

**Charakterisierung der Expression und Aktivität von
Ras-Isoformen in humanen Lungenkarzinomzellen mit
onkogenem K-Ras 4B und Modulation der Zellmotilität**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Susanne Illing

aus Fellbach

Gießen, den 3. August 2020

Aus der Medizinischen Klinik IV und V,
unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimmiger,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. K. Giehl

Gutachter: Prof. Dr. med. R. Voswinckel

Tag der Disputation: 15.06.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ras-Proteine	1
1.1.1	Ras-Isoformen	2
1.2	Signalwege und Funktionen von Ras in der Zelle	4
1.2.1	Der Ras- <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> (ERK)-Signalweg	5
1.2.2	Der Ras-Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)-Signalweg und Ras-modulierte Signalwege	7
1.3	Ras als Onkogen	9
1.4	Das Adenokarzinom der Lunge	10
1.5	Genetische Grundlagen des Lungenadenokarzinoms	11
1.6	Beeinflussung der Migration und Metastasierung durch onkogenes K-Ras 4B . .	12
1.7	Ziele der Arbeit	13
2	Material	15
2.1	Chemikalien	15
2.2	Lösungen und Puffer	16
2.3	Wachstumsfaktoren	18
2.4	Inhibitoren von K-Ras/Ras	19
2.5	Zelllinien	19
2.5.1	Prokaryontische Zelllinien	19
2.5.2	Eukaryontische Zelllinien	20
2.6	Plasmide	21
2.6.1	Prokaryontische Expressionsvektoren	21
2.6.2	Eukaryontische Expressionsvektoren	21
2.7	Molekulargewichtsmarker für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
2.8	Antikörper	22
2.8.1	primäre Antikörper	22
2.8.2	sekundäre Antikörper	23
2.9	Geräte	24

2.10 Verbrauchsmaterialien	25
2.11 Software	25
3 Methoden	26
3.1 Kultivierung humaner Zellen	26
3.2 Passagieren der Zellen mittels Trypsin-EDTA	26
3.3 Zellzahl-Bestimmung	27
3.4 Auftauen eingefrorener Zellen	27
3.5 Transiente Transfektion von Panc1-Zellen mit DMRIE-C	27
3.6 Transiente Transfektion mit jetPEI	28
3.7 Herstellung von Zelllysaten	28
3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels <i>Bicinchoninic Acid Protein Assay</i> (BCA)	29
3.9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
3.10 Coomassie-Blaufärbung	31
3.11 Western Blot	32
3.12 Immundetektion mit spezifischen Antikörpern	32
3.12.1 ECL-Westernblot-Detektionssystem	33
3.12.2 LI-COR Odyssey Westernblot-Detektionssystem	33
3.12.3 Alkalische Phosphatase-Färbung	34
3.13 Elution gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran	34
3.14 Kultivierung von Bakterien	35
3.15 Herstellung kompetenter Bakterien	35
3.16 Transformation kompetenter Bakterien	35
3.17 Ras-GTP Bindungsassay	36
3.17.1 Expression von GST-RBD bzw. GST-Expression in <i>E.coli</i> und Aufreinigung	36
3.17.2 Quantifizierung von GST bzw. GST-RBD im Bakterienlysat	37
3.17.3 Bindung von Ras-GTP an GST-RBD	37
3.18 Wounding Assay	38
3.19 Statistik	40
4 Ergebnisse	41
4.1 Nachweis von Ras-Isoformen mit isoformspezifischen Antikörpern	41
4.1.1 Charakterisierung von Ras-isoformspezifischen Antikörpern	41
4.1.2 Nachweis von Ras-Isoformen in humanen NSCLC-Zelllinien im Immunblot- Verfahren mit isoformspezifischen Antikörpern	47
4.1.3 Nachweis und Quantifizierung der Expression von H-, K- und N-Ras in hu- manen Lungenkarinomzelllinien und Panc1-Zellen im Immunblotverfahren	48
4.2 Aufreinigung von GST-RBD und Nachweis von aktivem Ras-GTP	51
4.3 Bestimmung der Aktivität von Ras	53

4.3.1	Nachweis von aktivem Ras in humanen Lungenkarzinomzelllinien und Panc1	53
4.3.2	Bestimmung der Aktivität von H-, K- und N-Ras in den Zelllinien	54
4.4	Analyse der Aktivierung von Ras in den Karzinomzelllinien durch Stimulation mit EGF	58
4.4.1	Analyse der Aktivierung von Ras durch Stimulation mit EGF in den Lungenkarzinomzelllinien und Panc1 im Ras-GTP-Bindungsassay	58
4.4.2	Analyse der Aktivitätsveränderungen von H-Ras, K-Ras und N-Ras in den Karzinomzelllinien nach Stimulation mit EGF	61
4.5	Analyse der Ras-Aktivierung via G-Protein-gekoppelter Rezeptoren am Beispiel des LPA-Rezeptors	63
4.6	Charakterisierung der Zellmigration in Wachstumsmedium und DMEM ohne Zusätze	64
4.6.1	Veränderungen des Migrationsverhaltens im Wounding Assay durch Stimulation mit EGF	67
4.7	Veränderung des Migrationsverhaltens durch Inhibition von Ras	69
4.8	Effekte von Ras-Inhibitoren auf die EGF-induzierte Zellmigration	71
5	Diskussion	74
5.1	Expression von H-, K- und N-Ras in humanen Lungenkarzinomzelllinien und Panc1-Zellen	75
5.2	Aktivität von H-, K- und N-Ras in humanen Lungenkarzinomzelllinien und Panc1-Zellen	76
5.3	Aktivierung von wildtypischem Ras und onkogenem Ras über externe Stimulation mit EGF und LPA	79
5.4	Motilität und Metastasierung	81
5.5	Ausblick	84
6	Zusammenfassung	87
6.1	Zusammenfassung	87
6.2	Abstract	88
	Literaturverzeichnis	98
A	Erklärung zur Dissertation	99

1. Einleitung

1.1 Ras-Proteine

Ras-Proteine sind Proto-Onkogene aus der Gruppe der kleinen monomeren GTP-bindenden Proteine, kurz G-Proteine, mit einem Molekulargewicht von 20 - 40 kDa. Diese Proteinfamilie umfasst beim Menschen mehr als 150 Proteine und wird in sechs weitere Familien unterteilt: *rat sarcoma* (Ras)-Proteine, *ras homologous* (Rho)-Proteine, *ras-related in brain* (Rab)-Proteine, *ras-like nuclear* (Ran)-Proteine, *secretion-associated ras-related factor1/ADP-ribosylation factor* (Sar1/Arf)-Proteine und Rad-Proteine [27]. Die Familie der Ras-Proteine beinhaltet die klassischen Ras-Proteine H (Harvey)-Ras, N (Neuroblastoma)-Ras und K (Kirsten)-Ras mit den Splicevarianten *K-Ras4A* und *K-Ras 4B*. Zudem gehören R-Ras, TC21 (R-Ras2), M-Ras (R-Ras3), vier Rap-Proteine, zwei Ral-Proteine und die Proteine Rheb, Rit und Rin zu dieser Familie [9]. Ras funktioniert in der Zelle als molekularer Schalter und kann in aktiver und inaktiver Form vorliegen. In der Zelle befindet sich Ras überwiegend im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand. Die extrazelluläre Bindung von Wachstumsfaktoren, Hormonen, Neurotransmittern oder Chemokinen an membranständige Rezeptoren wie Rezeptortyrosinkinasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Zytokinrezeptoren oder Integrine führt zur Ras-Aktivierung durch sogenannte *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) [58]. GEFs induzieren die Dissoziation von GDP und ermöglichen so die Bindung von GTP, welches in der Zelle in 10-fach höherer Konzentration als GDP vorliegt. Die GTP-Bindung führt zu Konformationsänderungen im Ras-Protein, wodurch dessen Effektor-Bindungsstelle freigelegt wird [70]. Die Inaktivierung von Ras kann durch die intrinsische GTPase-Aktivität des Proteins erfolgen, welche GTP zu GDP und Phosphat spaltet. Dieser Vorgang ist sehr langsam, wird jedoch durch Bindung von *GTPase activating proteins* (GAPs) um mehr als den Faktor 1000 beschleunigt und somit die schnelle Ras-Inaktivierung gewährleistet [70].

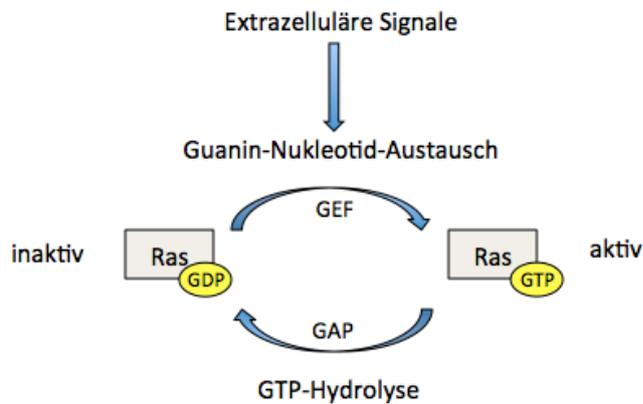


Abbildung 1.1: **Ras-Aktivierungszyklus** Durch die durch extrazelluläre Signale aktivierten GEFs wird GDP gegen GTP ausgetauscht und Ras in den aktiven Zustand überführt. Die durch GAPs katalysierte Hydrolyse von GTP zu GDP führt zur Inaktivierung (Abbildung verändert nach [70]).

1.1.1 Ras-Isoformen

Im menschlichen Genom sind drei Ras-Gene *H-ras*, *K-ras* und *N-ras* beschrieben, die für vier ubiquitär exprimierte Proteine mit großer struktureller Ähnlichkeit und einer Masse von 21 kDa kodieren. *N-ras* ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p22-p32) lokalisiert, *H-ras* und *K-ras* befinden sich auf den kurzen Armen der Chromosomen 11 (11p15,1-p15,5) und 12 (12p12,1-pter) [4]. Durch alternatives Spleißen entstehen aus Exon IV des *K-ras* Gens zwei unterschiedliche K-Ras-Proteine, K-Ras 4A und K-Ras 4B, die sich lediglich in der Sequenz des Carboxyterminus unterscheiden [4]. Im Gegensatz zum ubiquitär exprimierten K-Ras 4B wird K-Ras 4A im menschlichen Organismus in Gastrointestinaltrakt sowie in geringerer Menge in Niere und Lunge exprimiert [91], im weiteren Text wird sich mit K-Ras stets auf die Isoform K-Ras 4B bezogen.

Speziesübergreifend spricht die hohe Konservierung der Aminosäuresequenz der Ras-Proteine für deren essentielle Funktion in der Zelle. Die Aminosäuresequenz der vier klassischen Ras-Proteine H-Ras, N-Ras und K-Ras 4A/K-Ras 4B ist zu 85 % homolog, wobei die ersten 86 Aminosäuren komplett identisch sind und die Mehrheit der Unterschiede innerhalb der letzten 24 Aminosäuren (AS) akkumuliert. Diese Region von AS 166-186 wird als hypervariable Region (HVR) bezeichnet und kann weiter in *linker region* und *anchor region* unterteilt werden [27]. Die endständigen vier Aminosäuren der *anchor region* bilden stets Cystein, zwei aliphatische Aminosäuren und eine beliebige Aminosäure, was als CAAX-Motiv bezeichnet wird. Auch die Bindungsstelle für Downstream-Effektoren ist für alle Ras-Isoformen identisch und ist von AS

1.2. Signalwege und Funktionen von Ras in der Zelle

nen Plasmamembran interagiert und so die stabile Assoziation ermöglicht [33]. Der Transport von K-Ras 4B zur Plasmamembran erfolgt unabhängig vom Golgi-Apparat, wobei der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist. Die Interaktion der *polybasic domain* mit Microtubuli und die Beteiligung von Chaperonen werden diskutiert [80, 89].

An der Plasmamembran verteilen sich H-, K- und N-Ras auf isoformspezifische, nicht-überlappende Nanocluster mit jeweils 5-10 Proteinmolekülen. Es existieren verschiedene Nanostrukturen, von denen *lipid rafts* und *non-raft* Domänen gut charakterisiert sind. *lipid rafts* formen sich aus Phospholipiden und Cholesterin, während *non-raft* Domänen Cholesterin-frei sind [32]. Die Aktivierung durch Bindung von GTP führt zu Konformationsänderungen im Ras-Protein, was zur Umverteilung in andere, isoformspezifische Nanocluster führt. Während H-Ras-GDP hauptsächlich in *lipid rafts* lokalisiert ist, befindet sich H-Ras-GTP überwiegend in *non-rafts*, für N-Ras gelten umgekehrte Verhältnisse. K-Ras ist aktivierungsunabhängig hauptsächlich in *non-rafts* lokalisiert [69]. Diese Umpositionierung erleichtert die Stabilisierung durch *scaffolding-Proteine* und so stabilisierte, aktive Ras-Proteine werden von den Ras-Effektoren Raf und PI3K erkannt [21, 34]. Die in den Nanoclustern enthaltenen *scaffolding*-Proteine unterscheiden sich ebenfalls, z.B. enthalten H-Ras-GTP-Nanocluster Galectin-1 und K-Ras-GTP-Nanocluster Galectin-3 [66].

Auch in der Verteilung innerhalb anderer Zellkompartimente gibt es Unterschiede zwischen den Ras-Isoformen. So finden sich beispielsweise im Golgi-Apparat große Pools von N-Ras, während H-Ras oder K-Ras 4A hier deutlich seltener vorkommen [67]. H- und N-Ras können zusätzlich ubiquitinyliert und an Endosomen adressiert werden. K-Ras 4B findet sich dagegen fast ausschließlich an der Zellmembran [66]. Die spezifische Lokalisation von Ras hat auch Auswirkungen auf die Ras-abhängige Signaltransduktion: so kann beispielsweise in Endosomen oder Golgi-Apparat lokalisiertes Ras im Vergleich zu an der Zellmembran lokalisiertem Ras die *Mitogen-Activated-Protein-Kinase* (MAPK)-Kaskade weniger effizient aktivieren [67, 75]. Je nach Lokalisation in der Zelle stehen unterschiedliche Pools an Aktivatoren und Effektoren von Ras zur Verfügung, was als eine Grundlage für isoformenspezifisches *signaling* gesehen wird [66, 67].

1.2 Signalwege und Funktionen von Ras in der Zelle

Trotz der hohen Homologie der Aminosäuresequenz unterscheiden sich die Ras-Isoformen funktionell. Frühe Hinweise auf getrennte Funktionen ergaben sich aus der Analyse von Mutationen und Mutationsraten von Malignomen, die eine Assoziation verschiedener Karzinome mit

1.2. Signalwege und Funktionen von Ras in der Zelle

bestimmten mutierten Ras-Isoformen zeigte [85]. Experimente an *knock-out*-Mäusen zeigten insbesondere die herausragende Rolle von K-Ras 4B in der embryologischen Entwicklung von Säugetieren: Während *K-ras*-defiziente Mäuse bereits in der Embryonalphase versterben und schwere kardiale und zentralnervöse Fehlbildungen entwickeln, zeigen *H-* oder *N-ras-knock-out*-Mäusen keine phänotypischen Veränderungen und sind lebensfähig und fertil, gleiches ist bei *N-ras-/H-ras-Doppel-knock-out*-Mäusen der Fall [46]. Ebenso zeigte *knock-out* des K-Ras 4A-Exons in Mäusen keine Auswirkungen auf Überleben, Wachstum und Fertilität, was zeigt, dass K-Ras 4B für eine normale Entwicklung nicht nur essentiell, sondern auch ausreichend ist. Ob K-Ras 4A in der Entwicklung K-Ras 4B ersetzen kann, wurde bislang nicht untersucht [58,91].

1.2.1 Der Ras-*Extracellular Signal-Regulated Kinase*(ERK)-Signalweg

Aktives Ras-GTP interagiert mit über 20 möglichen Effektorproteinen, welche wiederum GEFs für andere GTPasen oder sehr häufig Proteinkinasen darstellen und so weitere Signalwege aktivieren. Mit am frühesten identifiziert und am besten charakterisiert sind der *Ras-Extracellular Signal-Regulated Kinase*(*Ras-ERK*)- und der *Phosphatidylinositol 3-Kinase Mammalian Target Of Rapamycin* (*PI3K-mTOR*)-Signalweg [59].

Diese Signalwege stellen zentrale Mechanismen der Zellantwort auf externe Stimuli in den Bereichen Zellmotilität, -differenzierung, -überleben und Regulation des Zellstoffwechsels dar und spielen somit auch eine wichtige Rolle bei der Tumorengese [59].

Die Proteinkinasen *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1* (ERK1) bzw. *Mitogen-activated protein kinase 2* (MAPK2) und *Extracellular Signal-Regulated Kinase 2* (ERK2) bzw. *Mitogen-Activated protein kinase 1* (MAPK1) stellen wichtige Effektoren des Ras-Onkogens dar. *Knock-out*-Experimente an Mäusen legen die Vermutung nahe, dass ERK2 *in vivo* die meisten Funktionen von ERK1 übernehmen kann. Ras und der ERK Signalweg werden durch die Bindung extrazellulärer Botenstoffe an Rezeptortyrosinkinasen (RTKs)- oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) aktiviert [57, 76]. So bewirkt beispielhaft eine Bindung von *epidermal growth factor* (EGF) an den EGF-Rezeptor die Ras-Aktivierung via RTK, *lysophosphatidic acid* (LPA) wirkt über GPCRs. An die durch Autophosphorylierung phosphorylierten intrazellulären Domänen einer aktivierten RTK binden Adaptorproteine wie *growth factor-receptor-bound protein 2* (GRB2), mit deren Hilfe Ras-aktivierende GEFs wie *Son Of Sevenless* (SOS) aktiviert und an die Membran rekrutiert werden [19, 57].

