (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452(7184): 230-233.
- Chuang, J. I., *et al.* (2003). Glutathione depletion-induced apoptosis of Ha-ras-transformed NIH3T3 cells can be prevented by melatonin. *Oncogene* 22(9): 1349-1357.
- Cohen, S. N., *et al.* (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(8): 2110-2114.
- Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004(250): RE13.
- Copeland, N. G. & Cooper, G. M. (1979). Transfection by exogenous and endogenous murine retrovirus DNAs. *Cell* 16(2): 347-356.
- Cowley, S., *et al.* (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77(6): 841-852.
- Cox, A. D. & Der, C. J. (1997). Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras? *Biochim Biophys Acta* 1333(1): F51-71.
- Cuevas, B. D., *et al.* (2001). Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 276(29): 27455-27461.
- Cullen, J. J., *et al.* (2003). The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 63(6): 1297-1303.
- Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116(2): 205-219.
- Datta, S. R., *et al.* (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91(2): 231-241.
- Daum, G., *et al.* (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 19(11): 474-480.
- Delp, K., *et al.* (2000). Functional deficiencies of components of the MHC class I antigen pathway in human tumors of epithelial origin. *Bone Marrow Transplant* 25 Suppl 2: S88-95.
- Dick, T. P., *et al.* (1996). Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86(2): 253-262.

- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3(1): 11-22.
- Dreher, D. & Junod, A. F. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 32A(1): 30-38.
- Edkins, S., *et al.* (2006). Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 5(8): 928-932.
- Ehrlich, T., *et al.* (1993). The effect of H-ras expression on tumorigenicity and immunogenicity of Balb/c 3T3 fibroblasts. *Immunol Lett* 39(1): 3-8.
- Ellis, C. A. & Clark, G. (2000). The importance of being K-Ras. *Cell Signal* 12(7): 425-434.
- Esteban, L. M., *et al.* (2001). 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(5): 1444-1452.
- Feldman, M. Y. (1973). Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 13: 1-49.
- Felgner, P. L., *et al.* (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21): 7413-7417.
- Feng, J., *et al.* (2001). Upregulation of non-mutated H-ras and its upstream and downstream signaling proteins in colorectal cancer. *Oncol Rep* 8(6): 1409-1413.
- Fiordalisi, J. J., *et al.* (2003). High affinity for farnesyltransferase and alternative prenylation contribute individually to K-Ras4B resistance to farnesyltransferase inhibitors. *J Biol Chem* 278(43): 41718-41727.
- Fire, A., *et al.* (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-811.
- Friday, B. B. & Adjei, A. A. (2005). K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1756(2): 127-144.
- Garbi, N., *et al.* (2000). Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat Immunol* 1(3): 234-238.
- Garbi, N., *et al.* (2003). A major role for tapasin as a stabilizer of the TAP peptide transporter and consequences for MHC class I expression. *Eur J Immunol* 33(1): 264-273.
- Genestra, M. (2007). Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* 19(9): 1807-1819.
- Gevaert, K. & Vandekerckhove, J. (2000). Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* 21(6): 1145-1154.

- Gharahdaghi, F., *et al.* (1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20(3): 601-605.
- Gimona, M. (2008). The microfilament system in the formation of invasive adhesions. *Semin Cancer Biol* 18(1): 23-34.
- Gomez, G. A. & Daniotti, J. L. (2007). Electrical properties of plasma membrane modulate subcellular distribution of K-Ras. *Febs J* 274(9): 2210-2228.
- Goodwin, J. S., *et al.* (2005). Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J Cell Biol* 170(2): 261-272.
- Gorg, A., *et al.* (1998). Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient. *Electrophoresis* 19(8-9): 1516-1519.
- Griffith, O. W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 27(9-10): 922-935.
- Grimes, C. A. & Jope, R. S. (2001). CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem* 78(6): 1219-1232.
- Guerrero, S., *et al.* (2000). K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res* 60(23): 6750-6756.
- Guerrero, S., *et al.* (2002). Codon 12 and codon 13 mutations at the K-ras gene induce different soft tissue sarcoma types in nude mice. *Faseb J* 16(12): 1642-1644.
- Gygi, S. P., *et al.* (2000). Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17): 9390-9395.
- Hahn, W. C., *et al.* (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400(6743): 464-468.
- Hammond, C. & Helenius, A. (1995). Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7(4): 523-529.
- Han, M., *et al.* (1993). C. elegans lin-45 raf gene participates in let-60 ras-stimulated vulval differentiation. *Nature* 363(6425): 133-140.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-580.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Hancock, J. F. (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(5): 373-384.

- Hancock, J. F., *et al.* (1991). A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO J* 10(13): 4033-4039.
- Harvey, J. J. (1964). An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* 204: 1104-1105.
- Hayashi, Y., *et al.* (2005). Excess biglycan causes eyelid malformation by perturbing muscle development and TGF-alpha signaling. *Dev Biol* 277(1): 222-234.
- Heinicke, T., *et al.* (2000). Retroviral gene transfer of dominant negative raf-1 mutants suppresses ha-ras-induced transformation and delays tumor formation. *Cancer Gene Ther* 7(5): 697-706.
- Herrmann, F., *et al.* (2004). HER-2/neu-mediated regulation of components of the MHC class I antigen-processing pathway. *Cancer Res* 64(1): 215-220.
- Hoa, M., *et al.* (2002). Amplification of wild-type K-ras promotes growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 62(24): 7154-7156.
- Hoving, S., *et al.* (2002). Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *Proteomics* 2(2): 127-134.
- Hug, C., *et al.* (1995). Capping protein levels influence actin assembly and cell motility in dictyostelium. *Cell* 81(4): 591-600.
- Irani, K., *et al.* (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275(5306): 1649-1652.
- Ivaska, J., *et al.* (2007). Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res* 313(10): 2050-2062.
- Jackson, J. H., *et al.* (1994). Polylysine domain of K-ras 4B protein is crucial for malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26): 12730-12734.
- Jackson, R. J., *et al.* (1990). The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem Sci* 15(12): 477-483.
- Jainchill, J. L. *et al.* (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells *J Virol* 4(5): 549-553.
- Janda, E., *et al.* (2002). Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 156(2): 299-313.
- Jaumot, M., *et al.* (2002). The linker domain of the Ha-Ras hypervariable region regulates interactions with exchange factors, Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 277(1): 272-278.
- Jeuken, J., *et al.* (2007). RAS/RAF pathway activation in gliomas: the result of copy number gains rather than activating mutations. *Acta Neuropathol* 114(2): 121-133.