Das durch GEFs aktivierte Ras-GTP rekrutiert die Serin/Threonin-Kinasen der Raf-Familie (A-

1.2. Signalwege und Funktionen von Ras in der Zelle

Raf, B-Raf oder c-Raf/Raf-1) zur Plasmamembran, wo diese durch komplexe Reaktionen wie Phosphorylierung/Dephosphorylierung und die Assoziation mit *scaffolding*-Proteinen aktiviert wird [61, 83]. Raf-Kinasen, am stärksten B-Raf, aktivieren durch Phosphorylierung zweier Serinreste die *Mitogen-Aktivated-Protein-Kinase-Kinasen*

(MAPKKs oder MEK1/2), welche ihrerseits durch Phosphorylierung eines Tyrosin- und Threonin-Rests die MAP-Kinasen ERK1/2 aktivieren. Die Ras-Raf-MEK-ERK Aktivierungskaskade hat Feedback- und Signalamplifikationsfunktion, da durch die Aktivierung mehrerer Kinasen durch eine übergeordnete Kinase eine Signalverstärkung stattfinden kann [2, 56].

Aktive ERK1/2 phosphorylieren über 600 Zielproteine in Zytoplasma und Nukleus, darunter Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen und Proteine des Zytoskeletts [22]. Von ERK aktivierte Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP1 und c-Myc beeinflussen die Zellproliferation und -differenzierung [14]. Zusätzlich enthalten viele Promotoren von Wachstumsfaktor-Genen Bindungsstellen für die von Ras-ERK aktivierten Transkriptionsfaktoren [61]. Die Bildung eines CDK4-Cyclin-Komplexes durch ERK-getriggerte Signale beeinflusst zum einen die Geschwindigkeit des Zellwachstums und wirkt zum anderen durch Repression von pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie antiapoptotisch [100]. Zudem inhibiert die Aktivierung von ERK1/2 die rezeptorinduzierte Apoptose durch *death receptors* wie Fas, TRAIL oder TNF [77]. Durch die Hochregulation der Expression mesenchymaler Gene und Transkriptionsrepressoren wie SNAIL und Slug spielt die Ras-ERK-Kaskade auch eine Rolle in der Entstehung der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) [55]. Der Prozess der EMT führt zu phänotypischen Veränderung der betroffenen Zellen und ist durch gesteigerte Migration, Invasivität und Pharmakoresistenz gekennzeichnet. Über den Rho/Rac-Signalweg steigert der Ras-ERK-Signalweg darüber hinaus die zelluläre Kontraktilität, Invasion und Migration [61].

1.2. Signalwege und Funktionen von Ras in der Zelle

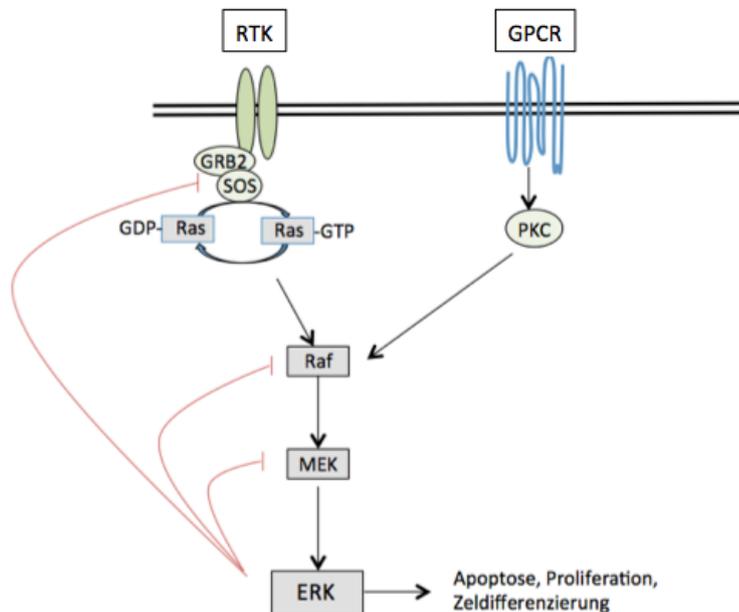


Abbildung 1.3: **Ras-ERK-Signalweg** Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg wird durch die Bindung extrazellulärer Signalstoffe, z.B. EGF oder LPA, über Rezeptortyrosinkinasen bzw. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Die Rezeptoraktivierung ermöglicht die Rekrutierung von Adapterproteinen wie GRB2 und Ras-aktivierenden GEFs wie SOS an die Plasmamembran. Aktives Ras-GTP bewirkt in mehreren Schritten die Phosphorylierung von Serin/Threoninkinasen der Raf-Familie, welche so an die Plasmamembran rekrutiert und aktiviert werden. Raf aktiviert MEK und MEK aktiviert ERK. ERK interagiert mit über 600 Zielproteinen im Cytoplasma und im Nucleus und beeinflusst u.a. das Zellwachstum, wirkt über Repression von Bcl-2-Proteinen antiapoptotisch und spielt über Hochregulierung und Aktivierung von Transkriptionsrepressoren bei der Entstehung der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) eine Rolle. Die Kaskade dient zudem der Signalamplifikation und als Feedback-Mechanismus (Abbildung verändert nach [58]).

1.2.2 Der Ras-Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)-Signalweg und Ras-modulierte Signalwege

Der Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)-AKT-mTOR-Signalweg ist ein wichtiger Ras-vermittelter Signalweg und spielt bei Zellwachstum, Zellproliferation und der Regulation des Zellstoffwechsels eine wichtige Rolle [82].

Phosphoinositid-3-Kinasen(PI3K) lassen sich entsprechend ihrer katalytischen Untereinheiten in drei funktionelle Klassen und acht Isoformen einteilen [49]. Im folgenden Text wird vorrangig auf Klasse I Bezug genommen. Klasse I-PI3-Kinasen können im aktivierten Zustand Phosphatidylinositol(4,5)-diphosphat (PIP₂) phosphorylieren und generieren hierdurch den *second messenger* Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat (PIP₃). Dieser rekrutiert und aktiviert zahlreiche downstream-Effektoren, wovon die Proteinkinasen B (Akt1/PKB α , Akt2/PKB β , Akt3/PKB γ) wichtige Vertreter sind.

1.2. Signalwege und Funktionen von Ras in der Zelle

Diese Serin/Threonin-Kinasen zählen zu den Protoonkogenen [27]. Akt/PKB phosphoryliert eine Vielzahl von Zielproteinen wie *glycogen synthase kinase* (GSK3) α oder β und 6-Phosphofruktose-2-Kinase (6PF2K), was zu gesteigerter Glykogen- und Proteinsynthese führt [3]. Durch Inhibition von Proteinen wie BAD und Caspase 9 im Cytoplasma und *forkhead box O* (FOXO)-Transkriptionsfaktoren im Nukleus unterdrückt Akt apoptotische Signale. Zudem stimuliert Akt über die indirekte Aktivierung von *mammalian Target Of Rapamycin Complex 1* (mTORC1) mittels Inhibition des *Tuberous Sclerosis Complex 1/2* (TSC1/2) das Fortschreiten von Zellzyklus und Zellwachstum [26, 59]. Aufgrund der Inhibition von Apoptose und Stimulation des Zellwachstums ist der PI3K-Signalweg ein wichtiger Signalweg in der Entstehung Ras-abhängiger Tumoren, eine Fehlregulierung des PI3K-Signalwegs wird bei bis zu 50 % aller Tumorarten vermutet [25, 27, 43].

Ein weiterer Ras-Effektor ist RalGDS, ein GEF der Ral-GTPasen. Der RalGDS-Ral-Signalweg moduliert zahlreiche Transkriptionsfaktoren, z.B. c-Jun via *Jun N-terminal kinasen* (JNKs). JNKs sind essentiell für die Zellmigration von NBT-II- und Pankreaskarzinomzellen [40, 86]. Studien an RalGDS-defizienten Mäusen zeigten, dass diese keinen Ras-abhängigen Hautkrebs entwickeln können, was die Rolle des RalGDS-Signalwegs in der malignen Transformation zumindest an Melanozyten verdeutlicht [1, 24]. Ein weiterer wichtiger Ras-Effektor ist TIAM1, ein Rac-spezifischer GEF, welcher Ras mit Signalwegen von Rho-GTPasen zur Regulation des Aktin-Zytoskeletts verbindet [7]. AF-6, Nore1/RASSE, Rin1, Phospholipase C ϵ und Protein Kinase C ζ stellen weitere mögliche Effektoren von Ras dar [27, 72].

Einige Studien zeigten Hinweise auf funktionelle Unterschiede der Isoformen bei der Aktivierung Ras-abhängiger Signalwege. So zeigte sich K-Ras 4B in COS-1-Zellen im Vergleich zu H- und N-Ras als effizienterer Aktivator von Raf-1, während H-Ras bevorzugt den PI3K-Signalweg aktiviert. Zudem wurde die Zellmigration dieser Zelllinie nur von aktivem K-Ras induziert, H-Ras und N-Ras hatten darauf wenig bis keinen Effekt [94, 103]. In Studien an HeLa-Zellen konnte hingegen keine präferentielle Interaktion endogener Ras-Isoformen mit den beiden zentralen Ras-Effektorpathways nachgewiesen werden [66]. Messbare Unterschiede in der Ras-Effektoraffinität konnten hingegen für H-Ras, K-Ras und N-Ras im Vergleich zu R-Ras 1 und R-Ras 2 gezeigt werden [39].

1.3 Ras als Onkogen

Onkogenes, konstitutiv aktives Ras entsteht in 98 % der Fälle durch Punktmutationen in Kodon 12, 13 oder 61 der Ras-Gene. Diese Punktmutationen stören die Interaktion von GAPs mit Ras, sodass nur noch eine stark eingeschränkte Hydrolyse von GTP zu GDP möglich ist und Ras überwiegend im aktiven, GTP-gebundenen Zustand verbleibt. Zudem kann der Verlust von GAPs wie neurofibromin 1 (NF 1) oder eine RTK-induzierte, dauerhafte Aktivierung von GEFs wie SOS1 zu einer dauerhafte Ras-Aktivierung in Tumorzellen führen [37]. Durch aktivierende Ras-Mutationen werden Ras-modulierte Signalwege dauerhaft aktiviert, was zu fehlerhafter Signaltransduktion und letztlich zu Zellveränderungen führt [27]. Etwa 80 % der aktivierenden Mutationen im *K-ras*-Gen betreffen Kodon 12, am häufigsten ist der Austausch von Glycin zu Valin oder Asparagin (G12V bzw G12D). N-Ras Mutationen finden sich am häufigsten in Kodon 61 (60 %), H-Ras-Mutationen sind gleichmäßig über Kodon 12, 13 und 61 verteilt [71]. Die Rolle von wildtypischem K-Ras in Tumoren ist unklar. Während manche Studien darauf hin deuten, dass WT-K-Ras zum Tumorwachstum beiträgt, legen andere eine tumorsupprimierende Rolle von WT-K-Ras nahe [28,97].

Eine aktivierende Ras-Mutation in einem der drei Ras-Gene findet sich gemäß den Daten des *Catalog of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC) in 27 % aller menschlichen Tumore. Hierbei sind Mutationen von *K-ras* mit einem Vorkommen in 85 % aller Ras-Mutation tragenden Tumore mit Abstand am häufigsten. Mutiertes N-Ras findet sich in 11 %, mutiertes H-Ras lediglich in 4 % aller Tumore [37, 71]. Je nach Tumortyp liegen spezifische Mutationsprofile der Ras-Isoformen vor: in duktalem Pankreaskarzinomen handelt es sich fast ausschließlich um mutiertes *K-ras*, während beim malignen Melanom überwiegend *N-ras* mutiert ist. H-Ras ist generell die am seltensten mutierte Isoform, in Tumoren der Harnblase oder der Cervix jedoch vorherrschend [17, 85]. Lungenkarzinome vom NSCLC-Typ tragen in ca. 25 % der Fälle eine aktivierende K-Ras-Mutation. Tabelle 1.4 zeigt eine Übersicht über das Vorkommen von Mutationen der drei Ras-Isoformen in den häufigsten humanen Tumoren:

1.4. Das Adenokarzinom der Lunge

Ursprungs-Gewebe	KRAS (%)	HRAS (%)	NRAS (%)	Gesamt (%)
Pankreas	71	0	<1	71
Kolon	35	1	6	42
Dünndarm	35	0	<1	35
Gallenwege	26	0	2	28
Endometrium	17	<1	5	22
Lunge	19	<1	1	20
Haut (Melanom)	1	1	18	20
Zervix	8	9	2	19
Harntrakt	5	10	1	16

Abbildung 1.4: Onkogenes Ras findet sich in 27 % aller Tumore. Am häufigsten sind Mutationen im *K-ras*-Gen (27 % der Tumore), seltener sind das *N-ras*-Gen (11 %) oder das *H-ras*-Gen (4 %) durch Mutationen verändert. Die Inzidenz von Ras-Mutationen in verschiedenen Tumoren zeigt eine klare Assoziation zwischen der betroffenen Ras-Isoform und der Entstehung bestimmter Malignome. Adenokarzinome verschiedener Organsysteme enthalten bevorzugt mutiertes K-Ras, N-Ras ist bei hämatopoetischen Malignomen, H-Ras ist bei Urogenitalkarzinomen häufig mutiert. Tabelle übernommen aus [85].

1.4 Das Adenokarzinom der Lunge

Das Bronchialkarzinom ist mit 1.8 Millionen Neudiagnosen und 1.6 Millionen Todesopfern jährlich das häufigste Karzinom [23]. Histologisch wird es in kleinzelliges (*small cell lung cancer*, *SCLC*) und nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (*non small cell lung cancer*, *NSCLC*) unterteilt, wobei etwa 20 % der Lungenkarzinome Kleinzeller und 80 % nicht-kleinzellige Karzinome sind. Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom werden des weiteren die histologischen Subtypen Plattenepithelkarzinom (*squamous cell carcinoma*), Adenokarzinom und großzelliges Karzinom (*large-cell carcinoma*) unterschieden [35]. Das Adenokarzinom macht etwa 45 % der Tumore, das Plattenepithel 25 % und das großzellige Karzinom ca. 3,5 % aus, die übrigen 26,5 % der Tumore lassen sich histologisch nicht eindeutig zuordnen [29].

Die Inzidenz des Bronchialkarzinoms betrug Jahre 2012 weltweit 16.7 % für Männer und 8,7 % für Frauen mit den meisten Fällen in Europa (53.5/100.000) und Ostasien (50.4/100.000) [23]. Das Entstehen aller Tumorsubtypen ist stark mit Tabakkonsum assoziiert, was sich auch in den niedrigeren Inzidenzraten für Frauen widerspiegelt. Der Zusammenhang von Tabakkonsum und dem Entstehen eines Lungenkarzinoms ist am deutlichsten für das Plattenepithelkarzinom und

1.5. Genetische Grundlagen des Lungenadenokarzinoms

das kleinzellige Bronchialkarzinom. Adenokarzinome der Lunge entstehen als einziger Subtyp in signifikanter Anzahl auch bei Nichtrauchern, auch deshalb wurde lange kein Zusammenhang für das Auftreten eines Adenokarzinoms und Tabakkonsum vermutet. Mittlerweile zeichnet sich jedoch auch für diesen Karzinomtyp der Zusammenhang zwischen starkem Rauchen und dessen Entstehung ab [42, 47]. Generell zeigte die Inzidenz des Adenokarzinoms der Lunge besonders bei Frauen während der letzten Jahren eine stark zunehmende Tendenz und so haben Adenokarzinome mit einem Anteil von ca. 40 % aller Bronchialkarzinome das Plattenepithelkarzinom als häufigstes Bronchialkarzinom verdrängt [31, 60, 81].

Adenokarzinome der Lunge entstehen aus schleimproduzierenden Zellen oder Narbengewebe und sind zumeist in der Lungenperipherie lokalisiert. Durch frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung in Gehirn, Leber, Nebennierenrinde und Knochen ist die 5-Jahres-Überlebensrate stark vom Stadium bei Diagnosestellung abhängig. Bei kleinem Tumor ohne Fernmetastasen (TNM IA) beträgt sie ca. 50 %, bei größerem Tumor ca 40 % und bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen (TNM IIa,IIb oder IIIa) lediglich ca. 20 %. Die mediane Lebenserwartung liegt zwischen 60 (klinisches Stadium IA) und 6 Monaten (klinisches Stadium IV) [31]. Die histologische Klassifikation der *World Health Organisation (WHO)* der Adenokarzinome in bronchioloalveoläres (BAC), papilläres, azinäres und gemischtes Adenokarzinom erwies sich als klinisch ungünstig, da die meisten Adenokarzinome dem gemischten Subtyp angehören. 2011 wurde von der *International Association for the Study of Lung Cancer*, der *American Thoracic Society* und *European Respiratory Society (IASLC, ATS, ERS)* eine neue Einteilung in präinvasive, minimalinvasive und invasive Läsionen vorgestellt [93]. Diese Einteilung und Neubewertung der histologischen Wachstumsmuster anhand ihrer Invasivität bietet einen konkreten Anhalt für den resultierenden klinisch-therapeutischen Ansatz.

1.5 Genetische Grundlagen des Lungenadenokarzinoms

Lungenkarzinome vom Typ NSCLC sind auf molekularer Ebene äußerst komplex und heterogen. Es handelt sich um eine der Lungentumorklassen mit der größten Vielzahl genetischer Mutationen, wobei vor allem wachstumsfördernde und tumorinhibierende Signalwege bei der Entstehung eine Rolle spielen. Die am häufigsten veränderten Proto-Onkogene des Adenokarzinoms der Lunge sind K-Ras und der EGF-Rezeptor, wobei sich die beiden Mutationen innerhalb eines Tumors gegenseitig ausschließen. Das bedeutet, dass in einem Adenokarzinom der Lunge entweder nur der EGF-Rezeptor oder nur K-Ras onkogen mutiert oder überexprimiert sind [87].