- Ji, H., *et al.* (2007). Analysis of Ras-induced oncogenic transformation of NIH-3T3 cells using differential-display 2-DE proteomics. *Electrophoresis* 28(12): 1997-2008.
- Jin, B. F., *et al.* (2006). Proteomics analysis reveals insight into the mechanism of H-Ras-mediated transformation. *J Proteome Res* 5(10): 2815-2823.
- Johnsen, A. K., *et al.* (1999). Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol* 163(8): 4224-4231.
- Johnson, L., *et al.* (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* 11(19): 2468-2481.
- Jurgensmeier, J. M., *et al.* (1997). Reactive oxygen species as mediators of the transformed phenotype. *Int J Cancer* 70(5): 587-589.
- Kienast, A., *et al.* (2007). Redox regulation of peptide receptivity of major histocompatibility complex class I molecules by ERp57 and tapasin. *Nat Immunol* 8(8): 864-872.
- Kirsten, W. H. & Mayer, L. A. (1967). Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst* 39(2): 311-335.
- Kisselev, A. F., *et al.* (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 274(6): 3363-3371.
- Knight, C. G., *et al.* (2004). Global analysis of predicted proteomes: functional adaptation of physical properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(22): 8390-8395.
- Koch, J. & Tampe, R. (2006). The macromolecular peptide-loading complex in MHC class I-dependent antigen presentation. *Cell Mol Life Sci* 63(6): 653-662.
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2: 289-305.
- Kolch, W., *et al.* (1991). Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature* 349(6308): 426-428.
- Korf, B. R. (2000). Malignancy in neurofibromatosis type 1. *Oncologist* 5(6): 477-485.
- Kozma, L., *et al.* (1997). Investigation of c-myc and K-ras amplification in renal clear cell adenocarcinoma. *Cancer Lett* 111(1-2): 127-131.
- Kramer, A. (1996). The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem* 65: 367-409.
- Kranenburg, O., *et al.* (2001). Regulating c-Ras function. cholesterol depletion affects caveolin association, GTP loading, and signaling. *Curr Biol* 11(23): 1880-1884.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

- Land, H., *et al.* (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304(5927): 596-602.
- Lehner, P. J., *et al.* (1998). Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity* 8(2): 221-231.
- Leicht, D. T., *et al.* (2007). Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1196-1212.
- Lerner, E. C., *et al.* (1997). Inhibition of the prenylation of K-Ras, but not H- or N-Ras, is highly resistant to CAAX peptidomimetics and requires both a farnesyltransferase and a geranylgeranyltransferase I inhibitor in human tumor cell lines. *Oncogene* 15(11): 1283-1288.
- Lichtenfels, R., *et al.* (2003). Identification of metabolic enzymes in renal cell carcinoma utilizing PROTEOMEX analyses. *Biochim Biophys Acta* 1646(1-2): 21-31.
- Lohmann, S., *et al.* (1996). Multiple levels of MHC class I down-regulation by ras oncogenes. *Scand J Immunol* 43(5): 537-544.
- Lollini, P. L., *et al.* (1998). Down regulation of major histocompatibility complex class I expression in mammary carcinoma of HER-2/neu transgenic mice. *Int J Cancer* 77(6): 937-941.
- Lowe, J., *et al.* (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268(5210): 533-539.
- Lu, X., *et al.* (1994). Genetic and molecular analyses of mutations involved in *Drosophila* raf signal transduction. *EMBO J* 13(11): 2592-2599.
- Macaluso, M., *et al.* (2002). Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol* 192(2): 125-130.
- Malumbres, M. & Pellicer, A. (1998). RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3: d887-912.
- Mann, M., *et al.* (2001). Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 70: 437-473.
- Mansour, S. J., *et al.* (1994). Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265(5174): 966-970.
- Mazurek, S., *et al.* (2001). Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene* 20(47): 6891-6898.
- McCormick, F. (1998). Going for the GAP. *Curr Biol* 8(19): R673-674.
- Meissner, M., *et al.* (2005). Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 11(7): 2552-2560.

- Mejillano, M. R., *et al.* (2004). Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* 118(3): 363-373.
- Mekhail-Ishak, K., *et al.* (1989). Implications for therapy of drug-metabolizing enzymes in human colon cancer. *Cancer Res* 49(17): 4866-4869.
- Milburn, M. V., *et al.* (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 247(4945): 939-945.
- Mitsushita, J., *et al.* (2004). The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation. *Cancer Res* 64(10): 3580-3585.
- Momburg, F. & Tan, P. (2002). Tapasin-the keystone of the loading complex optimizing peptide binding by MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Mol Immunol* 39(3-4): 217-233.
- Mullis, K., *et al.* (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Nathan, C. F., *et al.* (1979). Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. *J Exp Med* 149(1): 100-113.
- Neuhoff, V., *et al.* (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9(6): 255-262.
- Newbold, R. F. & Overell, R. W. (1983). Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene. *Nature* 304(5927): 648-651.
- Nicolaidis, A., *et al.* (1994). Gene amplification and multiple mutations of the K-ras oncogene in Kaposi's sarcoma. *Anticancer Res* 14(3A): 921-926.
- Olsson, I., *et al.* (2002). Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension. *Proteomics* 2(11): 1630-1632.
- Omerovic, J., *et al.* (2008). Ras isoform abundance and signalling in human cancer cell lines. *Oncogene* 27(19): 2754-2762.
- Omerovic, J., *et al.* (2007). Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci.* 64(19-20): 2575-89.
- Ortmann, B., *et al.* (1997). A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 277(5330): 1306-1309.
- Owen, O. E., *et al.* (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* 277(34): 30409-30412.

- Paduch, M., *et al.* (2001). Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol* 48(4): 829-850.
- Park, J. W., *et al.* (2006). A proteomic approach for unraveling the oncogenic H-Ras protein networks in NIH/3T3 mouse embryonic fibroblast cells. *Proteomics* 6(4): 1175-1186.
- Parton, R. G. & Hancock, J. F. (2004). Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol* 14(3): 141-147.
- Paulsson, K. M. & Wang, P. (2004). Quality control of MHC class I maturation. *Faseb J* 18(1): 31-38.
- Perry, R. R., *et al.* (1993). Glutathione levels and variability in breast tumors and normal tissue. *Cancer* 72(3): 783-787.
- Prior, I. A. & Hancock, J. F. (2001). Compartmentalization of Ras proteins. *J Cell Sci* 114(Pt 9): 1603-1608.
- Prior, I. A., *et al.* (2001). GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* 3(4): 368-375.
- Prior, I. A., *et al.* (2003). Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol* 160(2): 165-170.
- Pulciani, S., *et al.* (1985). ras gene Amplification and malignant transformation. *Mol Cell Biol* 5(10): 2836-2841.
- Qin, Z., *et al.* (2002). Increased tumorigenicity, but unchanged immunogenicity, of transporter for antigen presentation 1-deficient tumors. *Cancer Res* 62(10): 2856-2860.
- Rabilloud, T., *et al.* (1997). Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18(3-4): 307-316.
- Rabilloud, T., *et al.* (2001). A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 1(5): 699-704.
- Rajalingam, K., *et al.* (2007). Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1177-1195.
- Rees, S., *et al.* (1996). Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques* 20(1): 102-104, 106, 108-110.
- Rivoltini, L., *et al.* (2003). Human tumor-derived heat shock protein 96 mediates *in vitro* activation and *in vivo* expansion of melanoma- and colon carcinoma-specific T cells. *J Immunol* 171(7): 3467-3474.

- Robert, J., *et al.* (1999). Cell surface expression of the endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is phylogenetically conserved. *J Immunol* 163(8): 4133-4139.
- Roberts, M. L., *et al.* (2006). Microarray analysis of the differential transformation mediated by Kirsten and Harvey Ras oncogenes in a human colorectal adenocarcinoma cell line. *Int J Cancer* 118(3): 616-627.
- Rocks, O., *et al.* (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* 307(5716): 1746-1752.
- Rodenhuis, S. (1992). ras and human tumors. *Semin Cancer Biol* 3(4): 241-247.
- Rodenhuis, S. & Slebos, R. J. (1992). Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 52(9 Suppl): 2665s-2669s.
- Rodriguez-Viciano, P., *et al.* (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370(6490): 527-532.
- Rodriguez-Viciano, P., *et al.* (1996). Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J* 15(10): 2442-2451.
- Roy, M. O., *et al.* (2000). Mutational and biochemical analysis of plasma membrane targeting mediated by the farnesylated, polybasic carboxy terminus of K-ras4B. *Biochemistry* 39(28): 8298-8307.
- Roy, S., *et al.* (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1(2): 98-105.
- Sadasivan, B., *et al.* (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5(2): 103-114.
- Sambrook, J., *et al.* (eds.) (1989). *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samowitz, W. S., *et al.* (2000). Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9(11): 1193-1197.
- Scheele, J. S., *et al.* (1995). Determination of absolute amounts of GDP and GTP bound to Ras in mammalian cells: comparison of parental and Ras-overproducing NIH 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(4): 1097-1100.
- Scheffzek, K., *et al.* (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277(5324): 333-338.
- Schoenhals, G. J., *et al.* (1999). Retention of empty MHC class I molecules by tapasin is essential to reconstitute antigen presentation in invertebrate cells. *EMBO J* 18(3): 743-753.
- Schubbert, S., *et al.* (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7(4): 295-308.

- Schuller, H. M. (2002). Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Rev Cancer* 2(6): 455-463.
- Seliger, B., *et al.* (1997). Analysis of the MHC class I antigen presentation machinery in human embryonal carcinomas: evidence for deficiencies in TAP, LMP and MHC class I expression and their upregulation by IFN-gamma. *Scand J Immunol* 46(6): 625-632.
- Seliger, B., *et al.* (1998). Down-regulation of the MHC class I antigen-processing machinery after oncogenic transformation of murine fibroblasts. *Eur J Immunol* 28(1): 122-133.
- Seliger, B., *et al.* (1996). Reduced membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression. *Clin Cancer Res* 2(8): 1427-1433.
- Seliger, B., *et al.* (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 21(9): 455-464.
- Seliger, B. & Pfizenmaier, K. (1989). Post-transcriptional downregulation of MHC class I expression in oncogene-transformed cells is reverted by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunogenet* 16(4-5): 315-320.
- Seliger, B., *et al.* (2001). Downregulation of the constitutive tapasin expression in human tumor cells of distinct origin and its transcriptional upregulation by cytokines. *Tissue Antigens* 57(1): 39-45.
- Shevchenko, A., *et al.* (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68(5): 850-858.
- Shih, C., *et al.* (1981). Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290(5803): 261-264.
- Shih, C., *et al.* (1979). Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(11): 5714-5718.
- Shimizu, K., *et al.* (1983). Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(2): 383-387.
- Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269(51): 32678-32684.
- Simons, K. & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 31-39.
- Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175(23): 720-731.

- Slebos, R. J., *et al.* (1991). Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst* 83(14): 1024-1027.
- Spandidos, D. A. & Wilkie, N. M. (1984). Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 310(5977): 469-475.
- Srivastava, P. (2002). Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 20: 395-425.
- Stanton, V. P., Jr., *et al.* (1989). Definition of the human raf amino-terminal regulatory region by deletion mutagenesis. *Mol Cell Biol* 9(2): 639-647.
- Stepensky, D., *et al.* (2007). Aggregate formation by ERp57-deficient MHC class I peptide-loading complexes. *Traffic* 8(11): 1530-1542.
- Sundaresan, M., *et al.* (1996). Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J* 318 (Pt 2): 379-382.
- Symons, M. (1995). The Rac and Rho pathways as a source of drug targets for Ras-mediated malignancies. *Curr Opin Biotechnol* 6(6): 668-674.
- Takai, Y., *et al.* (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81(1): 153-208.
- Tan, P., *et al.* (2002). Recruitment of MHC class I molecules by tapasin into the transporter associated with antigen processing-associated complex is essential for optimal peptide loading. *J Immunol* 168(4): 1950-1960.
- Tchernitsa, O. I., *et al.* (2004). Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells. *Oncogene* 23(26): 4536-4555.
- Teng, S., *et al.* (2001). The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* 130-132(1-3): 285-296.
- Tian, Q., *et al.* (2004). Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 3(10): 960-969.
- Tian, T., *et al.* (2007). Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction. *Nat Cell Biol* 9(8): 905-914.
- Townsend, A., *et al.* (1989). Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340(6233): 443-448.
- Troppmair, J., *et al.* (1994). Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation by oncogenes, serum, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires Raf and is necessary for transformation. *J Biol Chem* 269(9): 7030-7035.
- Tsuda, L., *et al.* (1993). A protein kinase similar to MAP kinase activator acts downstream of the raf kinase in Drosophila. *Cell* 72(3): 407-414.