1.6. Beeinflussung der Migration und Metastasierung durch onkogenes K-Ras 4B

Weitere typische Veränderungen betreffen die *anaplastic lymphoma kinase* (ALK), PI3K, BRAF und den *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2/neu). Veränderung von Tumorsuppressorgenen wie p53, PTEN und LKB-1 führen durch Inaktivierung dieser Proteine ebenfalls zu unkontrolliertem Wachstum der betroffenen Zellen. Seltener finden sich Mutationen z.B. in JAK2, ERBB4, RET, *fibroblast growth factor receptor* (FGFR1) und *discoidin domain receptor 2* (DDR2) [88]. Eine Sequenzierungsstudie von 31 NSCLCs erbrachte den Nachweis von 727 bis dato unbekanntem mutierten Genen, was die Komplexität auf molekularer Ebene verdeutlicht [50]. Die Schwierigkeit besteht in der Identifikation der für die maligne Transformation bedeutsamen Treibermutationen (*driver mutations*) innerhalb der großen Anzahl klinisch wenig relevanter Veränderungen (*passenger mutations*) [16]. Eine Studie des Institute National du Cancer (INCa) an 10.000 Patienten konnte in 46,2 % der Adenokarzinom-Patienten eine Treibermutation identifizieren. In 27 % der Patienten wurde eine K-Ras-Mutation nachgewiesen, in 9,5 % eine EGFR-Mutation und in 3,7 % ein ALK Rearrangement [5]. Während EGFR-Mutationen generell nicht mit Tabakkonsum assoziiert sind, konnte für K-Ras-Mutationen im Falle einer Mutation durch Basentausch (G→T oder G→C) ein solcher Zusammenhang bestätigt werden [47, 73].

1.6 Beeinflussung der Migration und Metastasierung durch onkogenes K-Ras 4B

Die Mehrzahl der NSCLC beherbergen eine Mutation des EGFR- oder *K-ras*-Gens. NSCLC-Zellen mit Expression von onkogenem K-Ras zeigen im Vergleich zu Tumoren ohne K-Ras-Mutation gesteigerte Motilität, Proliferationsrate und vermehrte Metastasenbildung. In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer K-Ras-Mutation und schweren Verläufen sowie reduziertem Überleben bei NSCLC-Patienten gezeigt werden [104]. Während es für EGFR-Mutation-tragende NSCLCs gute Therapieansätze mit Tyrosinkinaseinhibitoren wie Gefitinib oder Erlotinib gibt, zeigen diese Medikamente bei NSCLCs mit mutiertem K-Ras wenig bis keinen Effekt [10, 12].

Onkogenes K-Ras ist in die Entstehung praktisch aller Aspekte eines malignen Phänotyps involviert. So verursacht onkogenes K-Ras unter anderem Veränderungen der Zell-Zell-Interaktion durch Interaktion mit Adhäsionsproteinen wie E-Cadherin. E-Cadherin ist ein wichtiges Protein für die Erhaltung des epithelialen Phänotyps und gilt als eines der zentralen Proteine im Prozess der EMT [41]. Die EMT wiederum führt zur Reduktion des epithelialen Phänotyps und zur

Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps mit gesteigerter Zellmotilität und -migration [41]. In NSCLC-Zellen, die onkogenes K-Ras exprimieren, konnte gezeigt werden, dass K-Ras über den Raf-Signalweg eine beschleunigte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Slug bewirkt. Slug führt im Nukleus zur Repression des E-Cadherin-Gens, wodurch weniger E-Cadherin exprimiert und die Entstehung eines metastasierenden, mesenchymalen Phänotyps begünstigt wird [44]. In ersten Studien konnte eine Zunahme der E-Cadherin-Expression durch Acetylsalicylsäure (ASS) nachgewiesen werden.

Ein weiteres Beispiel ist der Einfluss von onkogenem Ras auf das Zytoskelett, wo es über den PI3-Kinase-Signalweg die Organisation und Polymerisierung von Aktin und Mikrotubuli sowie die Transkription mitogener Genprodukte beeinflusst und so die Zellteilung erhöht [13].

In NSCLC-Zellen vom Typ A549 konnte die Migration und Proliferation durch *downregulation* von K-Ras mittels *small interfering RNA* (siRNA) sowie MicroRNA (miR-181a-5p) deutlich gesenkt werden, was exemplarisch den Zusammenhang zwischen onkogenem K-Ras und der Entstehung eines aggressiv-invasiven Zellphänotyps zeigt [51].

1.7 Ziele der Arbeit

Das Adenokarzinom der Lunge weist in etwa 30 % der Fälle eine Mutation im K-Ras Gen auf und ist durch frühzeitige Metastasierung und schwere Verläufe gekennzeichnet. Neben onkogenem Ras spielen auch die in der Zelle vorliegenden Wildtyp-Ras-Isoformen eine zunehmend beachtete Rolle, unter anderem in der Vermittlung von RTK-vermitteltem *signaling* und im Zellüberleben [28, 106]. Ziele dieser Arbeit waren es, die NSCLC-Zellen hinsichtlich der Expression der Ras-Isoformen H-Ras, K-Ras 4B und N-Ras zu charakterisieren, das Verhältnis der Ras-Isoformen zueinander semiquantitativ abzuschätzen und die Aktivität der Ras-Isoformen zu bestimmen. Aufgrund der nicht-überlappenden Funktionen der Ras-Isoformen lag ein weiterer Fokus auf der Bestimmung der basalen Aktivität aller Ras-Isoformen mit Rücksicht auf das Vorliegen einer aktivierenden K-Ras-Mutation sowie die Charakterisierung der Auswirkung einer Stimulation mit EGF auf die Aktivierung der Ras-Isoformen. Ein weiteres Ziel der Arbeit lag in der Untersuchung des Migrationsverhaltens der Karzinomzelllinien unter standardisierten Laborbedingungen und die Einflüsse von Stimulation auf die Migration. Die Einflüsse von K-Ras 4B und Ras auf das Migrationsverhalten wurden durch die Inhibition von K-Ras 4B oder unspezifischer Blockade aller Ras-Isoformen durch verschiedene Ras-Inhibitoren weiter charakterisiert. In der Arbeit wurden fünf Zelllinien humaner Adenokarzinome des Typs NSCLC untersucht, die über

1.7. Ziele der Arbeit

aktivierende K-Ras-Mutationen (K-Ras G12S, G12D oder G12C) verfügen. Die Auswahl beinhaltet Zelllinien mit homozygoter K-Ras-Mutation (A549) und heterozygoter K-Ras-Mutation (A427, HCC44, H358), zudem wurde eine Zelllinie mit wildtypischem K-Ras (Colo699) untersucht. Als Kontrollzelllinie diente die bereits gut charakterisierte Pankreaskarzinomzelllinie Panc1.

2. Material

2.1 Chemikalien

Acrylamidlösung, 30 % (m/V)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin	Roth, Karlsruhe
<i>Albumin bovine Fraction V</i>	Serva, Heidelberg
<i>BCA-Protein Assay Reagent A</i>	Pierce, Rockford, USA
Bisacrylamidlösung, 2% (m/V)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Immobilon TM <i>Western Chemiluminescent HRP Substrate</i>	Merck Millipore, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau R250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Darmstadt
DMRIE-C Reagenz	Invitrogen, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glyzin	AppliChem, Darmstadt
Glyzerol	VWR, Darmstadt
Glutathion-Sepharose TM 4B	GE Healthcare, München
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche Diagnostics, Mannheim
Kaliumchlorid	Roth, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Millipore, Darmstadt
Kupfer-(II)-Sulfat	Riedel-de Haen, Seelze
Leupeptin	Serva, Heidelberg

2.2. Lösungen und Puffer

Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver FLUKA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MEM Non Essential Amino Acids	PAA, Pasching, Österreich
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	VWR, Darmstadt
Natriumhydrogensulfat	Baker, Deventer, Holland
4-Nitroblau-tetrazoliumchlorid (NBT)	Roth, Karlsruhe
OptiMEM I	Invitrogen, Darmstadt
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PefaBloc SC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau-S-Lösung	AppliChem, Darmstadt
Saccharose	Roth, Karlsruhe
<i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate</i>	Thermo Scientific, Erlangen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung	PAA, Pasching, Österreich
<i>Trypsin Inhibitor from Soybean (STI)</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 2.1: Chemikalien

2.2 Lösungen und Puffer

CMF-PBS 140mM NaCl 2,7 mM KCL 10mM Na ₂ HPO ₄ 10mM KH ₂ PO ₄	1x Lösung pH-Einstellung auf 7,4
Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung 10,0 % (V/V) Essigsäure	1x Lösung

2.2. Lösungen und Puffer

25,0 % (V/V) Isoproranol 0,25 g/l Coomassie Brilliant Blau R (Sigma-Aldrich #27816)	
Coomassie-Brilliant-Blau-Entfärbelösung 10,0 % (V/V) Essigsäure 12,5 % (V/V) Isoproranol 77,5 % (V/V) Wasser	1x Lösung
Laufpuffer SDS-Gele 50 mM Tris 384 mM Glyzin 0,1 % (M/V) SDS	1x Lösung
RIPA-Lysispuffer 150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl, pH 7,2 1,0 % (V/V) Triton X-100 0,5 % (V/V) Natriumdeoxycholat 0,1 % (M/V) SDS Proteaseinhibitor (siehe unten) 10 mM Na-Pyrophosphat 25 mM Na-Glycerophosphat 2 mM Na-Orthovanadate	1x Lösung
Ponceaurot-Färbelösung 0,2 % (m/V) Ponceau-S 3 % (m/V) Trichloressigsäure In Wasser gelöst	
Probenpuffer-SDS Tris 0,2 M 1M Saccharose 5 mM EDTA 0,2 % (M/V) Bromphenolblau	5 x Lösung pH 8,5
Proteasinhibitor 10 µM Pefabloc	1x Lösung gelöst in Tris/HCl, pH 7,2

2.3. Wachstumsfaktoren

10 nM Aprotinin 21 nM Leupeptin 50 nM Soybean Trypsininhibitor (STI)	
TBS 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 150 mM NaCl	1x Lösung
Wachstumsmedium DMEM 10 % (V/V) Fötale Kälberserum 1 % (V/V) Glutamax 1 % (V/V) nichtessentielle Aminosäuren	Life Technologies, Darmstadt #41965-039 PAA Lab (Pasching, Österreich) #A15-101 Life Technologies # 35050-038 Life Technologies #11140-035

Tabelle 2.2: Lösungen und Puffer

2.3 Wachstumsfaktoren

<i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF) (Stammlösung: 100 ng/ml in dest. H ₂ O)	AppliChem, Darmstadt
<i>Lysophosphatidic Acid</i> (LPA) (Stammlösung: 10 mM in dest. H ₂ O)	Sigma Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 2.3: Wachstumsfaktoren

2.4 Inhibitoren von K-Ras/Ras

<i>Farnesyl Thiosalicylic Acid</i> (FTS) Stammlösung 50 mM in DMSO	Cayman Chemical / Biomol, Hamburg
<i>Fendiline Hydrochloride</i> Stammlösung 10 mM in Ethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
<i>Trifluoroacetate Salt</i> (FTI-227) Stammlösung 10 mM in H ₂ O	Sigma Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 2.4: Inhibitoren

2.5 Zelllinien

2.5.1 Prokaryontische Zelllinien

Escherichia coli BL21 (DE3), New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.5.2 Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Bestellnummer	Charakterisierung der Zelllinie
A427	ATCC® HTB-53™	Humanes Lungenadenokarzinom, epitheliale Morphologie. Homozygote, aktivierende Punktmutation von K-Ras in Kodon 12 mit Austausch von Glycin gegen Asparaginsäure (G12D)
A549	ATCC® CCL-185™	Humanes Lungenadenokarzinom, epitheliale Morphologie. Homozygote, aktivierende Punktmutation von K-Ras in Kodon 12 mit Austausch von Glycin gegen Serin (G12S)
Colo699	DSMZ-ACC 196	Humanes Lungenadenokarzinom, epitheliale Morphologie. Keine K-Ras-Mutation (K-Ras Wildtyp)
H358	ATCC® CRL-5807™	Humanes bronchoalveoläres Karzinom, epitheliale Morphologie. Heterozygote, aktivierende Punktmutation von K-Ras in Kodon 12 mit Austausch von Glycin gegen Cystein (G12C)
HCC44	DSMZ-ACC 534	Humanes nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom. Heterozygote, aktivierende Punktmutation von K-Ras mit Austausch von Glycin gegen Cystein (G12C)
Panc1	ATCC® CRL-1469™	Humane Pankreaskarzinomzelllinie, epitheliale Morphologie. Heterozygote, aktivierende Punktmutation von K-Ras in Kodon 12 mit Austausch von Glycin gegen Valin (G12V)

Tabelle 2.5: Zelllinien

Zelltyp und genetische Eigenschaften sind den offiziellen Angaben der ATCC (*American Type Culture Collection*, (Manassas, (VA) USA)) und DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, (Braunschweig, Deutschland)) entnommen.

2.6 Plasmide

2.6.1 Prokaryontische Expressionsvektoren

pGEX2TK/GST-RBD, JL Bos (Utrecht, Niederlande), [18]

pGEX2TK/GST, Pharmacia (Uppsala, Schweden)

2.6.2 Eukaryontische Expressionsvektoren

pEGFP-C3	Invitrogen, Darmstadt
pcDNA3/H-Ras V12	Prof. Dr. Klaudia Giehl (Gießen)
pcDNA3/K-Ras V12	Prof. Dr. Klaudia Giehl (Gießen)
pcDNA3/N-Ras V12	Prof. Dr. Klaudia Giehl (Gießen)
pEGFP-C3/HA-H-Ras	Prof. Dr. Klaudia Giehl (Gießen)
pEGFP-C3/HA-K-Ras	Prof. Dr. Klaudia Giehl (Gießen)
pEGFP-C3/HA-N-Ras	Prof. Dr. Klaudia Giehl (Gießen)

Tabelle 2.6: Expressionsvektoren

2.7 Molekulargewichtsmarker für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, Deutschland),

#26616

Molekulargewicht
170 kDa
130 kDa
100 kDa
70 kDa
55 kDa
40 kDa
35 kDa
25 kDa
15 kDa
10 kDa

2.8 Antikörper

2.8.1 primäre Antikörper

Verdünnung der primären Antikörper:

- (1) 0,5% Milchpulver in TBS
- (2) 0,3% Milchpulver in TBS
- (3) 3% BSA

Spezifität	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.
anti-pan-Ras (Ab-3)	Maus	1:1000 in (1)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)	#OP40
MS X H-Ras	Maus	1:4000 in (2)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)	#NG1913432
anti-c-H-Ras (Ab-1)	Maus	1:1000 in (2)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)	#OP23
H-Ras (F235)	Maus	1:1000 in (2)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)	#sc-29

2.8. Antikörper

K-Ras 2B (C-19)	Kaninchen	1:1000 in (2)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)	#sc-521
K-Ras (F234)	Maus	1:1000 in (2)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)	#sc-30
anti-c-K-Ras	Maus	1:1000 in (2)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)	#MABS194
K-Ras	Kaninchen	1:1000 in (2)	Biorbyt Limited (Cambridge, United Kingdom)	#orb10963
anti-c-K-Ras (Ab-1)	Maus	1:500 in (2)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)	#OP24
anti-c-N-Ras (Ab-1)	Maus	1:500 in (2)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)	#OP25
β -Aktin	Maus	1:5000 in (1)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	#A-5441
pan ERK	Maus	1:2000 in (3)	BD Transduction (Heidelberg, Deutschland)	#610124
Phospho-p42/44 MAPK XP	Kaninchen	1:2000 in (3)	Cell Signaling (Frankfurt a. Main, Deutschland)	#4370

Tabelle 2.7: primäre Antikörper

2.8.2 sekundäre Antikörper

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G, HRP: *horseradish peroxidase*

Alle sekundären Antikörper wurden in TBS verdünnt.

2.9. Geräte

Spezifität	Kopplung	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.
Maus IgG	Alkalische Phosphatase	1:1000	Sigma, Taufkirchen	#A5278
Maus IgG	HRP	1:5000	New England Biolabs, Frankfurt am Main	#7076
Rabbit IgG	HRP	1:5000	New England Biolabs, Frankfurt am Main	#7074
Rabbit IgG	IRDye 680LT	1:10000	LI-COR GmbH, Bad Homburg vor der Höhe	#926-68021
Rabbit IgG	IRDye 800CW	1:10000	LI-COR GmbH, Bad Homburg vor der Höhe	#926-32211
Maus IgG	IRDye 800CW	1:10000	LI-COR GmbH, Bad Homburg vor der Höhe	#926-32210
Maus IgG	IRDye 680LT	1:10000	LI-COR GmbH, Bad Homburg vor der Höhe	#926-68020

Tabelle 2.8: sekundäre Antikörper

2.9 Geräte

Gerät	Hersteller
CO ² -Inkubator HERAccl 150i	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
ELx800 <i>absorbance microplate reader</i>	BioTek® (Bad Friedrichshall)
Electrophoresis Power Supply Consort E424	Fröbel Labor Technik (Lindau)
Flow Msc-Adavantage	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
GeneFlash	Syngene bio imaging (Frederick, USA)
Gelgießständer (4 Gele)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Inverses Lichtmikroskop PrimoVert	Carl Zeiss (Oberkochen)
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss (Oberkochen)
JULI ^{T M} Smart fluorescent cell analyser	DigitalBio (Seoul, Korea)

2.10. Verbrauchsmaterialien

MaxQ 400 Bakterienschüttler	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg)
SDS-Gelelektrophoresekammer	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Schüttelinkubator MaxQ 4000	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
SmartSpec™ 3000	Bio Rad Laboratories (München)
Western Blot Detektionssystem Odyssey SA	LI-COR® Biosciences (Bad Homburg)
Western Blot Detektionssystem Fusion SL4-3500 WL	Vilber Lourmat, (Eberhardzell)

Tabelle 2.9: Geräte

2.10 Verbrauchsmaterialien

Protran BA85 <i>Nitrocellulose Transfer Membrane</i>	GE-Healthcare (München)
Whatman-Papier	GE-Healthcare (München)
Zellkulturschale 100 mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschale 60 mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkultur 6-Well Platte	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Zellschaber (30 cm)	TPP (Trasadingen, Schweiz)

Tabelle 2.10: Verbrauchsmaterialien

2.11 Software

AnalySIS 3.2	Imaging System Soft Imaging System (Münster)
CellSens Dimension	Olympus (Hamburg)
Fusion 15.18	Vilber Lormat, Eberhardzell
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software Inc. (San Diego, USA)
ImageQuant 5.0	GE Healthcare (München)
Microsoft Excel 2010	Microsoft (Unterschleißheim)
Microsoft PowerPoint 2010	Microsoft (Unterschleißheim)

Tabelle 2.11: Software

3. Methoden

3.1 Kultivierung humaner Zellen

Die verwendeten, adhären wachsenden humanen Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) + 10 % FCS (Wachstumsmedium) kultiviert. Für 100 mm Zellkulturschalen wurden 10 ml, für 60 mm Zellkulturschalen 3 ml Medium verwendet. Alle 2-3 Tage wurde das Kulturmedium erneuert und konfluent gewachsene Zellen wie in Kapitel 3.2 beschrieben auf neue Kulturschalen verteilt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 10 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit im CO₂-Inkubator aufbewahrt. Alle Arbeiten an den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in der Laminar Flow Werkbank durchgeführt.