- Ulku, A. S., *et al.* (2003). Essential role of Raf in Ras transformation and deregulation of matrix metalloproteinase expression in ovarian epithelial cells. *Mol Cancer Res* 1(14): 1077-1088.
- Umanoff, H., *et al.* (1995). The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5): 1709-1713.
- Unwin, R. D., *et al.* (2003). Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics* 3(8): 1620-1632.
- van Endert, P. M., *et al.* (1994). A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* 1(6): 491-500.
- Vasseur, S., *et al.* (2003). Gene expression profiling by DNA microarray analysis in mouse embryonic fibroblasts transformed by rasV12 mutated protein and the E1A oncogene. *Mol Cancer* 2: 19.
- Villa, E., *et al.* (1996). Identification of subjects at risk for colorectal carcinoma through a test based on K-ras determination in the stool. *Gastroenterology* 110(5): 1346-1353.
- Vivanco, I. & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2(7): 489-501.
- Vizan, P., *et al.* (2005). K-ras codon-specific mutations produce distinctive metabolic phenotypes in NIH3T3 mice [corrected] fibroblasts. *Cancer Res* 65(13): 5512-5515.
- Voice, J. K., *et al.* (1999). Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J Biol Chem* 274(24): 17164-17170.
- Walsh, A. B. & Bar-Sagi, D. (2001). Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras. *J Biol Chem* 276(19): 15609-15615.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123(3191): 309-314.
- Warburg, O., *et al.* (1924). Über den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochem Z* 152: 319-344.
- Wear, M. A. & Cooper, J. A. (2004). Capping protein: new insights into mechanism and regulation. *Trends Biochem Sci* 29(8): 418-428.
- Weinberg, R. A. (2007). *The biology of cancer*. New York: Taylor and Francis Group.
- Wennerberg, K. & Der, C. J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117(Pt 8): 1301-1312.
- Wennerberg, K., *et al.* (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118(Pt 5): 843-846.

Westwick, J. K., *et al.* (1994). Oncogenic Ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(13): 6030-6034.

Wolfman, J. C., *et al.* (2006). Structural and functional consequences of c-N-Ras constitutively associated with intact mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1763(10): 1108-1124.

Wright, K. L., *et al.* (1995). Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter. *J Exp Med* 181(4): 1459-1471.

Yan, J., *et al.* (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 273(37): 24052-24056.

Young, T. W., *et al.* (2007). Up-regulation of tumor susceptibility gene 101 protein in ovarian carcinomas revealed by proteomics analyses. *Mol Cell Proteomics* 6(2): 294-304.

Young, T. W., *et al.* (2004). Activation of antioxidant pathways in ras-mediated oncogenic transformation of human surface ovarian epithelial cells revealed by functional proteomics and mass spectrometry. *Cancer Res* 64(13): 4577-4584.

Zebisch, A. & Troppmair, J. (2006). Back to the roots: the remarkable RAF oncogene story. *Cell Mol Life Sci* 63(11): 1314-1330.

Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* 27: 51-177.

Zuber, J., *et al.* (2000). A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat Genet* 24(2): 144-152.

8 Anhang

Tabelle A: Regulation differentiell exprimierter Proteine des pH-Bereichs 4-7.

Protein	Vektor			Wt			G12V			G13D			Q61H		
	Ratio	CV	t-Test	Ratio	CV	t-Test	Ratio	CV	t-Test	Ratio	CV	t-Test	Ratio	CV	t-Test
gp96	1,0	35,79	0,968	- 1,2	506,75	0,898	- 2,0	12,21	0,138	- 1,2	24,85	0,639	0	n. v.	n. v.
Calreticulin	+ 1,2	13,07	0,403	+ 1,2	7,32	0,323	- 1,2	83,65	0,621	+ 1,3	25,63	0,294	- 5,6	231,34	0,127
FK506Bindepotein4	- 1,2	112,07	0,720	+ 2,2	63,75	0,099	- 1,2	21,13	0,356	+ 1,6	51,00	0,387	+ 1,1	103,75	0,358
Tubulin alpha6	+ 1,4	13,13	0,035	1,0	21,67	0,760	- 2,6	22,73	0,005	+ 1,2	15,16	0,256	- 1,9	60,44	0,135
Prolyl 4-hydroxylase	- 1,2	16,42	0,235	- 1,3	31,85	0,279	- 4,5	12,52	0,002	- 1,6	60,01	0,250	- 4,1	n. v.	n. v.
Phospho-protein B23.2	+ 1,1	7,09	0,695	- 1,2	13,41	0,279	0	n. v.	n. v.	+ 1,6	4,88	0,255	0	n. v.	n. v.
zelluläres Retinsäure-BP1	- 1,3	40,63	0,425	0	n. v.	n. v.	- 2,6	30,33	0,031	+ 1,4	25,26	0,250	- 1,7	19,54	0,116
Superoxiddismutase Cu/Zn	- 1,3	4,91	0,128	- 3,6	159,52	0,139	+ 1,5	65,63	0,474	+ 1,4	18,80	0,160	0	n. v.	n. v.
Annexin 2	+ 1,3	24,80	0,172	0	n. v.	n. v.	0	n. v.	n. v.	+ 1,4	14,64	0,030	- 1,9	74,32	0,337
F-actin capping protein	- 1,1	50,07	0,870	- 1,1	19,24	0,627	+ 2,2	15,28	0,045	+ 1,2	29,43	0,545	+ 1,5	37,79	0,211
Kardiales alpha-Aktin	+ 1,4	8,27	0,193	- 1,0	2,89	0,916	- 4,5	58,26	0,013	+ 1,7	17,02	0,077	- 11,1	n. v.	n. v.
BAB 24792	- 1,0	16,62	0,767	- 1,2	17,83	0,144	- 2,3	29,11	0,019	- 3,0	39,64	0,023	- 1,3	11,27	0,043
Nuklear RNA helicase	1,0	48,94	0,944	+ 1,3	79,81	0,701	+ 3,3	128,85	0,122	+ 1,4	29,46	0,496	- 1,9	76,09	0,285
Disulfidisomerase	- 1,4	43,19	0,330	- 1,1	23,66	0,607	1,0	42,96	0,996	- 2,9	38,18	0,017	+ 1,2	50,23	0,524
AL022641	- 1,3	12,17	0,050	- 1,3	31,71	0,292	+ 1,2	4,16	0,010	- 1,5	13,81	0,021	- 2,0	14,23	0,009
Rho GDI 1	- 1,4	13,46	0,034	- 2,3	41,54	0,047	+ 1,8	11,39	0,013	- 1,5	31,23	0,112	+ 1,9	13,87	0,005
Hsp 86	+ 1,5	15,79	0,046	+ 1,3	9,69	0,263	- 1,2	3,72	0,040	+ 2,0	13,35	0,005	- 3,0	71,99	0,062
Hsp 84	+ 1,2	9,26	0,075	+ 1,6	15,27	0,020	- 3,1	34,94	0,113	- 1,6	62,73	0,239	- 5,6	12,32	0,020
Elongationsfaktor 1	+ 1,2	8,43	0,532	- 1,4	11,40	0,212	- 3,3	30,15	0,010	- 1,0	5,82	0,697	- 3,5	16,89	0,013
Nucleophosmin	- 1,1	33,53	0,558	- 1,4	8,65	0,336	- 2,0	493,63	0,564	- 2,3	61,25	0,091	0	n. v.	n. v.
ATP synthase	- 1,2	33,53	0,558	+ 1,4	26,10	0,106	+ 1,8	26,59	0,034	- 1,1	12,37	0,250	+ 1,7	18,67	0,017
Protease ATPase	- 1,3	17,34	0,442	+ 1,6	78,42	0,353	- 2,9	n. v.	n. v.	- 1,3	27,57	0,523	0	n. v.	n. v.

Die Regulationsfaktoren wurden durch die Anwendung Proteomweaver 3.1 kalkuliert und repräsentieren den Expressionsunterschied zwischen transfizierter und Pa-rentalzelllinie als die n-fache Veränderung der (+) Hoch- bzw. Herunterregulation (-). Neben dem t-Test ist der Variations-Koeffizient (CV), der aus der Varianz der einzelnen Spotintensitäten berechnet wurde, aufgeführt. 0 = nicht exprimiert; n. v. = nicht vorhanden

Tabelle B: Regulation differentiell exprimierter Proteine des pH-Bereichs 6-11.

Protein	Vektor			Wt			G12V			G13D			Q61H		
	Ratio	CV	t-Test	Ratio	CV	t-Test	Ratio	CV	t-Test	Ratio	CV	t-Test	Ratio	CV	t-Test
Esterase D	+ 1,1	18,2	0,721	+ 1,2	108,52	0,684	+ 2,4	22,26	0,014	+ 2,0	43,81	0,250	+ 1,9	11,68	0,342
Katalase	1,0	122,17	0,985	+ 2,6	162,18	0,243	+ 2,0	22,17	0,467	+ 2,3	50,89	0,400	+ 1,2	50,23	0,487
Biglykan	+ 1,1	39,66	0,740	+ 1,2	77,45	0,650	- 2,3	30,72	0,016	- 2,7	25,04	0,043	- 4,2	85,59	0,036
Hsp 47	+ 1,2	18,17	0,460	- 1,1	139,95	0,912	- 3,3	41,69	0,013	- 3,2	43,88	0,018	- 4,0	28,79	0,009
Cyclophilin B	+ 1,3	24,80	0,259	+ 1,3	79,80	0,552	- 2,2	13,96	0,010	- 2,1	21,28	0,008	- 2,7	57,87	0,062
hnRNP A1	+ 1,3	114,28	0,648	+ 1,8	18,63	0,068	- 1,8	30,86	0,096	- 1,1	1,76	0,664	- 3,2	n. v.	n. v.
hnRNP A2/B1	0	n.v.	n.v.	+ 2,3	17,54	0,050	- 1,3	80,38	0,551	+ 1,3	n.v.	n.v.	- 1,5	59,49	0,504
hnRNP D0	+ 1,2	31,60	0,368	+ 2,3	19,83	0,004	+ 2,0	29,95	0,025	- 1,4	55,21	0,479	+ 1,4	26,18	0,608
hnRNP I	- 1,3	14,66	0,437	- 1,9	32,91	0,233	- 1,6	70,83	0,408	- 1,5	45,85	0,188	- 1,7	5,70	0,070
hnRNP L	- 1,1	27,62	0,607	+ 1,8	97,96	0,297	- 1,4	87,61	0,459	+ 1,2	5,62	0,683	- 1,3	60,44	0,567
Spleißfaktor 3A Untereinheit 2	- 1,1	37,82	0,686	- 1,2	30,35	0,578	- 1,9	27,42	0,046	- 2,4	14,76	0,007	- 2,3	2,96	0,047
snRNP-B	- 1,1	22,95	0,680	- 1,8	450,69	0,627	- 7,1	67,68	0,078	- 5,6	32,30	0,003	- 2,4	59,02	0,075
FUSE-Bindeprotein 1	1,0	40,71	0,893	- 1,2	168,02	0,838	+ 1,4	15,72	0,201	+ 2,0	80,19	0,168	+ 1,4	61,67	0,336
Tetrahydrofolate-DH	- 1,4	63,55	0,564	- 3,5	178,14	0,164	- 1,9	53,27	0,111	- 4,8	37,67	0,037	- 2,4	26,31	0,148
Transaminase A	+ 1,4	15,88	0,194	+ 1,1	140,89	0,925	+ 2,5	72,17	0,087	+ 1,1	47,29	0,822	- 1,2	36,48	0,554
e-transferflavoprotein	- 1,2	28,65	0,443	+ 1,9	88,84	0,214	- 2,0	11,24	0,005	1,0	39,87	0,984	- 1,6	10,82	0,170
Aconitase 2	1,0	126,12	0,957	+ 1,5	42,31	0,450	- 2,0	133,56	0,297	+ 1,1	42,80	0,904	1,0	73,99	0,992
Succinat-DH	- 1,6	12,54	0,030	- 4,8	53,95	0,083	- 1,4	17,39	0,134	- 1,9	108,24	0,058	- 4,4	40,48	0,024
Citratsynthase	1,0	21,75	0,891	+ 2,2	93,99	0,165	+ 1,2	21,93	0,656	+ 1,5	21,09	0,592	+ 1,2	22,34	0,840
Fumarase	+ 1,4	47,33	0,393	+ 1,5	65,43	0,276	+ 1,4	17,95	0,315	- 1,9	21,80	0,227	- 2,4	39,59	0,123
6-phosphogluconat-DH	- 1,1	17,63	0,843	+ 1,2	27,19	0,272	+ 2,6	52,23	0,039	+ 3,3	7,43	0,051	+ 3,6	17,33	0,022
Acetyl-CoA-transferase	1,0	16,32	0,957	+ 1,7	131,40	0,373	- 2,3	59,42	0,089	- 2,3	33,52	0,049	- 2,3	20,50	0,056
Triosephosphatisomerase	+ 1,2	11,64	0,082	+ 1,1	251,61	0,911	+ 1,7	8,57	0,001	+ 2,3	38,84	0,160	+ 1,5	5,75	0,454
Pyruvatkinase M2	- 1,3	44,33	0,482	+ 1,6	168,06	0,519	+ 1,9	39,11	0,222	+ 3,3	36,53	0,064	+ 2,7	23,66	0,126
Elongationsfaktor-1-alpha	- 1,1	16,93	0,777	+ 1,0	77,27	0,923	- 1,9	50,22	0,102	- 1,2	16,72	0,348	- 1,8	60,75	0,291
Calcyclin-Bindeprotein	- 1,1	6,63	0,786	+ 1,8	49,72	0,106	+ 1,4	98,12	0,518	+ 1,2	16,88	0,464	+ 1,8	25,81	0,400
Proteasomuntereinheit p42	+ 1,3	10,61	0,059	+ 2,5	46,22	0,038	+ 1,9	14,86	0,007	+ 1,4	42,74	0,408	+ 3,4	28,83	0,474
Annexin I	+ 1,1	12,08	0,921	- 1,3	15,81	0,087	+ 3,3	25,00	0,029	+ 1,5	31,18	0,351	+ 2,1	9,14	0,135
Rab-35	+ 1,1	n.v.	n.v.	- 2,4	31,22	0,084	- 2,0	55,55	0,169	- 3,6	34,94	0,006	- 3,9	21,84	0,026