Wachstumsmedium: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) + 10%(V/V) fötales Kälberserum (FCS) + 1%(V/V) MEM *Non-essential Amino Acids* (100x) + 1%(V/V) GlutaMAX^T M (200 mM L-alanyl-LGlutamin)

3.2 Passagieren der Zellen mittels Trypsin-EDTA

Um ein Absterben von konfluent gewachsenen Zellen zu verhindern, erfolgte das Passagieren der Kultur in neue Kulturgefäße. Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und anschließend das restliche Medium mit 5 ml CMF-PBS von den Zellen gewaschen. Anschließend wurden die Zellkultur zur Lösung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten für 5 min mit 2-3 ml 1 x Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Die nun vom Schalenboden gelösten Zellen wurden in ein steriles Röhrchen überführt und die Zellsuspension für 3 min bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in ca. 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert, in der gewünschten Verdünnung in ein neues Kulturgefäß ausgesät und das Kulturgefäß zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen manuell geschwenkt.

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

Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05% (m/V) Trypsin, 0,25% EDTA

3.3 Zellzahl-Bestimmung

Die Zellen wurden wie oben beschrieben zunächst mittels Trypsin-EDTA vom Schalenboden gelöst, abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Von der Suspensionslösung wurden ca. 100 µl in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, aus welchem 10 µl entnommen und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen wurden. Anschließend wurden mikroskopisch die Zellen in mindestens vier Quadranten ermittelt und hieraus der Mittelwert bestimmt. Für die Anzahl der Zellen pro ml Suspensionslösung wurde der errechnete Mittelwert mit 10^4 multipliziert.

3.4 Auftauen eingefrorener Zellen

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und in 5ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Suspension wurde für 3 min bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 5ml Wachstumsmedium resuspendiert und in ein Kulturgefäß ausgesät.

3.5 Transiente Transfektion von Panc1-Zellen mit DMRIE-C

Die transiente Transfektion eukaryontischer Panc1-Zellen mit DMRIE-C (Invitrogen, Darmstadt) und jetPEI (Polyplus-transfection SA, Illkirchen) erfolgte nach unten aufgeführten Kurzprotokollen. Die Transfektion erfolgte grundsätzlich bei 80 % Zellkonfluenz, hierfür wurden 24 h vor der Transfektion 1×10^6 Panc1-Zellen in einer 100 mm Zellkulturschale ausgesät.

Lösung A	60 mm Schale	100 mm Schale	Lösung B	60 mm Schale	100 mm Schale
Plasmid-DNA	5 µg	10 µg	DMRIE-C	15 µl	30 µl
OptiMEM I	250 µl	500 µl	OptiMEM I	250 µl	500 µl

Tabelle 3.1: Pipettierschema für die transiente Transfektion mit DMRIE-C

Beide Lösungen wurden gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden beide Lösungen in einem neuen sterilen Reaktionsgefäß gemischt und 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen und dann frisches Wachstumsmedium vorgelegt (4 ml/100 mm, 1,5 ml/60 mm-Schale). Jetzt wurde die

3.6. Transiente Transfektion mit jetPEI

Transfektionslösung tropfenweise zu den Zellen gegeben und diese wurden für 6 h bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen je nach Fragestellung mit 10 ml (100 mm-Schale) bzw. 3 ml (60 mm-Schale) Wachstumsmedium oder DMEM pur überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 24-48 h bei 37 °C und 10 % CO₂.

3.6 Transiente Transfektion mit jetPEI

Die Zellen wurden 24h vor der Transfektion ausgesät. Für die Transfektion wurden in sterilen Reaktionsgefäßen kombiniert:

Lösung A	60mm Schale	100mm Schale	Lösung B	60mm Schale	100mm Schale
Plasmid-DNA	4 µg	8 µg	jetPEI	8 µl	16 µl
150mM NaCl	250 µl	500 µl	150mM NaCl	250 µl	500 µl

Tabelle 3.2: Pipettierschema zur transienten Transfektion mit JetPEI

Die beiden Lösungen wurden gemischt und anschließend Lösung B in Lösung A gegeben, sofort vermischt und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. In die Zellkultur-Schalen wurde DMEM ohne Zusätze vorgelegt und die Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Der Transfektionsansatz wurde anschließend für 6 – 48 h bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert.

3.7 Herstellung von Zelllysaten

Zur Gewinnung zellulärer Proteine wurden die Zellen bei Erreichen von ca. 95 % Konfluenz lysiert. Zunächst wurden die Zellen mit 5ml kaltem CMF-PBS gewaschen und anschließend durch die Zugabe von 500µl Ras-RIPA-Puffer pro 10 cm-Schale die Lyse durchgeführt. Dann wurden die Zellen mittels Zellschaber von der Schale gelöst und in ein steriles, vorgekühltes 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Tuberkulinspritze wurden die Zellen homogenisiert und für 15min bei 4°C und 13 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das aus unlöslichen Zellbestandteilen bestehende Pellet verworfen. Zur langfristigeren Aufbewahrung erfolgte die Aliquotierung des Überstands und das Einfrieren bei -80 °C.

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

Ras-RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7,0); 150 mM NaCl; 0,1 % (V/V) SDS; 1%(V/V) Triton X-100; 0,5% Na-

3.8. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (BCA)

Desoxycholat; 1,39 mM Pefabloc, 15 μ M Aprotinin; 21 μ M Leupeptin; 50 μ M Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)

Vor Stimulationsexperimenten wurden die Zellen für 24 h in DMEM ohne Zusätze ausgehungert und anschließend für einen definierten Zeitraum das Stimulans zum Kulturmedium hinzugegeben. Durch Waschen mit eiskaltem CMF-PBS wurde die Reaktion beendet und anschließend die Lyse der Zellen wie oben beschrieben durchgeführt.

3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (BCA)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einem Zelllysate wurde der *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (BCA) durchgeführt. Die Methode beruht auf der quantitativen Reduktion von zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen Kupferionen ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{+}$) in Anwesenheit von Protein. Hierbei bilden zwei Moleküle Bicinchoninsäure mit einem Cu^{+} -Ion ein lila Reaktionsprodukt. Aufgrund des nahezu linearen Zusammenhangs zwischen Färbung und Proteinkonzentration der Probe kann von der photometrisch gemessenen Absorption (562 nm) auf den Proteingehalt der Probe geschlossen werden.

Für die Proteinbestimmung wurde zunächst eine Eichgerade wie in Tabelle 3.3 aufgeführt in eine 96-Loch Mikrotiterplatte pipettiert. Die zu vermessenden Zelllysate wurden 1:10 mit H_2O verdünnt und je 20 μ l der verdünnten Probe in die 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden 180 μ l BCA-Farbreagenz zu Eichgerade und Proben gegeben und die Mikrotiterplatte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte im Elisa-Reader ELx800 *Absorbance Mikroplate Reader* (Bio Tek, Bad Friedrichshall). Anhand der ermittelten Absorption bei $\lambda = 562$ nm im Vergleich zur Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration berechnet.

BCA-Farbreagenz: 50 Volumenanteile Pierce BCA Protein Assay Reagent A (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) + 1 Volumenanteil 4% (m/V) Kupfer-II-Sulfat-Lösung

3.9. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

	1	2	3	4	5	6	7
A	20 µl H ₂ O	2µl BSA + 18 µl H ₂ O	4µl BSA + 16µl H ₂ O	6µl BSA + 14µl H ₂ O	8µl BSA+ 12µl H ₂ O	10µl BSA+ 10µl 2H ₂ O	12,5µl BSA 7,5µl H ₂ O
B	20 µl H ₂ O	2µl BSA + 18 µl H ₂ O	4µl BSA + 16µl H ₂ O	6µl BSA + 14µl H ₂ O	8µl BSA+ 12µl H ₂ O	10µl BSA+ 10µl 2H ₂ O	12,5µl BSA 7,5µl H ₂ O

Tabelle 3.3: Pipettierschema für die Eichgerade zur Durchführung des *Bicinchoninic Acid Protein Assay*

3.9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient dazu, die in einem Zelllysate enthaltenen Proteine zu trennen. Hierfür werden Gele benutzt, die aus quervernetzten Acrylamid und Bisacrylamid bestehen. Ein Gel setzt sich aus Trenn- und Sammelgel mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen zusammen. Wird an das Gel Spannung angelegt, wandern die negativ geladenen Proteine Richtung Anode durch das Gel. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels und die Größe der Proteine bestimmen die Wanderungsgeschwindigkeit. In Tabelle 3.4 ist die Zusammensetzung für 3 Trenngele unterschiedlicher Acrylamidkonzentration und das Sammelgel aufgeführt.

Die Gellösung wurde gemäß Tabelle 3.4 hergestellt, zwischen zwei gereinigten Glasplatten gegossen und mit Isobutanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung des Gels wurde das Isobutanol mit H₂O abgewaschen, das Obergel gegossen und durch einen Kamm im Obergel die gewünschte Anzahl Probenaschen erzeugt. Die aufzutrennenden Proben wurden in 10-20 µl 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C erhitzt, um die Denaturierung der Sekundär- und Tertiärstrukturen zu gewährleisten. Anschließend wurde das Gel in einer Laufkammer befestigt und diese mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Für die Zuordnung einer Größe der Banden in kDa wurden in einer Probenasche 2 µl Fermentas prestained Proteinladder aufgetragen.

5 x SDS-Probenpuffer: 200 mM Tris/HCl pH 8,8; 5 mM EDTA; 1 M Saccharose;

0,1% (m/V) Bromphenolblau; 1 mM DTT; 2% (m/V) SDS

1 x SDS-Laufpuffer: 0,5 M Glycin; 50 mM Tris; 0,1% (m/V) SDS

3.10. Coomassie-Blaufärbung

	10%	12,5%	13,5%	Sammelgel
	2 Gele	2 Gele	2 Gele	2 Gele
30%(m/V) Acrylamid	2,6ml	3,25ml	3,5ml	0,38ml
2%(m/V) Bisacrylamid	1ml	1,2ml	1,4ml	0,15ml
3M Tris/HCL pH 8,8	1ml	1ml	1ml	-
1M Tris/HCL pH 6,8	-	-	-	0,38ml
10%(m/V) SDS	0,08ml	0,08ml	0,08ml	0,03ml
60%(m/V) Saccharose	-	-	-	0,75ml
H ₂ O destilliert	3,3ml	2,45ml	1,95ml	1,3ml
TEMED	8 µl	8µl	8µl	4µl
APS	50µl	50µl	50µl	40µl
Trennbereich	130-30kDa	100-20kDa	80-15kDa	-

Tabelle 3.4: Zusammensetzung von Trenngelen sowie Sammelgel für die SDS-PAGE

3.10 Coomassie-Blaufärbung

Nachdem die Proteine im SDS-PAGE aufgetrennt wurden, können sie mit Hilfe von Coomassie Brilliant Blau R-250 angefärbt werden. Coomassie Brilliant Blau ist ein anionischer Farbstoff, der an kationische Bereiche der Proteine bindet und hierdurch eine blaue Färbung erzeugt. Das Trenngel wurde vom Sammelgel befreit und auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für einige Stunden in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel in die Entfärbelösung gelegt. Bei vollständiger Entfärbung des Hintergrundes und gleichzeitig guter Sichtbarkeit der Banden wurde das Gel aus der Entfärbelösung genommen.

Färbelösung: 10 % (V/V) Essigsäure; 25 % (V/V) Isopropanol; 0,03 % (m/V) Coomassie Brillant Blau R-250

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

3.11 Western Blot

Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden für die Detektion mit spezifischen Antikörpern auf Nitrocellulosemembran (Protran BA85 *Nitrocellulose Transfer Membrane*) übertragen. In ein Blotting-Gitter wurden in dieser Reihenfolge vier Schwammtücher, zwei Blatt Whatman-Papier, Nitrocellulosemembran, Gel, zwei weitere Blatt Whatman-Papier und vier Schwammtücher möglichst luftblasenfrei geschichtet. Alle Komponenten wurden zuvor in Transferpuffer getränkt. Das fertig zusammen gesetzte Blotting-Gitter wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte Mini-blotkammer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gespannt. Hierbei war darauf zu achten, das Gitter so einzuspannen, dass die Nitrocellulosemembran anodenseitig lag. Nun wurde eine konstante Spannung von 70 V angelegt, wodurch die negativ geladenen Proteine vom Gel Richtung Anode auf die Nitrocellulosemembran transferiert wurden. Die Zeit für den Transfer richtete sich nach der Proteingröße, für das relativ kleine Ras (21 kDa) wurden 45 min Transferzeit genutzt.

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

3.12 Immundetektion mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Transfer wurde der Blot in destilliertem H₂O gewaschen und zur Kontrolle des Proteintransfers und Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der Gelspuren unspezifisch und reversibel mit Ponceau S-Lösung rot angefärbt.

Ponceau-S Lösung: 0,2 % (m/V) Ponceau-S; 3 % (m/V) Trichloressigsäure

Die Entfärbung der Nitrocellulosemembran erfolgte in H₂O, anschließend wurden die Markerbanden zur späteren Identifikation mit Bleistift markiert. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran in 1x PBS vollends entfärbt und zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen für 1h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit Blockingsubstanz inkubiert. Je nach Antikörper wurde als Blockingsubstanz 1x TBS + 5 % Milchpulver (MS X H-Ras, Merck Millipore; Anti-c-N-Ras (Ab-1), Merck Millipore), 1x TBS mit 0,1 % Tween20 + 3 % Milchpulver (K-Ras 2B(C19), Santa Cruz Biotechnology) oder 1x TBS + 3 % BSA (pan ERK, BD Transduction; Phospho-p42/44 MAPK XP, Cell Signaling) verwendet. Nach erfolgtem *Blocking* wurde der Primärantikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die exakten Antikörperverdünnungen und Lösungen sind in Kapitel 2.8.1 vermerkt. Nicht proteingebundene

3.12. Immundetektion mit spezifischen Antikörpern

Reste des 1. Antikörpers wurden nach Inkubation durch Waschen für 1 x 10 min in TBS-T (1x TBS + 0,1 % Tween 20) und 2x 10 min in 1 x TBS entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler, die Verdünnungen sind Kapitel 2.8.2 zu entnehmen. Anschließend wurden Reste des Sekundärantikörpers durch erneutes dreimaliges Waschen entfernt. Die Entwicklung der Blots erfolgte entsprechend der Modifikation des Sekundärantikörpers.

3.12.1 ECL-Westernblot-Detektionssystem

Bei Verwendung von *Horseradish-Peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern wurde die Membran mit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) inkubiert. Hierfür wurden die *Stable Peroxide Solution* und die *Luminol/Enhancer Solution* im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran für ca. 2 min mit der Mischung bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Das in der *Luminol/Enhancer Solution* enthaltene Luminol wird durch die HRP oxidiert. Die Signale entstehen, wenn das in seinen Ausgangszustand zurückfallende Luminol Licht emittiert. Die Membran wurde nach Inkubation kurz abgetupft, mit Frischhaltefolie bedeckt und Lichtblitze im Fusion SL4-3500.WL *Chemiluminescence Imagingsystem* (Vilber Lourmat, Eberhardzell) detektiert. Abhängig von der Signalstärke wurden zunächst die Belichtungsdauer und Sensitivität digital angepasst, bei nicht ausreichender Signalqualität wurde *ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Merck Millipore, Darmstadt) auf die Membran gegeben und erneut im Fusion SL4-3500.WL analysiert.

3.12.2 LI-COR Odyssey Westernblot-Detektionssystem

Bei Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte die Detektion im *Odyssey Sa Infrared Imaging System* (LI-COR). Die an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe emittieren bei Anregung durch einen Infrarotlaser Licht in den Wellenlängen 700 nm oder 800 nm. Das System ermöglicht die Entwicklung in zwei (Farb-)Kanälen und somit die Detektion von zwei verschiedenen Proteinen gleichzeitig, vorausgesetzt, die Primärantikörper entstammen unterschiedlichen Spezies. Zur Entwicklung wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper auf dem Schüttler inkubiert, anschließend dreimal mit TBS-T/TBS für 10 min gewaschen und in das *Odyssey Sa Infrared Imaging System* (LI-COR) gelegt.

3.13. Elution gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran

TBS: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4

TBS-T: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4 + 0,05 % Tween 20

3.12.3 Alkalische Phosphatase-Färbung

Bei alkalische Phosphatase (AP) gekoppeltem Sekunärantikörper wurde die Membran 1 x 10 min mit TBS-T, 1 x 10 min mit TBS und 1-3 x 10 min mit AP-Puffer gewaschen. Durch den basischen pH-Wert des AP-Puffers erfolgte die Aktivierung der alkalischen Phosphatase. Zur Entwicklung wurden 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und AP-Puffer im Verhältnis 1:1:25 gemischt und gleichmäßig auf dem Blot verteilt. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt so lange, bis die Banden durch die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase gut sichtbar wurden. Dann wurde die Reaktion durch Abspülen der Entwicklungslösung mit H₂O gestoppt. Die Inkubation sollte nicht länger als 30 min erfolgen und die Membran nach Entwicklung zügig eingescannt werden, da die Kontraste beim Trocknen der Membran stark verblassen.