Die Regulationsfaktoren wurden durch die Anwendung Proteomweaver 3.1 kalkuliert und repräsentieren den Expressionsunterschied zwischen transfizierter und Pa-rentalzelllinie als die n-fache Veränderung der (+) Hoch- bzw. Herunterregulation (-). Neben dem t-Test ist der Variationskoeffizient (CV), der aus der Varianz der einzelnen Spotintensitäten berechnet wurde, aufgeführt. 0 = nicht exprimiert; n. v. = nicht vorhanden

Anhang

Tabelle C: Aufgelistet sind die in der vorliegenden Arbeit für unterschiedliche Amplifizierungsreaktionen verwendeten Oligonukleotide mit dem Namen des Zielgens, der Produktgröße, Anlagerungstemperatur sowie ihrer Funktion.

Gen	Sequenz	Produktgröße [Bp]	Anlagerungstemperatur [°C]	Funktion
K- <i>ras</i> 4B	5´-ATGACTGAGTATAAACTT-3´ 5´-TTACATAATTACACACTT-3´	567	55	Klonierung der K- <i>ras</i> -cDNS
K- <i>ras</i> 4B	5´-CGACACAGCAGGTCATGAGGAGTACAGTGC-3´ 5´-GCACTGTACTCCTCATGACCTGCTGTGTCG-3´	567	55	Einführung einer Punktmutation in K- <i>ras</i> -Kodon 61
H2-L _q	5´-CCTGACCTGGCAGTTGAATG-3´ 5´-CCAGAACAGCAACGATCACC-3´	210	60	quantitative PCR
β ₂ -Mikroglobulins	5´-AGCCGAACATACTGAACTGCTACG-3´ 5´-CGGCCATACTGTCATGCTTAACTC-3´	207	58	quantitative PCR
PA 28α	5´-GGAGCCAGCTCTCAATGAAG-3´ 5´-GTTGCAGGAGGACCACAATC-3´	212	60	quantitative PCR
PA 28β	5´-CTTCTCAGAACGAGGGGATG-3´ 5´-TCGGGTTGACGATTTTCTCT-3´	190	60	quantitative PCR
Proteasomuntereinheit X	5´-TCCCAGACGGTGAAGAAAGT-3´ 5´-CCCCATGCCTTTGTACTGAT-3´	200	60	quantitative PCR
Proteasomuntereinheit Y	5´-TGACCAAGGACGAATGTCTG-3´ 5´-CCTAAAACACCAGGC CTC AG-3´	194	60	quantitative PCR
Proteasomuntereinheit Z	5´-GCAACTGAAGGGATGGTTGT-3´ 5´-ATCTGCTTCAGCATCCGATT-3´	199	60	quantitative PCR
TAP1	5´-TGCCTAAGAAGCTGGGAAAA-3´ 5´-GTAAGCCAAGGCCTCCTTCT-3´	202	60	quantitative PCR
TAP2	5´-CGGTGCTAAAGGAGATCCAG-3´ 5´-CCATCACCCCTCCGTATGACT-3´	203	60	quantitative PCR
ERp57	5´-TCTGAACCCATCCCAGAGTC-3´ 5´-GTGGCATCCATCTTGGCTAT-3´	212	60	quantitative PCR
Calretikulin	5´-GGAAGACTGGGATGAACGAG-3´ 5´-TCAATTTGACGTGGTTTCCA-3´	194	60	quantitative PCR
Calnexin	5´-GCCTGAAGATTGGGATGAAA-3´ 5´-CAATCCTCTGGCTTCTCTGC-3´	177	60	quantitative PCR

Anhang

Tapasin	5`-ACACTGCGAGATGAGCCGCTTC-3` 5`-TGAGGACGGTCAGCACCCTGT-3`	221	60	quantitative PCR
Biglykan	5`-GACAACCGTATCCGCAAAGT-3` 5`-GTGGTCCAGGTGAAGTTCGT-3`	213	60	quantitative PCR
Cyclophilin B	5`-GGAGGAAAGAGCATCTATGGTG-3` 5`-CATCCATGCCCTCTAGAACTTT-3`	193	60	quantitative PCR
β -Aktin	5`-TCTGCTGGAAGGTGGACAGT-3` 5`-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3`	187	60	quantitative PCR
RNA-Polymerase II	5`-CGTACACAGTGCCAGCTGAT-3` 5`-GCAGGTAGGGTCGGTGTTA-3`	198	60	quantitative PCR
Pyruvatkinase M2	5`-CTGCAGGTGAAGGAGAAAGG-3` 5`-GATGCAAACACCATGTCCAC-3`	182	60	quantitative PCR
Esterase D	5`-ATTTGCTCCAATTTGCAACC-3` 5`-GGGAGTAACTGCCAATTTGA-3`	195	60	quantitative PCR
Citratsynthase	5`-GTGACCATGAGGGTGGTAATG-3` 5`-CCGTCCTGAATTGAGTGTGTT-3`	217	60	quantitative PCR
hnRNP A1	5`-CTTGCTTGGATGACCCTTTC-3` 5`-TTATGGTTGCTTGGGTGGAG-3`	291	60	quantitative PCR
hnRNP B1	5`-TGGAGGTAGCCCTGGTTATG-3` 5`-TCCTCCCATGTTCCCTGCTAC-3`	219	60	quantitative PCR
hnRNP D0	5`-GGTGAAGTTGAATCCATAGAGC-3` 5`-CCTGGATACTTTCCATAACCA-3`	268	60	quantitative PCR
hnRNP I	5`-CAGCCAGCCTTCACTAGACC-3` 5`-CATCTGCACAAGTGCGTTCT-3`	289	60	quantitative PCR
hnRNP L	5`-CTGTGGACCGAGCCATTACT-3` 5`-CTGCTCTGGAGTGGAGAACC-3`	178	60	quantitative PCR
Hsp 47	5`-CCATGACCTGCAGAAACATCT-3` 5`-GCTCTGATTATCTCGCACCAG-3`	250	60	quantitative PCR
Katalase	5`-CAGTGCCTGTAGATGTGAAA-3` 5`-GTGTGAATTGCGTTCTTAGGC-3`	263	60	quantitative PCR
gp96	5`-GGTTCCAGTCTTCTCACCATTC-3` 5`-CTGAAACCTCTTCCCATCAAAC-3`	260	60	quantitative PCR
FK506 Bindeprotein	5`-CCACACTTGTATTTGAGGTGGA-3` 5`-GGTTTGAGGTACACGATGGAAT-3`	291	60	quantitative PCR