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

NBT: 3 % (m/V) NBT in 70 % (V/V) Dimethylformamid (DMF)

BCIP: 1,5 % (m/V) BCIP in 100 % (V/V) DMF

3.13 Elution gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran

Für die Elution gebundener Antikörper wurde die Membran für 5min bei Raumtemperatur mit Elutionspuffer auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde 2 x für 10 min mit reichlich H₂O und 1x für 10 min mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die erneute Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen für 30-60 min, bevor erneut mit Primär- und Sekunärantikörpern inkubiert wurde.

Elutionspuffer: 0,2 M Glyzin; 0,5 M NaCl; pH 2,8

3.14 Kultivierung von Bakterien

In dieser Arbeit wurden für die Gewinnung von GST-RBD für den Ras-GTP Bindungsassay (3.17) *Escherichia coli* BL21 (DE3) verwendet. Die Kultivierung erfolgte in Lysogeny-Broth (LB)-Medium. Zur Kultivierung und Selektion der Bakterien erfolgte zunächst die Anlage einer Übernachtskultur in 4 ml LB-Medium mit Zugabe eines Antibiotikums gemäß der plasmid-codierten Resistenz. Die Kultur wurde übernacht auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Übertragung auf eine LB-Agarplatte und Inkubation bei 37 °C.

LB-Medium: 1,0 % (m/V) Trypton, 0,5 % (m/V) Hefeextrakt, 1,0 % (m/V) NaCl, pH 7,5

3.15 Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgte die Entnahme einer Einzelkolonie von einer Agarplatte und daraus die Herstellung einer Vorkultur in 3 ml LB-Medium. Diese wurde übernacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert und dann in 100 ml LB-Medium überführt. Anschließend wurde diese bis zu einer optischen Dichte von 600 nm inkubiert und dann bei 3000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 mM CaCl₂-Lösung steril resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert und erneut bei 3000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterien nochmals in 5 ml 100 mM CaCl₂-Lösung mit 30 % (V/V) Glycerin resuspendiert und die kompetenten Bakterien in Trockeneis gefroren und bei -80 °C in 1 ml-Aliquots eingelagert.

LB-Medium: 1,0 % (m/V) Trypton, 0,5 % (m/V) Hefeextrakt, 1,0 % (m/V) NaCl, pH 7,5

3.16 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden in dieser Arbeit 200 µl kompetente *Escherichia coli* BL21 (DE3) auf Eis aufgetaut und mit 100 µl TCM-Puffer (4 °C) sowie 50 ng Plasmid-DNA (pGEX-2TK/GST-RBD oder pGEX-2TK-GST) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 3 min auf 42 °C erhitzt und für 1 min auf Eis abgekühlt. Dieser Hitzeschock gefolgt von Abkühlung bewirkte die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien. Nun wurden 700 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 37 °C und 200 Upm auf dem Schüttler inkubiert. Entsprechend der auf dem Plasmid kodierten Resistenz werden 100-400 µl Bakteriensuspension mit einem Spatel auf einer mit Ampicillin versehenen LB-Agarplatte (*LB Amp⁺* - Agarplatte)

ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium : 1,0 % (m/V) Trypton, 0,5 % (m/V) Hefeextrakt, 1,0 % (m/V) NaCl, pH 7,5

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

3.17 Ras-GTP Bindungsassay

Der Ras-GTP Assay dient der spezifischen Präzipitation von aktivem, GTP-gebundenem Ras aus einem Zellysate. Hierfür wird die *Ras-Binding-Domain* (RBD) des Ras-Effektors cRaf-1 verwendet [18]. GTP-gebundenes Ras bindet im Vergleich zu GDP-gebundenem Ras mit einer um Faktor tausend erhöhten Affinität an die RBD von cRaf-1. In den hier verwendeten transformierten *Escherichia coli* wird die RBD gemeinsam mit der Glutathion S-Transferase (GST) als Fusionsprotein exprimiert (GST-RBD), welches im Assay wiederum an Glutathion-Sepharose 4B bindet. Durch das Gewicht der Glutathion-Sepharose Beads kann der gesamte Komplex aus Ras-GST(-RBD)-Glutathion-Sepharose abzenrifugiert und präzipitiert werden.

3.17.1 Expression von GST-RBD bzw. GST-Expression in *E.coli* und Aufreinigung

Für die Gewinnung der Fusionsproteine GST und GST-RBD wurden kompetente *Escherichia coli* wie in 3.16 beschrieben mit Plasmid pGEX2TK/GST-RBD oder pGEX2TK/GST transformiert. Anschließend erfolgte die Anlage einer 50 ml Übernacht-Kultur der transformierten Bakterien gemäß der Plasmidresistenz in 50 ml LB-Medium mit Ampicillin. Diese Vorkultur wurde 1:10 in LB-Medium + Ampicillin verdünnt und auf dem Schüttler bis zu einer optischen Dichte 600 nm inkubiert. 1 ml der Kultur wurde vor Induktion der Plasmidexpression als Negativkontrolle entnommen. Die Induktion der Plasmidexpression wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und die Kultur anschließend für 2 h bei 37 °C und 220 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Als Positivkontrolle für die erfolgreiche Plasmidexpression wurde anschließend erneut 1 ml der Kultur entnommen. Die nächsten Schritte dienen dem Gewinn der exprimierten Fusionsproteine aus den Bakterien. Die restliche Kultur wurde hierfür für 10 min bei 4 °C und 7700 x g zentrifugiert und das Pellet mit 15 ml Lysispuffer resuspendiert. Zur mechanischen Fragmentierung der bakteriellen Zellwand erfolgte die Sonizierung der Suspension mittels Ultraschall für 6 x 1 min auf Eis. Anschließend wurde Triton X-100 bis zu einer Konzentration von 1 % zugegeben und die Lösung für 30 min bei 4 °C unter Rühren inkubiert und dann für 10min bei 4 °C und 12 000 x g zentrifugiert. Der GST bzw. GST-RBD enthaltende Überstand wurde mit Glycerol versetzt, aliquotiert und bei -80

°C eingefroren, das Pellet wurde verworfen.

Lysispuffer: 1 x PBS mit 0,5 mM DTT; 0,1 µM Aprotinin; 1 µM Leupeptin; 1 µM Pepstatin A,

3.17.2 Quantifizierung von GST bzw. GST-RBD im Bakterienlysat

Zur Quantifizierung der GST- bzw. GST-RBD-Menge im Bakterienlysat wurden 50, 100 und 200 µl *E.coli*-Lysat in 500 µl Lysispuffer für 30 min bei Raumtemperatur an je 20 µl Glutathion-Sepharose 4B gebunden. Anschließend wurden die Beads 3x mit 300 µl Ras-RIPA Puffer gewaschen, der Überstand mit einer Hamilton-Pipette abgesaugt und 20µl Probenpuffer zugegeben. Die Proben wurden dann zur Lösung der Fusionsproteine von den Beads für 10 min bei 95 °C aufgekocht und mittels SDS-PAGE (siehe Kap.:3.9) aufgetrennt. Zur semiquantitativen Bestimmung der entstandenen Bandendicke wurden auf das Gel 1,2 und 5 µl BSA (2 mg/ml) aufgetragen. Das SDS-Gel wurde in Coomassie-Blau gefärbt.

Lysispuffer: 1 x PBS mit 0,5 mM DTT; 0,1 µM Aprotinin; 1 µM Leupeptin; 1 µM Pepstatin A,

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl; 50 mM Tris, 1,0 % (V/V) Triton X-100; 0,5 % (V/V) Natriumdeoxycholat; 0,1 % (M/V) SDS; Proteaseinhibitor, 10 mM Na-Pyrophosphat, 24 mM Na-Glycerophosphat, 2 mM Na-Orthovanadat

3.17.3 Bindung von Ras-GTP an GST-RBD

Zunächst wurden 20 µl Glutathion-Sepharose 4B Beads in ein leeres Reaktionsgefäß vorgelegt und die Beads zur Entfernung von Resten des Aufbewahrungspuffers 2 x mit 200 µl Ras-RIPA-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschen wurde für 1 min bei 5000 x g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Im nächsten Schritt wurde zu den gewaschenen Glutathion-Sepharose-Beads 50 µl GST-RBD und 500 µl Ras-RIPA-Puffer gegeben und zur Bindung GST-RBD an die Beads für 30 min *end-over-end* bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die nun GST-RBD-gekoppelten Beads 3x mit Ras-RIPA-Puffer gewaschen. Zellysate wurden wie in Kapitel 3.7 hergestellt und die Proteinkonzentration mittels Proteinbestimmung (Siehe Kap.: 3.8) bestimmt. Die Menge Zellysate, die 1 mg Protein im BCA entsprach, wurde zu den GST-RBD-gekoppelten Beads gegeben und das Gemisch für 2 h bei 4 °C *end-over-end* inkubiert. 50 µg Protein des Zellysats wurden asserviert. Danach wurden die Beads, an die über GST-RBD nun aktives Ras aus dem Zellysate gekoppelt war, drei Mal mit 500 µl Ras-RIPA-Puffer gewaschen,

der Überstand abgesaugt und somit das restliche Zelllysate entfernt. Zu den trocken gesaugten Beads wurden dann je 20 µl Probenpuffer gegeben und die Proben für 10 min bei 95 °C aufgeköcht, um die Bindung von Ras-GTP an die Beads zu lösen. Die nun ausschließlich Ras-GTP enthaltenden Proben wurden abpipettiert, auf ein 13,5 % Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE (siehe Kap.: 3.9) aufgetrennt. Die zuvor asservierten 50 µg Volllysate wurden auf ein weiteres 13,5 % Gel aufgetragen und ebenfalls aufgetrennt. Der Transfer der Proben auf Nitrocellulosemembran und die Inkubation mit spezifischen Ras-Isoform-Antikörpern erfolgte wie in Kapitel 3.11 beschrieben.

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

3.18 Wounding Assay

Um den Einfluss der K-Ras-Aktivität auf die Zellmigration zu untersuchen, wurden *Wounding Assays* durchgeführt. Hierfür wurden die verwendeten Zelllinien in unten aufgeführter Zellzahl auf 6-Well Lochzellkulturplatten ausgesät. Die Zellzahlen wurden für das Erreichen einer konfluenten, einschichtigen Zellschicht nach 24 h im CO₂-Inkubator bei 37 °C für jede Zelllinie optimiert.

Zelllinie	Zellzahl	Zellkulturplatte
A549	5×10^5	6-Well
Colo699	1×10^6	6-Well
H358	1×10^6	6-Well
HCC44	4×10^5	10 cm-Schale
Panc1	1×10^6	6-Well

Tabelle 3.5: Benötigte Zellzahlen für das Erreichen einer einschichtig konfluenten Zellrasens nach 24 h. HCC44-Zellen wurden aufgrund der überdurchschnittlichen Zellgröße und des schnellen Wachstums auf 10 cm-Schalen ausgesät, A427-Zellen wurden bei nicht-konfluentem Zellwachstum von der Versuchreihe ausgeschlossen, da diese keinen gleichmäßigen Zellrasen bildeten und somit das Setzen einer gleichmäßigen Wunde unmöglich war.

In den konfluenten Zellrasen wurden mit einer sterilen 20 µl Pipettenspitze je drei vertikale, ca. 500 µm breite Striche gezogen (*wounding*). Auf die Rückseite der Platte wurden mit einem Filzstift drei horizontale Striche als spätere Orientierungshilfe unter dem Mikroskop gezeichnet.

Anschließend wurden die Zellen mit 37 °C warmem CMF-PBS gewaschen, um die durch das *Wounding* gelösten Zellen abzuwaschen. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen dann mit 3ml DMEM + 10 % FCS oder 3 ml DMEM ohne Zusätze überschichtet. Zu jedem Ansatz wurden ferner 5 µl/ml Medium Mitomycin C (Stammlösung: 2 mg/ml) zugegeben, welches die DNA-Synthese durch Interkalierung zwischen zwei DNA-Strängen inhibiert und somit die Zellteilung verhindert. Hierdurch sollte einer Verfälschung des migrationsbedingten Wundverschlusses durch Zellteilung ausgeschlossen werden.

Für die Charakterisierung des Einflusses der K-Ras-Aktivität auf die Migration wurden Versuchsansätze mit Zugabe von je einem Wachstumsfaktor oder K-Ras-Inhibitor zu den Zellen durchgeführt. Hierfür wurden direkt nach dem *Wounding* entweder aktivierend wirkendes EGF (AppliChem) oder LPA (Sigma Aldrich, Taufkirchen) oder inhibierend wirkendes FTS (Cayman Chemical, Hamburg), *Fendiline Hydrochloride* (Sigma Aldrich, Taufkirchen) oder FTI-227 (Sigma Aldrich, Taufkirchen) hinzugegeben. Die Stammlösungen sind den Kapiteln 2.3 und 2.4 zu entnehmen.

Nach zweistündiger Inkubation im CO₂-Inkubator wurden bei 10 x-Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 25, Zeiss) drei willkürliche, benachbart zum Filzstiftstrich gewählte Punkte pro Spalt fotografiert (t_0), sodass insgesamt 9 Bilder pro Zeitpunkt entstanden. Nach 8 h (t_8), 24 h (t_{24}) und 48 h (t_{48}) wurden mithilfe der Filzstiftstriche am Plattenboden dieselben neun Punkte aufgesucht und bei 10x-Vergrößerung erneut fotografiert. Nach 24 h erfolgte zudem ein Medienwechsel mit erneuter Zugabe von zuvor im Versuchsansatz enthaltenen Wachstumsfaktoren oder Inhibitoren, um ein Absterben durch Nährstoffmangel (und hierdurch eine Vergrößerung des Spalts) oder Nachlassen der Wirkung der Zusätze zu vermeiden. Mit Hilfe des AnalySIS Programms wurden am PC die Spaltbreiten gemessen und aus der Verkleinerung des Spalts die Zellwanderung berechnet. Um die im Programm gemessene Verkleinerung des Spalts in Pixel in µm umzurechnen, wurde eine Neubauer-Zählkammer bekannter Größe unter dem Mikroskop vermessen. Hieraus ergab sich für einen Pixel am Monitor eine Strecke von 4,2 µm. Die Berechnung der Migrationsstrecke und der Standardabweichung erfolgten mittels Microsoft Excel 2010.

3.19 Statistik

Standardabweichung (SD; *standard deviation*):

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (Y_i - Y_{\text{mean}})^2} \quad (3.1)$$

n = Anzahl der Versuche, Y_i = Einzelwert, Y_{mean} = Mittelwert d. Einzelwerte.

Standardfehler (SEM; *standard error mean*):

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3.2)$$

4. Ergebnisse

Aktivierende K-Ras-Mutationen lassen sich in 30 % der Lungenadenokarzinome nachweisen und sind mit früher Metastasierung oder Mutationen und schweren Verläufen vergesellschaftet. Durch eine onkogene Mutation im K-Ras Gen entsteht konstitutiv aktives K-Ras, wodurch Veränderungen der Zellmorphologie, der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen entstehen und die Entwicklung eines mesenchymalen Phänotyps mit gesteigerter Zellmigration, -proliferation und -motilität begünstigt werden kann.

Anhand der vier humanen Zelllinien des NSCLC-Typs mit aktivierender K-Ras-Mutation A427 (G12D), A549 (G12S), HCC44 (G12C) und H358 (G12C) sowie einer K-Ras-Wildtyp exprimierenden Zelllinie (Colo699), wurden mögliche durch K-Ras-Mutation bedingte Veränderungen der Zellmigration anhand von Stimulations- und Migrationsexperimenten untersucht. Als Referenz-Zelllinie wurde die in der Dissertation *Charakterisierung der Regulation der Migration humaner Panc1-Pankreaskarzinomzellen durch konstitutiv aktives EGFP-K-Ras (G12V)* (Universität Ulm, 2005) von Dr. Ute Dreissigacker charakterisierte Zelllinie Panc1 verwendet.

4.1 Nachweis von Ras-Isoformen mit isoformspezifischen Antikörpern

4.1.1 Charakterisierung von Ras-isoformspezifischen Antikörpern

In einer Zelle werden die Ras-Isoformen H-Ras, K-Ras 4A/4B und N-Ras exprimiert, wobei die Differenzierung zwischen K-Ras 4A und 4B durch isoformspezifische Antikörper nicht gegeben ist und im Folgenden, wenn K-Ras beschrieben wird, stets beide Isoformen einbezogen werden. Um die Expression dieser Isoformen in den Zelllinien A427, A549, Colo699, HCC44 und H358 zu analysieren, wurden Immunoblots mit kommerziell erhältlichen Ras-isoformspezifischen Antikörpern durchgeführt. Bei diesen Analysen wurden mehrere primäre isoformspezifische Antikörper hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht und für den weiteren Gebrauch unter den eingesetzten Bedingungen optimiert.

Die Bindung der isoformspezifischen Antikörper an ausschließlich die gewünschte Ras-Isoform wurde mit Hilfe von gereinigten, rekombinanten H-, K- und N-Ras-Proteinen analysiert, die in der Gruppe von Prof. Dr. Klaudia Giehl hergestellt worden waren. Hierfür wurden auf

4.1. Nachweis von Ras-Isoformen mit isoformspezifischen Antikörpern

ein 12,5% SDS-Polyacrylamid-Gel 2 μ l, 5 μ l und 10 μ l jeder Ras-Proteinlösung aufgetragen und mittels Western Blot auf Nitrocellulosemembran übertragen. Durch das Auftragen unterschiedlicher Mengen wurde für alle Ras-Proteinlösungen die notwendige Probenmenge zum Erhalt einer für alle Isoformen gleich starken, gut detektierbaren Bande ermittelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem bereits in der Arbeitsgruppe etablierten primären Antikörper anti-pan-Ras OP40 (Merck Millipore), der alle Ras-Isoformen erkennt, und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Die Blots wurden im ECL-Fusion-System entwickelt. Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch den Nachweis von rekombinanten H-, K- und N-Ras im Immunoblot durch anti-pan-Ras OP40.