Anhang

Vimentin	5`-GGTCATCGTGATGCTGAGAA-3` 5`-CCTGGAGTCACTTCTCTGG-3`	113	60	quantitative PCR
Fuse-BP1	5`-GGAACACCTGAATCTGTCCAA-3` 5`-GGCTTGCTGAACTTTGTATGG-3`	288	60	quantitative PCR
Acetyl-CoA-acetyltransferase	5`-CGTAATGAGCAGAGGAGCAAC-3` 5`-CACTGAGATGGTGATGGGAGT-3`	244	60	quantitative PCR
Aconitase	5`-CAAGTGCAAGTCCCAGTTCA-3` 5`-GGTCTCAGGGTTTGCATCAT-3`	235	60	quantitative PCR
Succinatdehydrogenase	5`-CTGGTGGAACGGAGACAAGT-3` 5`-TTAAGCCAATGCTCGCTTCT-3`	247	60	quantitative PCR
Fumarase	5`-GCTCATGATGCTCTGGTTGA-3` 5`-CATTGCTGCCTCCAACAGTA-3`	253	60	quantitative PCR
snRNP-B	5`-CGAGTCCTTGGTCTGGTGTT-3` 5`-ACAGTGCCCTTCCCTGTGG-3`	257	60	quantitative PCR
Pyruvatkinase M2	5`-CTGCAGGTGAAGGAGAAAGG-3` 5`-GATGCAAACACCATGTCCAC-3`	182	60	quantitative PCR
Rab-35	5`-CTGAGCGGAAGGTGGTAGAG-3` 5`-CCACATCGTTCTGTTGTTGC-3`	189	60	quantitative PCR
Spleißfaktor 3A	5`-AGTGGTCCATCCACCAACAT-3` 5`-GGTGTACTGCAGGAGCAGGT-3`	209	60	quantitative PCR
6-Phospho-gluconat-DH	5`-CATGGATTTGTGGTCTGTGC-3` 5`-CCGTGTCCAACAAGGGTACT-3`	211	60	quantitative PCR

Abkürzungen

A	Adenin
ADH	Alkoholdehydrogenase
AIDH	Aldehyddehydrogenase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Amp	Ampicillin
APM	Antigenprozessierungsmaschinerie
Bp	Basenpaar
BP	Bindeprotein
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CBP	„CREB binding protein“
CDK	„Cyclin-dependent kinase“
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CMV	Cytomegalievirus
CREB	„cAMP responsive element binding protein“
2-DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
Da	Dalton
DNase	Desoxrrribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphatgemisch
dpi	„dots per inch“
DTNB	5,5`-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
DH	Dehydrogenase
ECL	„Enhanced Chemoluminescence“
EDTA	Ethylendiammintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
ERAP	ER-assozierte Peptidase
ERK	„Extracellular signal-regulated kinase“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat

FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
GAP	„GTPase-activating protein“
GEF	Guaninnukleotikaustauschfaktor
GSH	Glutathion
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSK	Glykogensynthasekinase
GTP	Guaninnukleosidtriphosphat
gp	Glykoprotein
Grb	„Growth factor receptor bound protein“
GST	Glutathion-S-transferase
H2	Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus
HER	„Human epidermal growth factor receptor“
HLA	Humanes Leukozytenantigen
hnRNP	„heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins“
HRP	Meerrettichperoxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
Hyg	Hygromycin
HVR	Hypervariable Region
ICPL	„Isotope coded protein labeling“
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IRES	Interne Ribosomeneintrittsstelle
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertoni
L	Leucin
LC	„Liquid chromatography“
LDH	Laktatdehydrogenase
LMP	„Low molecular weight protein“
M	Methionin

MALDI	„Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation“
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK	ERK-Aktivator Kinase
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex
β_2 -M	β_2 -Mikroglobulin
MOPS	3-[N-Morpholin]-propansulfonsäure-N´-[2-ethansulfonsäure]
Mr	Molekulargewicht
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
NADH	β -Nikotinamid-adenindinukleotid
NADPH	β -Nikotinamid-adenindinukleotidphosphat
NDSB	Dimethylbenzylammoniumpropansulfonat
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
PA	Proteasomaktivator
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH	Pleckstrin-homolog
pI	isoelektrischer Punkt
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
PLC	Peptidbeladungskomplex
PK-M2	Pyruvatkinase M2
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDK	„3-Phosphoinositide-dependent protein kinase“
PMF	Peptidmassenfingeraabdruck
ori	„origin of replication“
RBD	Ras-Bindungsdomäne
RISC	„RNA-induced-silencing-complex“

RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RuBPS	Ruthenium II bathophenanthroline disulfonat chelat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	„Src-homology 2 domain“
SILAC	„Stable isotope labeling in culture“
siRNS	„small interfering“ Ribonukleinsäure
SOS	„Son of sevenless“
SOD	Superoxiddismutase
T	Thymin
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	„Transporter associated with antigen processing“
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung/0,1 %Tween20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	„Transforming growth factor“
TOF	„Time of Flight“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
Wt	Wildtyp
XTT	Natrium-3`-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro)-benzen-Schwefelsäurehydrat
ZTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt

Aminosäuren wurden nach den Empfehlungen der Internationalen Union für Biochemie und Molekularbiologie im Ein- bzw. Drei-Buchstabensystem dargestellt.