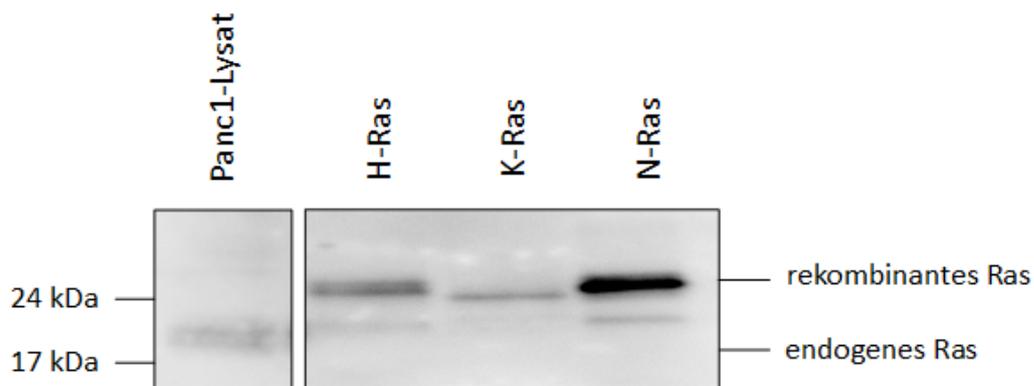


Abbildung 4.1: **Unterschiedliche Laufeigenschaften von endogenem und rekombinanten Ras-Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel.** In einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel wurde 50 μ g Protein RIPA-Lysat aus Panc1-Zellen (links) und etwa 0,5 μ g rekombinantes H-, K- und N-Ras (rechts) aufgetragen und aufgetrennt. Die Ras-Proteine wurden im Immunoblot mit anti-Pan-Ras OP40 im Fusion-System detektiert.

Der Versuch zeigte gute Bindung des anti-pan-Ras-Antikörpers OP40 an die rekombinanten Ras-Proteine. Auch in Lysat von Panc1-Zellen wurde Ras durch OP40 gut detektiert. Aufgrund der im Bakterium nicht stattfindenden posttranslationalen Modifikation der Ras-Proteine befindet sich das rekombinant gewonnene Protein im Vergleich zu in eukaryonten Zellen prozessiertem Ras bei ca. 24 kDa.

In den Immunoblots zur Untersuchung der Isoformspezifität der Antikörper wurden 10 μ l rekombinantes H-Ras und je 5 μ l rekombinantes K- und N-Ras verwendet. Die Detektion erfolgte im ECL-Fusion-System, anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Antikörper und eine zweite Entwicklung im ECL-Fusion mit OP40, welche als Beladungskontrolle des Gels diente. Insgesamt wurden drei H-Ras-spezifische, fünf K-Ras spezifische und ein N-Ras-spezifischer Antikörper auf Funktionalität getestet.

4.1. Nachweis von Ras-Isoformen mit isoformspezifischen Antikörpern

Nachweis von H-Ras

Für den spezifischen Nachweis von H-Ras wurden die Antikörper F235 (Santa Cruz Biotechnology), anti-c-H-Ras (Ab-1) (Merck Millipore) und MS X H-Ras (Millipore) verwendet. Abbildung 4.2 zeigt die Detektion von H-Ras mit dem Antikörper MS X H-Ras:

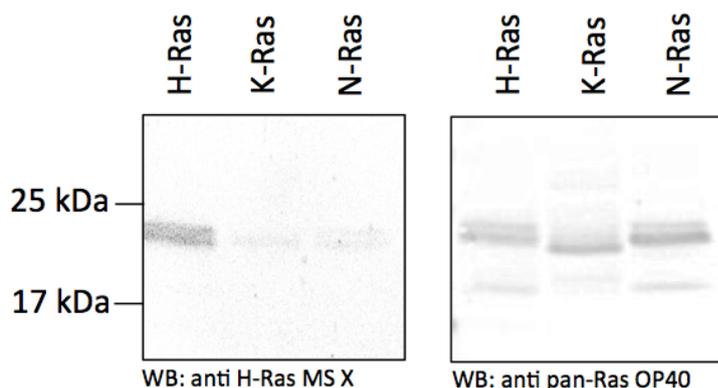


Abbildung 4.2: **spezifischer Nachweis von H-Ras durch MS X H-Ras (Millipore)**. 10 μ l rekombinantes H-Ras und je 5 μ l rekombinantes K- und N-Ras-Lysat wurden im Immunoblotverfahren auf Nitrocellulose übertragen, mit anti-H-Ras MS X (Millipore) in der Verdünnung 1:4000 inkubiert und nach Inkubation mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper im LI-COR-System entwickelt (Abb. links). Nach Elution des anti-H-Ras Antikörpers erfolgte die Inkubation mit anti-pan-Ras OP40 und Entwicklung im Fusion-System zur Beladungskontrolle (Abb. rechts).

Der Antikörper MS X H-Ras zeigte in hoher Konzentration eine geringe unspezifische Bindung an N-Ras (Daten nicht gezeigt), sodass für die Versuche eine hohe Verdünnung von 1:4000 in 1xTBS mit 0,5% Milchpulver gewählt wurde. Das Blockieren der Nitrocellulose-Membran erfolgte mit 5% Milchpulver in TBS. Für einen guten Nachweis erfolgte die Inkubation mit dem H-Ras-Antikörper für 12-36 Stunden bei 4°C. Die Entwicklung erfolgte nach Inkubation mit einem Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper im LI-COR-System.

Nachweis von K-Ras

Für den spezifischen Nachweis von K-Ras wurden die Antikörper K-Ras F234 (Santa Cruz Biotechnology), anti-c-K-Ras (Santa Cruz Biotechnology), anti-c-K-Ras (Ab-1) (Merck Millipore), anti-K-Ras (Biorbyt) und anti-K-Ras C19 (Santa Cruz Technology) untersucht. In Abbildung 4.3 ist exemplarisch die Detektion von K-Ras durch den Antikörper anti-K-Ras 2B (C19) gezeigt.

4.1. Nachweis von Ras-Isoformen mit isoformspezifischen Antikörpern

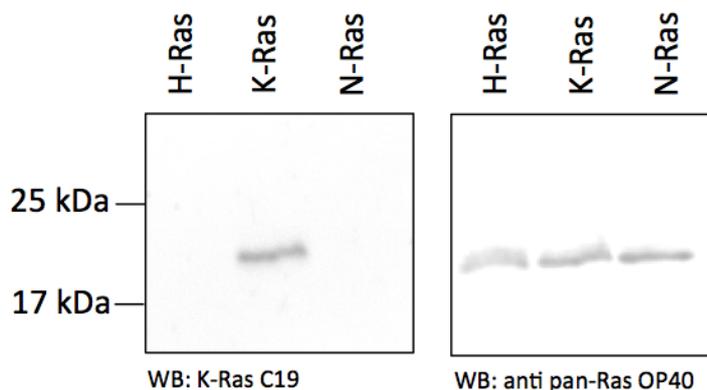


Abbildung 4.3: **Isoformspezifität von anti-K-Ras 2B (C19):** Es wurden 10 µl rekombinantes H-Ras und je 5 µl rekombinantes K- und N-Ras-Lysat im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen, mit anti-K-Ras 2B (C19) in der Verdünnung 1:1000 inkubiert und im Fusion-System entwickelt. Nach Elution des anti-K-Ras Antikörpers erfolgte die Inkubation mit pan-Ras-Antikörper OP40 und Entwicklung im Fusion-System zur Kontrolle der Beladung (Abb. rechts).

Der Antikörper anti-K-Ras 2B (C19) zeigte eine gute isoformspezifische Detektion von K-Ras bei Verwendung von rekombinantem K-Ras-*E.coli* Lysaten. Bei Verwendung von Zelllysaten im Immunoblot zeigte der Antikörper jedoch eine Vielzahl von unspezifischen Banden. Als Verdünnung wurde 1:1000 in PBS mit 0,3 % Milchpulver gewählt, um die unspezifischen Banden zu reduzieren und größtmögliche K-Ras-Bindung zu erhalten. Das Blockieren der Nitrocellulose-Membran erfolgte für 1 h mit 3 % Milchpulver in PBS-T und die Inkubation mit Anti-K-Ras 2B (C19) über Nacht bei 4 °C. Die Entwicklung erfolgte nach Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper im ECL-Fusion.

Nachweis von N-Ras

Für den spezifischen Nachweis von N-Ras wurde der Antikörper anti-N-Ras (Ab-1) (Calbiochem) untersucht. Abbildung 4.4 zeigt exemplarisch die Detektion von N-Ras durch diesen Antikörper.

4.1. Nachweis von Ras-Isoformen mit isoformspezifischen Antikörpern

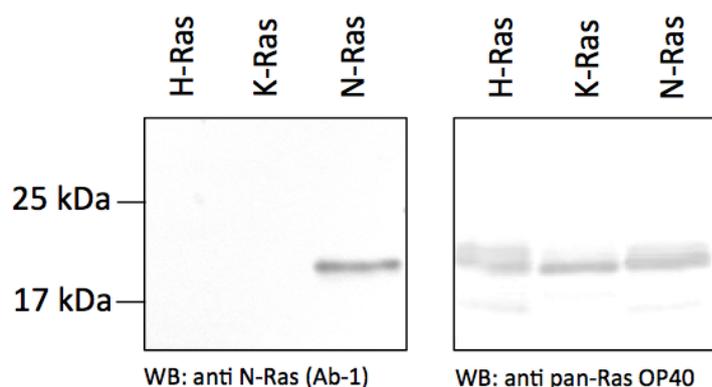


Abbildung 4.4: **Isoformspezifität von anti-N-Ras (Ab-1)**: 10 μ l rekombinantes H-Ras und je 5 μ l rekombinantes K- und N-Ras wurden nach SDS-PAGE auf Nitrocellulose übertragen und mit anti-N-Ras (Ab-1) in der Verdünnung 1:500 inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit dem HRP-System. Nach Elution des anti-N-Ras Antikörpers erfolgte die Inkubation mit pan-Ras-Antikörper OP40 und Entwicklung im Fusion-System zur Beladungskontrolle (Abb. rechts).

Anti-N-Ras (Ab-1) zeigte eine gute Isoformspezifität für N-Ras. Zum Erhalt einer starken N-Ras-Bande wurde eine niedrige Verdünnung mit 1:500 in PBS mit 0,5 % Milchpulver gewählt. Das Blockieren der Nitrocellulose-Membran erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver in PBS und die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C. Die Entwicklung erfolgte nach Inkubation mit einem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper im ECL-Fusion.

Zusammenfassend erwiesen sich folgende Antikörper als geeignet für einen Ras-Isoform-spezifischen Nachweis: **MS X H-Ras** (Millipore) für H-Ras, **anti-K-Ras 2B (19)** (Santa Cruz Technology) für K-Ras und **anti-N-Ras OP25** (Calbiochem) für N-Ras. Bei den übrigen getesteten Antikörpern konnte bei drei K-Ras-spezifischen Antikörper (K-Ras F234, Santa Cruz Biotechnology; anti-c-K-Ras, Santa Cruz Biotechnology; anti-c-K-Ras (Ab-1), Merck Millipore) und zwei der H-Ras-spezifischen Antikörper (H-Ras F235, Santa Cruz Biotechnology, anti-c-H-Ras (Ab-1), Merck Millipore) in mehreren Western Blot Analysen auch nach Variation von Verdünnung, Blockingzeit, Blockingsubstanz, Inkubationszeit und Entwicklungslösung kein Signal auf Höhe von Ras detektiert werden. Da verschiedene K-Ras Antikörper keine Bindung an die rekombinanten Proteine zeigten, wurden Western Blot Analysen zur Evaluierung einer Bindung an endogenes K-Ras-Protein durch diese Antikörper durchgeführt. Hierfür wurden von Prof. K. Giehl Panc1-Zellklone EGFP-H-Ras, EGFP-K-Ras und EGFP-N-Ras bereit gestellt, die die EGFP-Ras-Proteine stabil exprimierten. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert, die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot mit je einem der K-Ras-Primärantikörpern F234 oder K-Ras Biorbyt inkubiert. Der K-Ras-Antikörper F234 zeigte in den Versuchen keine Bindung an endo-

4.1. Nachweis von Ras-Isoformen mit isoformspezifischen Antikörpern

genes Ras oder EGFP-K-Ras. Der K-Ras Antikörper von Biorbyt zeigte weder für EGFP-getaggtetes K-Ras, rekombinantes K-Ras noch endogenes K-Ras eine spezifische Bindung. Es erfolgte lediglich die Erzeugung einer unspezifischen Bande auf Höhe von EGFP-Ras. Abbildung 4.5 zeigt exemplarisch die Anwendung dieses Antikörpers.

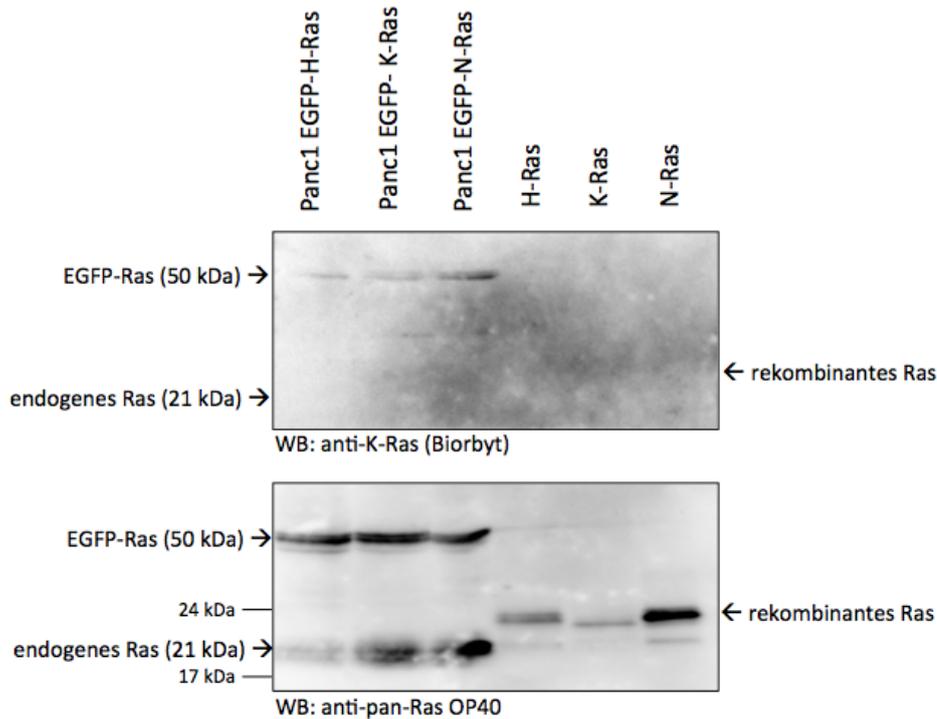


Abbildung 4.5: **Charakterisierung der Bindung von anti-K-Ras (Biorbyt) an EGFP-Ras, endogenes Ras und rekombinantes Ras.** Im SDS-Polyacrylamid-Gel wurden je 50 µg Zellysate von Panc1-Zellklonen EGFP-H-Ras, EGFP-K-Ras und EGFP N-Ras und 0,5 µg rekombinantes H-, K- und N-Ras aufgetragen und im Immunoblot mit anti-K-Ras (Biorbyt) im ECL-System nachgewiesen (Abb. oben). Zur Beladungskontrolle erfolgte die Elution des gebundenen anti-K-Ras Antikörpers und die Inkubation mit pan-Ras-Antikörper OP40 und Entwicklung im ECL-Fusion (Abb. unten). Es erfolgte keine Bindung an EGFP-getaggtetes, endogenes oder rekombinantes Ras durch den Antikörper. In Höhe des EGFP-getaggteten Ras wurde eine unspezifische Bande generiert.

Eine Übersicht aller verwendeten Antikörper und die erzielten Ergebnisse der Spezifitätsnachweise sind in Tabelle 4.1 gezeigt.

Antikörper / Hersteller	Signalqualität
anti-pan-Ras (Ab-3), Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)	gute Detektion von H-, K- und N-Ras

4.1. Nachweis von Ras-Isoformen mit isoformspezifischen Antikörpern

MS X H-Ras, Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)	gute Detektion von H-Ras, unspezifische Bindung an N-Ras bei Verwendung in geringer Verdünnung
anti-c-H-Ras (Ab-1), Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)	kein Nachweis von H-Ras
H-Ras (F235), Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	kein Nachweis von H-Ras
K-Ras 2B (C-19), Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	gute Detektion von K-Ras, keine Bindung an andere Ras-Isoformen. Unspezifische Bindung an weitere Proteine im Zellysat.
K-Ras (F234), Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	kein Nachweis von K-Ras
anti-c-K-Ras, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	kein Nachweis von K-Ras
K-Ras, Biorbyt Limited (Cambridge, United Kingdom)	kein spezifischer Nachweis von K-Ras
anti-c-K-Ras (Ab-1), Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)	kein Nachweis von K-Ras
anti-c-N-Ras (Ab-1), Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)	gute Detektion von N-Ras, keine Bindung an K- und N-Ras.

Tabelle 4.1: Übersicht der Ergebnisse der Spezifitätsnachweise aller verwendeten isoformspezifischen Primärantikörper.

4.1.2 Nachweis von Ras-Isoformen in humanen NSCLC-Zelllinien im Immunblot-Verfahren mit isoformspezifischen Antikörpern

Im nächsten Schritt erfolgte der Nachweis der Ras-Isoformen in Lysaten ausgewählter NSCLC-Zelllinien und der Pankreaskarzinomzelllinie Panc1. Im Gegensatz zu den rekombinant gewonnenen Ras-Isoformen stellt sich zellulär prozessiertes Ras in einer charakteristischen Doppelbande mit einem Molekulargewicht von 21 kDa dar. Diese Doppelbande ist bedingt durch die unterschiedliche posttranslationale Modifizierung der Isoformen, wodurch minimal differente Laufeigenschaften im SDS-Polyacrylamid-Gel entstehen. Zur deutlicheren Auftrennung der Ras-Doppelbande wurden für die folgenden Versuche 13,5 % SDS-Gele verwendet.

4.1. Nachweis von Ras-Isoformen mit isoformspezifischen Antikörpern

Die Lungenkarzinomzellen wurden bis zu 80 %-iger Konfluenz wie in Kapitel 3.1 dargestellt kultiviert, um mögliche Einflüsse konfluenten Wachstums auf die Proteinexpression zu verringern, und in RIPA-Puffer lysiert. Je 50 µg RIPA-Zellysate wurden mittels SDS-PAGE auf Nitrocellulose transferiert, mit pan-Ras-Antikörper OP40 inkubiert und die Blots im Fusion-System mit HRP-Antikörper entwickelt. Abbildung 4.6 zeigt exemplarisch den Nachweis von Ras in den verwendeten Lungenkarzinomzelllinien und Panc1-Zellen. Als Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels wurde eine zweite Färbung mit einem β -Aktin Antikörper durchgeführt und ebenfalls im Fusion-System entwickelt.

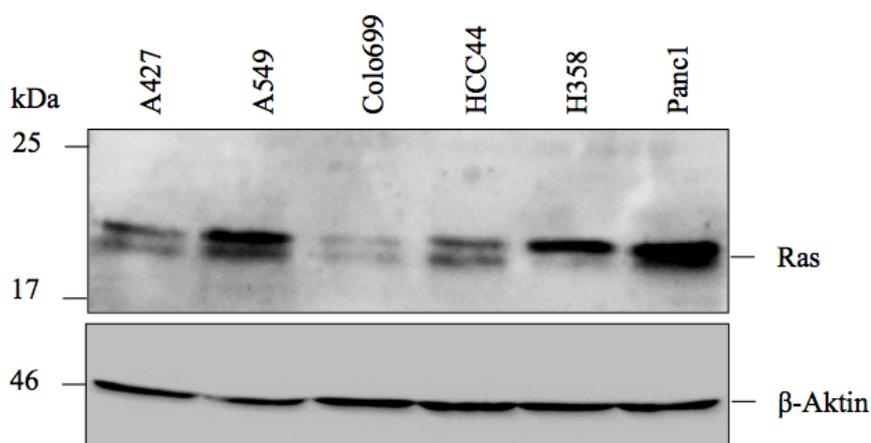


Abbildung 4.6: Exemplarischer Blot zum Nachweis von Ras in den NSCLC-Zelllinien A427, A549, Colo699, HCC44, H358 und Panc1. Die Zellen wurden bis zu 80% Konfluenz kultiviert und in RIPA-Puffer lysiert. Je 50 µg Zellysate wurden im SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und Ras mittels pan-Ras-Antikörper OP40 im Fusion-System nachgewiesen. Als Beladungskontrolle diente β -Aktin. (Abb. unten)(n=3)

Die Zelllinien zeigten untereinander verglichen unterschiedlich starke Ras-Banden, was Unterschiede in der quantitativen Expression der Ras-Isoformen zeigt. Weiterhin zeigte sich für jede Zelllinie ein typisches Verhältnis von oberer zu unterer Bandenstärke.

4.1.3 Nachweis und Quantifizierung der Expression von H-, K- und N-Ras in humanen Lungenkarzinomzelllinien und Panc1-Zellen im Immunblotverfahren

In den folgenden Versuchen wurde die Expression der Ras-Isoformen in den verwendeten Karzinomzelllinien genauer charakterisiert. Hierfür wurden wieder 50 µg Zellysate im 13,5 % SDS-Gel aufgetrennt und die Isoformen mit den Antikörpern MS X H-Ras, anti-K-Ras 2B (C19) und anti-N-Ras (Ab-1) detektiert. Zur Kontrolle der Beladung wurde eine zweite Färbung mit anti-

4.1. Nachweis von Ras-Isoformen mit isoformspezifischen Antikörpern

pan-Ras OP40 und β -Aktin durchgeführt und im Fusion-System entwickelt. In den Abbildungen 4.7, 4.8 und 4.9 sind exemplarische Blots gezeigt.

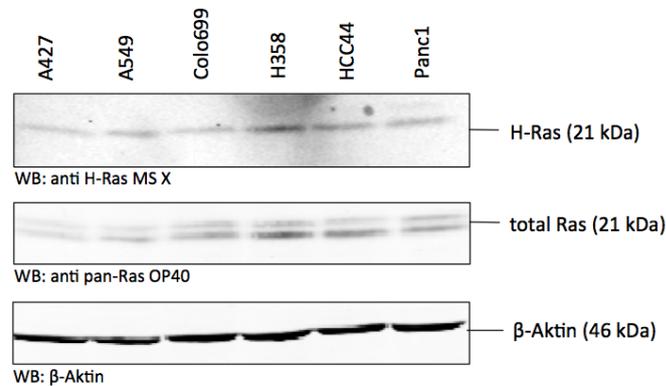


Abbildung 4.7: **Exemplarischer Immunblot zum Nachweis der Expression von H-Ras in den Lungenkarzinomzelllinien A427, A549, Colo 699, H358, HCC44 und der Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 (n=3).** Die Zellen wurden bis zu 80 % Konfluenz in Wachstumsmedium kultiviert und in RIPA-Puffer lysiert. Je 50 μ g RIPA-Zelllysate wurden im 13,5%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und H-Ras mit anti-H-Ras MS X im LICOR-System detektiert. Zur Kontrolle der Beladung erfolgte eine zweite Färbung mit anti-pan-Ras OP40 sowie β -Aktin Antikörper und Entwicklung im Fusion-System.

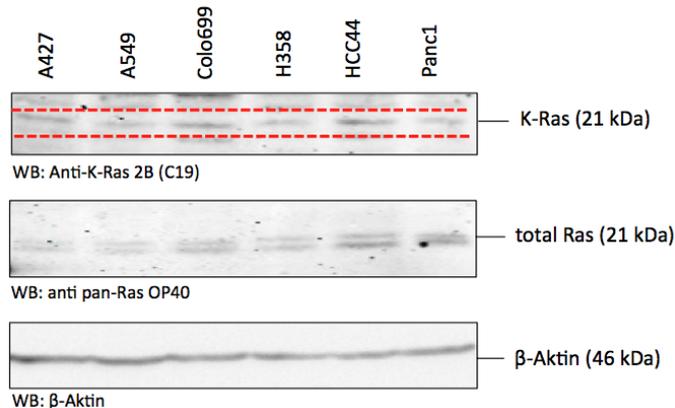


Abbildung 4.8: **Exemplarischer Immunblot zum Nachweis der Expression von K-Ras A427, A549, Colo 699, H358, HCC44 und Panc1.** Die Zellen wurden bis zu 80 % Konfluenz kultiviert und in RIPA-Puffer lysiert. Je 50 μ g Zelllysate wurden im 13,5 %-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit anti-K-Ras 2B (C19) im Fusion-System detektiert. Zur Kontrolle der Beladung und Lokalisierung der K-Ras-Bande erfolgte eine zweite Färbung mit anti-pan-Ras OP40 sowie β -Aktin Antikörper und Detektion im Fusion-System. Die Bilddateien der Western Blots wurden mit MS Powerpoint am PC überlagert und die K-Ras-Bande optisch ermittelt (rote gestrichelte Linie). (n=2)

4.1. Nachweis von Ras-Isoformen mit isoformspezifischen Antikörpern

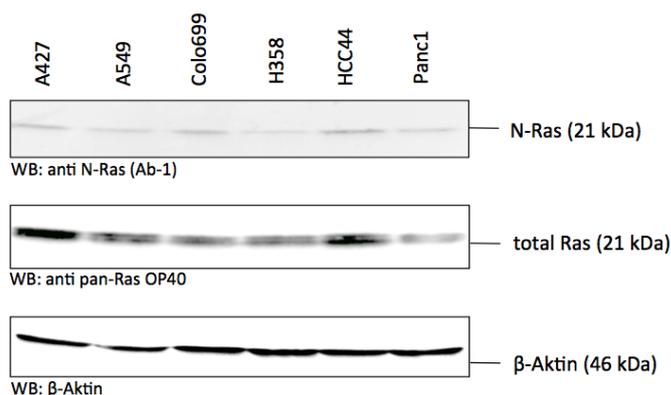


Abbildung 4.9: Exemplarischer Immunblot zum Nachweis der Expression N-Ras in den Lungenkarzinomzelllinien A427, A549, Colo 699, H358, HCC44 und der Pankreaskarzinomzelllinie Panc1. Die Zellen wurden bis zu 80 % Konfluenz in Wachstumsmedium kultiviert und in RIPA-Puffer lysiert. Je 50 µg Zelllysate jeder Zelllinie wurden im 13,5 %-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und N-Ras mit anti N-Ras (Ab-1) im Fusion-System detektiert. Zur Kontrolle der Beladung erfolgte eine zweite Färbung mit anti-pan-Ras OP40 sowie β -Aktin Antikörper und Entwicklung im Fusion-System. (n=3)

In allen Lysaten konnten die Isoformen H-, K- und N-Ras nachgewiesen werden. Die Menge an exprimiertem H-Ras war in allen untersuchten Zelllinien sehr ähnlich und H-Ras ist somit die am gleichmäßigsten exprimierte Ras-Isoform. Auch N-Ras wurde von allen Zelllinien außer HCC44 in vergleichbaren Mengen exprimiert. HCC44 zeigten eine geringfügig stärkere N-Ras-Expression.

Der Nachweis der Expression von K-Ras in den Proteinlysaten wurde durch die Generierung zahlreicher unspezifischer Banden durch anti-K-Ras 2B (C19) erschwert. In den mit rekombinanten Ras-Proteinen durchgeführten Immunblots zur Optimierung der isoformspezifischen Antikörper für den experimentellen Gebrauch (Kap.: 4.1) zeigte anti-K-Ras 2B (C19) eine gute isospezifische Bindung an K-Ras. Unter Voraussetzung der guten Isoformspezifität wurde die K-Ras-Bande mit Hilfe der zur Beladungskontrolle durchgeführten anti-pan-Ras OP40-Färbung optisch ermittelt. Hierfür wurden die Bilddateien der K-Ras und pan-Ras-Färbung am PC mit Hilfe von MS Powerpoint überlagert und so die K-Ras-Bande bestimmt. Mit dieser Methode konnte für die Zelllinien A427 und Colo699 eine stärkere K-Ras-Expression als in den Zelllinien H358 und Panc1 gezeigt werden. In HCC44 und A549 zeigte sich die Expression in unterschiedlichen Blots verschieden stark.

Generell zeigte sich, dass die Ras-typische Doppelbande in den mit isoformspezifischen Antikörpern durchgeführten Immunblots nicht darstellbar war. Für alle drei Isoformen kam nur eine Bande zur Darstellung, erst in den zur Beladungskontrolle durchgeführten Färbungen mit pan-Ras OP40 erschien wieder die Ras-Doppelbande. Somit kann vermutet werden, dass sich

4.2. Aufreinigung von GST-RBD und Nachweis von aktivem Ras-GTP

jede Ras-Isoform jeweils nur in einer der zwei Banden befindet. Zur Lokalisierung von H-Ras und N-Ras in der Doppelbande wurden die Immunblots am PC mit den durchgeführten Färbungen mit anti-pan-Ras OP40 überlagert. So konnte gezeigt werden, dass sich diese Isoformen in der unteren Bande der Doppelbande befinden. Die Überlagerung der Dateien zeigte ferner, dass sich K-Ras in der oberen Bande der durch Ras erzeugten Doppelbande befindet. Die Versuche, denselben Blot in mehreren Schritten nacheinander mit allen isoformspezifischen Antikörpern zu entwickeln und so die Verteilung innerhalb ein und des selben Lysats zu erhalten, gelangen aufgrund von Schädigung der Nitrozellulosemembran durch Antikörper-Stripping und deutliche Verluste der Signalqualität bei den Nachfärbungen nicht.

Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Daten, dass alle drei Isoformen in allen Zelllinien exprimiert werden. Die Isoformen H- und N-Ras werden sehr gleichmäßig exprimiert und sind im Immunblot in der unteren Ras-Bande lokalisiert. Der Nachweis von K-Ras war durch unspezifische Banden erschwert und die nachgewiesene exprimierte Menge von K-Ras in einigen Zelllinien je nach Blot unterschiedlich groß. Generell zeigte sich für K-Ras eine weniger gleichmäßige Expression. Die Isoform ist in der oberen Ras-Bande lokalisiert.

4.2 Aufreinigung von GST-RBD und Nachweis von aktivem Ras-GTP

Um in den Zellen den Anteil des aktiven, GTP-gebundenen Ras im Vergleich zum Ras Gesamtgehalt zu bestimmen, wurden Ras-GTP-Bindungsassays (siehe Kap.: 3.17) durchgeführt. Mit Hilfe der Ras-Bindungsdomäne (RBD) von c-Raf wurde GTP-gebundenes Ras aus Zelllysaten präzipitiert. Hierzu wurde das Fusionsprotein GST-RBD in *E.coli* exprimiert und die im Bakterien-Lysat enthaltene Menge semiquantitativ bestimmt. GST-RBD wurde durch Kopplung von 50, 100 und 200 µl Bakterienlysate an Gluthation-Sepharose 4B präzipitiert, im 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und Coomassie-Blau gefärbt. Als Vergleichsstandard wurde im Gel 1, 2.5 und 5 µg BSA aufgetragen (siehe Abb. 4.10). Die Quantifizierung erfolgte optisch im Vergleich zur Dicke der BSA-Banden. Für den Nachweis der spezifischen Bindung von aktivem Ras an GST-RBD wurde zusätzlich Bakterienlysate mit GST ohne die RBD hergestellt. Dieses wurde nach derselben Methode quantifiziert (nicht abgebildet).

Zur Charakterisierung der spezifischen Bindung von Ras-GTP an GST-RBD wurden Colo699, H358 und HCC44-Zellen zu RIPA-Lysat verarbeitet und je 1 mg Protein der Lysate mit 500 µl GST-

4.2. Aufreinigung von GST-RBD und Nachweis von aktivem Ras-GTP

RBD oder 500 μ l GST inkubiert. Anschließend wurde Ras-GTP im Ras-Bindungsassay präzipitiert, im 13,5 % SDS-Gel aufgetrennt und im Immunblot mit anti-pan-Ras OP40 im Fusion-System detektiert. Zum Nachweis von Ras in den verwendeten RIPA-Lysaten wurden je 25 μ g Lysat in einem separaten 13,5 % SDS-Gel aufgetrennt und Ras im Immunblot mit anti-pan-Ras OP40 nachgewiesen. In Abbildungen 4.10 ist gezeigt, dass Ras-GTP nur aus den Zelllysaten präzipitiert wurde, die mit GST-RBD inkubiert wurden. Bei den GST-gekoppelten Zelllysaten konnte im Immunblot kein Ras-GTP detektiert werden. Abbildung 4.11 zeigt, dass Ras in allen verwendeten RIPA-Lysaten enthalten gewesen ist.

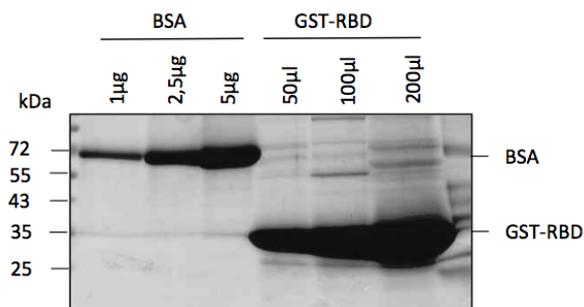


Abbildung 4.10: **Darstellung der GST-RBD-Expression in *E. coli*.** GST-RBD wurde durch Kopplung von 50, 100 und 200 μ l Bakterienlysate an je 20 μ l Glutathion-Sepharose 4B präzipitiert, im 10 % SDS-Gel aufgetrennt und Coomassie-Blau gefärbt. Zur Quantifizierung der präzipitierten GST-RBD-Menge wurden 1, 2.5 und 5 μ g BSA mit aufgetrennt.

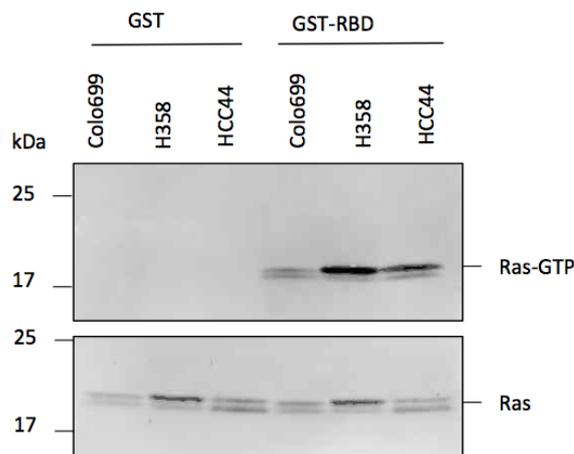


Abbildung 4.11: **Analyse der spezifischen Bindung von Ras-GTP an GST-RBD.** Colo699, H358 und HCC44-Zellen wurden in DMEM kultiviert, zu RIPA-Lysat verarbeitet und je 1 mg Protein der Lysate mit 500 μ l GST-RBD (Spur 4-6) oder 500 μ l GST ohne RBD (Spur 1-3) inkubiert. Es erfolgte die Auftrennung der präzipitierten Proteine im 13.5 % SDS-Gel, Übertragung auf Nitrozellulosemembran und Detektion von Ras mit anti-pan-Ras OP40 im Fusion-System (oben). Zum Nachweis der im Lysat enthaltenen Ras-Menge wurden je 25 μ g der RIPA-Lysate in einem weiteren 12,5 % SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und Ras mit anti-pan-Ras OP40 im Fusion-System detektiert (unten).