Verwendete Geräte:

Gerät	Name, Firma (Ort)
Autoklav	HICLAVETM HV-85, HMC (Engelsberg)
Bakterien-Inkubator	INCU-CELL, MMM Medcenter (München)
Bakterien-Schüttler	UniHood 650, UniEquip (Martinsried)
Bakterien-Sterilbank	Microflow Biological Safety Cabinet, Nalge (Wiesbaden)
Blot-Apparatur	HEP-3 Semi Dry Electroblotting System, Thermo Scientific (Rochester, US)
CO ₂ -Inkubator	SHEL LAB CO2 Inkubator , UniEquip (Martinsried)
Mikrotiterplattenlesegerät	MRX-TC II, Dynex (Berlin)
Feinwaage	Sartorius Analytic AC 2105, Sartorius AG (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop	DM IRB, Leica (Solms)
Fokussierungseinheit	Ettan IPGphor II (Buckinghamshire, UK)
Geldokumentation	Image Station 440 CF, Kodak (Stuttgart)
Gelelektrophoresekammer	Hoefer DALT, Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Gelelektrophoresekammer	Novex Mini-Cell System, Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Massenspektrometer	Voyager-DE TM Pro, Applied Biosystems (Foster City, US)
Mikroskop	Axiovert25, Zeiss (Jena)
Multikanalpipette	ThermoLabSystems (Göttingen)
pH-Meter	PH 525, WTW (Gill St. Woburn, US)
Pipetten	Abimed (Langenfeld)
Real-Time-PCR-Gerät	Rotorgene 2000/6000, LTF Labortechnik (Wasserburg)
Roller-Mixer	SRT1, Stuart Scientific Bibby (Staffordshire, UK)
Spektralphotometer	Ultraspec UV/Vis Spectrophotometer, Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Scanner	Powerlook III, Umax (Willich)
Thermoblock	Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg)

Anhang

Ultraschallgerät	SonoPlus Powersupply und MS73 Sonikator, Bandelin Electronic (Berlin)
Waage	BP1200, Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Unitherm WA6, UniEquip (Martinsried)
Vortex	Vibramax 100, Heidolph (Göttingen)
Zellkultur-Sterilbank	HeraSafe, Heraeus Instruments (Frankfurt)
Zentrifugen	Rotina 46R Hettich (Tuttlingen), Biofuge Fresco, Biofuge Pico, UEC Micro14/B, UniEquip (Martinsried)

Verwendete Chemikalien:

Chemikalie	Name, Firma (Ort)
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Agar	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ampicillin (Amp)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Bacto-Trypton	Difco (Augsburg)
Bacto-Yeast-Extract	Difco (Augsburg)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics (Mannheim)
dNTP	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Dry Strip Cover Fluid	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Formaldehyd 37%	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Immobiline DryStrip Cover Fluid	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Lipofectamin	Invitrogen (Karlsruhe)
LMP-Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)

Anhang

β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumacetat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Natriumthiosulfat	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
NDSB-256	ICN Biomedicals (Eschwege)
Nonident P-40	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Pharmalytes pH 3-10	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Phenylmethansulfonsäurefluorid	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics (Mannheim)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva GmbH (Heidelberg)
Thioharnstoff	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Tris/Acetate	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tris/HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tween-20	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Xylencyanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

PUBLIKATIONEN

- Recktenwald C.V., Mendler S., Lichtenfels R., Kellner R., Seliger B.
Influence of *Ki-ras*-driven oncogenic transformation on the protein network of murine fibroblasts
Proteomics (2007) 7(3):385-98.
- Recktenwald C.V., Kellner R., Lichtenfels R., Seliger B.
Altered detoxification status and increased resistance to oxidative stress by K-ras transformation
Cancer Research (2008) 68(24):10086-93.
- Seliger B., Dressler S.P., Wang, E., Kellner, R., Recktenwald, C.V., Lottspeich F., Marincola F.M., Baumgärtner M., Atkins, D., Lichtenfels R.
Combined analysis of transcriptome and proteome data as a tool for the identification of candidate biomarkers in renal cell carcinoma
Proteomics, im Druck
- Horsch, M., Recktenwald, C.V., Schädler, S., Hrabé de Angelis M., Seliger B., Beckers J.
Over-expressed versus mutated *Kras* in murine fibroblasts: a molecular phenotyping study
British Journal of Cancer, im Druck
- Croci S., Recktenwald C.V., Lichtenfels R., Nicoletti G., De Giovanni C., Astolfi A., Palladini A., Landuzzi L., Nanni P., Lollini P-L., Seliger B.
Proteomic and PROTEOMEX analyses of HER-2/neu oncogene-driven mammary cancer progression
zur Veröffentlichung eingereicht

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Barbara Seliger für die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten, ihr reges Interesse am Fortgang der Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft sowie die Möglichkeit sich in neue Methoden einzuarbeiten und eigene Ideen in die Projekte mit ein zubringen.

Frau Prof. Dr. Andrea Sinz danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Reinhold Schäfer danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Roland Kellner für die Möglichkeit mich in seinem Labor in die MALDI-Massenspektrometrie einzuarbeiten und seine Hilfestellungen bei MS-Problemen.

Bei allen Mitarbeiteren des Institutes für Medizinische Immunologie möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Jens Wulfänger für die stets hilfreichen Diskussionen, die entscheidend zum Erfolg wichtiger Experimente beigetragen haben. Außerdem möchte ich Sven P. Dressler für die Hilfe bei Softwareproblemen aller Art danken.

Frau Simone Mandler und Frau Ursula Wollscheid danke ich für die Einarbeitung in die Zellkultur und Transfektionstechniken.

Herrn Dr. Kai Kronfeld möchte ich für die Einweisung und Hilfe bei den durchflusszytometrischen Analysen danken.

Vielen Dank meiner Familie für ihre jederzeit bedingungslose Unterstützung.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich entnommene Literaturstellen sind als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde bisher weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Bildungseinrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

Halle, im Januar 2009

(Christian Recktenwald)

LEBENS LAUF

Name: Christian Viktor Recktenwald
Geburtsdatum: 18.06.1973
Geburtsort: Illingen
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

09/1979 – 07/1983 Grundschule Winterbach
09/1983 – 06/1992 Arnold-Janssen-Gymnasium St. Wendel

Zivildienst

09/1992 – 11/1993 Altenheim des Missionshauses St. Wendel

Studium

10/1993 - 09/1998 Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken
10/1998 - 09/1999 Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes
seit 07/2004 Doktorand am Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Berufliche Tätigkeiten

10/1999 – 12/1999 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes
01/2000 – 10/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der EBL GmbH in Freiburg
05/2001 – 05/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der III. Medizinischen Klinik der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz

Halle, im Januar 2009

(Christian Recktenwald)