4.3 Bestimmung der Aktivität von Ras

4.3.1 Nachweis von aktivem Ras in humanen Lungenkarzinomzelllinien und Panc1

Punktmutationen in den Genen von H-, K- und N-Ras führen häufig zu deren dauerhaftem Verbleib im GTP-gebundenen Zustand und verstärkter Aktivierung Ras-abhängiger Signalwege. Typisch sind aktivierende Mutationen in Codon 12, 13 oder 61, die durch die entstehende erhöhte Ras-Aktivität unter Anderem zu Veränderungen von Zellmorphologie, Zellmotilität, Zellwachstum und Zelldifferenzierung führen. [8] Die Charakterisierung des Anteils von aktiviertem Ras an der Gesamtfraktion des zellulären Ras in den verwendeten Karzinomzelllinien ist deshalb von großer Relevanz.

Die Bestimmung des aktiven Ras-Gehaltes erfolgte mittels des in Kapitel 3.17 beschriebenen Ras-GTP-Bindungsassays. Hierfür wurden die Zellen bis zu 60-80 % Konfluenz in Wachstumsmedium kultiviert und anschließend für weitere 24 h in serumfreiem Medium inkubiert. So wurde der Einfluss von zu hoher Zellkonfluenz und den im Wachstumsmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren auf die Aktivität des zellulären Ras möglichst gering gehalten. Für den Ras-GTP-Bindungsassay wurde je 1 mg Gesamtprotein eingesetzt und das aktive Ras aus dem Zellysat präzipitiert. Der Gehalt an präzipitiertem Ras wurde anschließend im Immunblot bestimmt. Zusätzlich wurden 50 µg des im Versuch eingesetzten Zellysats als Kontrolle der Ras-Expression aufgetragen. Um den gleichmäßigen Einsatz des GST-RBD in allen Proben zu kontrollieren, wurden die Blots nach dem Transfer mit Ponceau S gefärbt.

Abbildung 4.12 zeigt repräsentativ die typische Verteilung von Ras-GTP in den Zelllinien sowie die Ras-Gesamtfraktion (total Ras) in der Kontrolle im Zellysat.

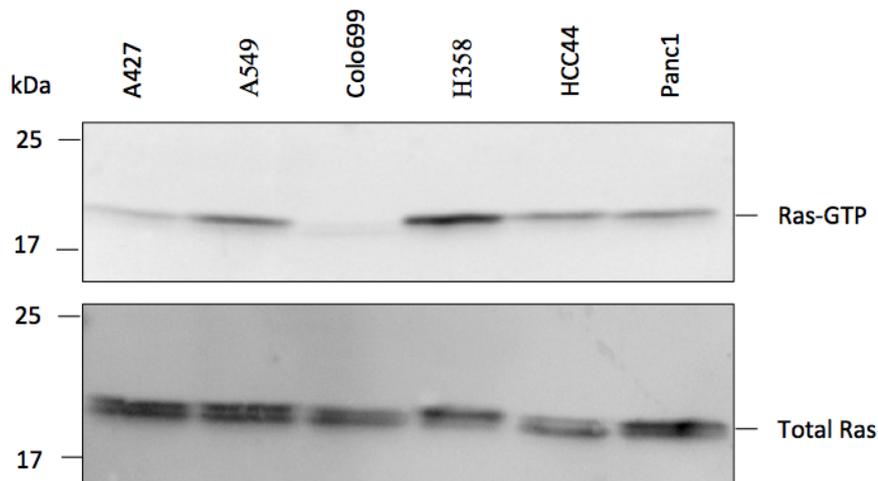


Abbildung 4.12: **Exemplarischer Blot zum Nachweis von Ras-GTP und der Ras-Expression in den Karzinomzelllinien.** Die Zellen wurden bis zu 80 % Konfluenz in Wachstumsmedium kultiviert, für weitere 24 h in serumfreien Medium inkubiert und RIPA-Lysate hergestellt. Aus je 1 mg Gesamtprotein aus Lysat wurde mittels Ras-GTP-Bindungsassay Ras-GTP präzipitiert, auf Nitrozellulose übertragen und im Immunblot mit anti-pan-Ras OP40 im Fusion-System detektiert (oben). Zum Nachweis der Ras-Expression im Lysat wurden 50 µg des im Ras-GTP-Bindungsassay verwendeten Lysats aufgetragen und ebenfalls mit pan-Ras-Antikörper OP40 inkubiert (unten). (n=3)

Die Ergebnisse zeigen zwischen den Karzinomzelllinien deutliche Unterschiede in der Menge an präzipitiertem Ras-GTP. In Zelllinien mit aktivierender K-Ras-Mutation konnte deutlich mehr Ras-GTP nachgewiesen werden als in der K-Ras-Wildtyp exprimierenden Zelllinie Colo699. Der Großteil des präzipitierten Ras-GTP zeigt sich in der oberen Ras-Bande, in welcher K-Ras läuft. Den überwiegenden Anteil des Ras-GTP in den Zellen mit aktivierender K-Ras-Mutation bildet somit sehr wahrscheinlich K-Ras-GTP.

Der Vergleich von total Ras und Ras-GTP zeigt eine deutliche Zunahme zugunsten der oberen, K-Ras-GTP führenden Bande in allen Zelllinien mit K-Ras-aktivierender Mutation. Auch dies spiegelt den deutlich höheren Anteil von K-Ras-GTP an total K-Ras im Vergleich zu N-Ras-GTP und H-Ras-GTP an total H- und N-Ras in diesen Zelllinien wider. Einzige Ausnahme bildet wieder Colo699, in welcher sowohl für total Ras als auch für Ras-GTP das Verhältnis von oberer und unterer Ras-Bande stabil bleibt. Generell unterscheidet sich die Menge des total Ras in den Zelllinien weniger als die Menge des Ras-GTP.

4.3.2 Bestimmung der Aktivität von H-, K- und N-Ras in den Zelllinien

Im vorhergehenden Kapitel zeigte der überwiegende Nachweis von Ras-GTP in der oberen Ras-Bande bereits die Mengenunterschiede zwischen den Ras-Isoformen bezüglich des Vorliegens

4.3. Bestimmung der Aktivität von Ras

im GTP-gebundenen Zustand. Im nächsten Schritt wurde daher die Aktivität der Ras-Isoformen H-, K- und N-Ras in den Karzinomzelllinien weiter charakterisiert. Mit Ausnahme von Colo699 tragen alle verwendeten Karzinomzelllinien eine mono- oder biallelische aktivierende Mutation im K-Ras Gen, sodass die K-Ras-Aktivität von besonderem Interesse war.

Die Ras-GTP-Bindungsassays wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt und H-, K- und N-Ras im Immunblot mit den isoformspezifischen Antikörpern detektiert. Nach Inkubation und Entwicklung erfolgte die Elution des isoformspezifischen Antikörpers und die Nachfärbung mit anti-pan-Ras Antikörper OP40. Wie bereits in Kapitel 4.1.3 dargestellt, zeigte sich für die Ras-Isoformen im Western Blot nur eine einzelne Bande, erst in der Nachfärbung mit anti-pan-Ras OP40 kam die typische Ras-Doppelbande zur Erscheinung. Mittels Überlagerung der Blots am PC ebenfalls analog zu Kapitel 4.1.3 konnte die Verteilung der Isoformen in obere (K-Ras) und untere (H- und N-Ras) Bande bestätigt werden.

Abbildung 4.13 zeigt exemplarisch den Nachweis von K-Ras-GTP sowie die K-Ras im Lysat und die Nachfärbungen mit pan-Ras OP40.

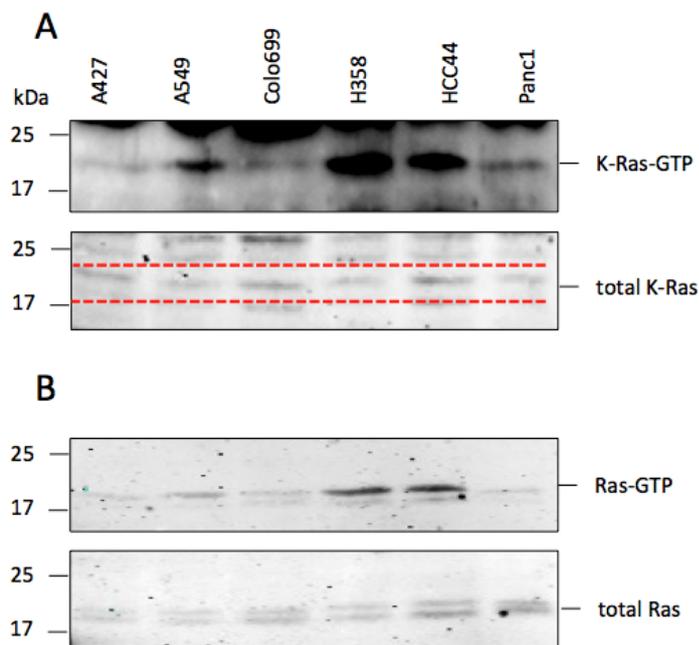


Abbildung 4.13: **Exemplarischer Immunblot zum Nachweis von K-Ras GTP in den Lungenkarzinomzelllinien und Panc1.** Die zu 80 % Konfluenz gewachsenen Zellen wurden für 24 h in DMEM ohne Zusätze kultiviert und zu RIPA-Lysat verarbeitet. Aus je 1 mg Gesamtprotein des Lysats wurde K-Ras-GTP präzipitiert, im SDS-Gel aufgetragen, auf Nitrocellulose transferiert und K-Ras mit anti-K-Ras 2B (C19) im Fusion-System nachgewiesen (A (oben)). Zum Nachweis von total K-Ras in den Zelllinien wurden 50 µg des im Bindungsassay verwendeten RIPA-Lysats im SDS-Gel aufgetrennt und K-Ras im Immunblot mit anti-K-Ras 2B (C19) detektiert (A (unten)). Zur Kontrolle der Beladung erfolgte eine zweite Färbung mit anti-pan-Ras OP40 und Entwicklung im Fusion-System. (B) (n=2)

4.3. Bestimmung der Aktivität von Ras

Zwischen den Karzinomzelllinien zeigten sich deutliche Unterschiede in der präzipitierten Menge an K-Ras-GTP. Insbesondere in H358, aber auch in A549 und HCC44 konnte mehr K-Ras-GTP nachgewiesen werden als in A427, Colo699 und Panc1. In den Beladungskontrollen lag K-Ras in allen Karzinomzelllinien in vergleichbarer Menge vor. Daraus ergibt sich, dass in A549, HCC44 und H358 ein größerer Anteil des endogenen K-Ras als K-Ras-GTP vorliegt als in den Zelllinien A427, Colo699 und Panc1.

In den Abbildungen 4.14 und 4.15 sind exemplarisch der Nachweis von H-Ras-GTP und N-Ras-GTP, die Beladungskontrollen im Lysat sowie der Nachweis von total Ras mit pan-Ras OP40 aus zwei Versuchen dargestellt. In später folgenden Versuchen wurden weitere Ras-Assays zum Nachweis von H-Ras-GTP und N-Ras-GTP durchgeführt, welche die nachfolgend dargestellten Ergebnisse bestätigten.

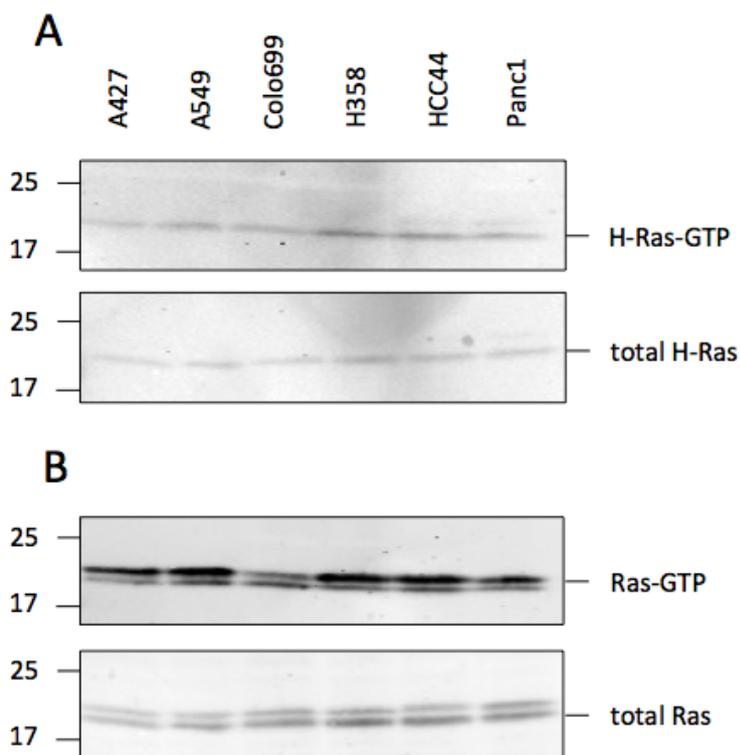


Abbildung 4.14: **Exemplarischer Immunblot zum Nachweis von H-Ras GTP in den Lungenkarzinomzelllinien und Panc1.** Die zu 80 % Konfluenz gewachsenen Zellen wurden für 24 h in DMEM ohne Zusätze kultiviert und zu RIPA-Lysat verarbeitet. Für den Ras-GTP-Bindungsassay wurde aus je 1 mg Gesamtprotein H-Ras-GTP präzipitiert, im 13,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit MS X H-Ras im LiCor-System detektiert (A (oben)). Zum Nachweis von total H-Ras wurden 50 µg des im Bindungsassay verwendeten Lysats aufgetragen und H-Ras mit MS X H-Ras nachgewiesen (A (unten)). Nach Elution des ersten Antikörpers erfolgte zur Kontrolle der Beladung eine Färbung mit anti-pan-Ras OP40 und Entwicklung im Fusion-System. (B)(n=2)

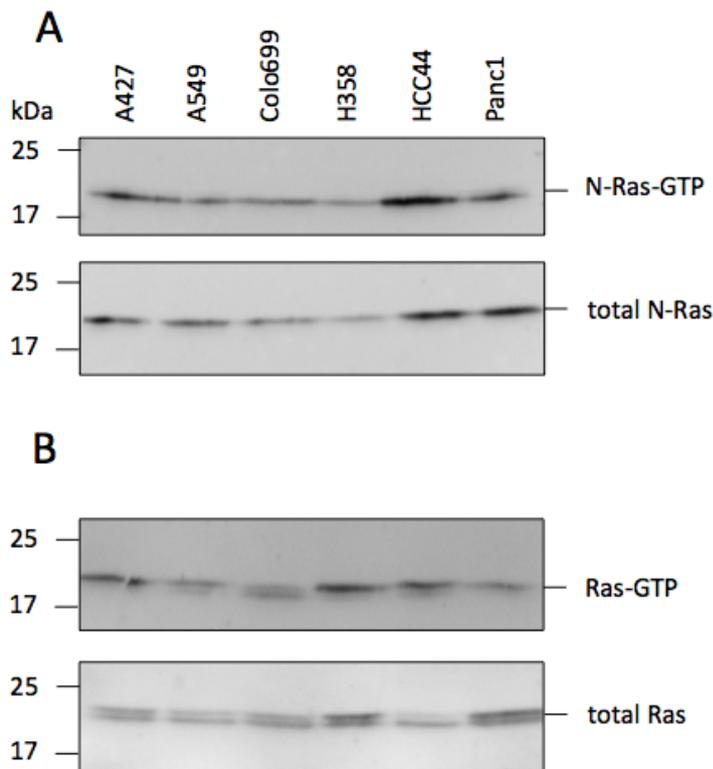


Abbildung 4.15: **Exemplarischer Immunblot zum Nachweis von N-Ras GTP in den Lungenkarzinomzelllinien und Panc1.** Die zu 80 % Konfluenz gewachsenen Zellen wurden für 24 h in DMEM ohne Zusätze kultiviert und zu RIPA-Lysat verarbeitet. Aktives N-Ras wurde mittels Ras-GTP-Bindungsassay aus je 1mg Gesamtprotein präzipitiert, im 13,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit anti-N-Ras (Ab-1) nachgewiesen (A (oben)). Als Nachweis der N-Ras-Expression im Lysat wurden 50 µg des im Bindungsassay verwendeten Lysats aufgetragen und mit anti-N-Ras (Ab-1) inkubiert (A (unten)). Zur Kontrolle der Beladung wurde nach Elution des anti-N-Ras Antikörpers mit anti-pan-Ras Antikörper OP40 total Ras detektiert (B). (n=2)

Für H-Ras-GTP wurden im GTP-Bindungsassay in allen Karzinomzelllinien vergleichbare Mengen nachgewiesen. In der Beladungskontrolle war die Verteilung der H-Ras-Gesamtfraktion zwischen den Zelllinien ebenfalls sehr gleichmäßig, was zeigt, dass der Anteil von H-Ras-GTP an der H-Ras-Gesamtfraktion in allen Karzinomzelllinien ähnlich ist. Auch N-Ras-GTP lag in den durchgeführten N-Ras-GTP-Bindungsassays in den Karzinomzelllinien im Vergleich zu K-Ras-GTP in relativ gleichmäßiger Menge vor. In HCC44-Zellen konnte eine überdurchschnittliche Menge von N-Ras-GTP detektiert werden, H358-Zellen enthielten eine unterdurchschnittliche Menge N-Ras-GTP. Die zweite Färbung der GTP-Bindungsassays mit pan-Ras OP40 zeigte in allen Zellen außer Colo699 den Großteil des Ras-GTP in der oberen Ras-Bande.

Zusammenfassend zeigten sich die Unterschiede zwischen den Zelllinien in der vorliegenden Menge für K-Ras-GTP am deutlichsten, während im Vergleich dazu H-Ras-GTP und N-Ras-GTP sehr gleichmäßig nachweisbar waren. Die Färbung mit anti-pan-Ras OP40 zeigt zudem, dass

4.4. Analyse der Aktivierung von Ras in den Karzinomzelllinien durch Stimulation mit EGF

K-Ras-GTP den größten Teil der Ras-GTP-Fraktion in allen Zellen bildet, die eine aktivierende K-Ras-Mutation tragen. In der K-Ras-Wildtyp exprimierenden Zelllinie Colo699 bildet K-Ras-GTP den gleichen Anteil an der Ras-GTP-Fraktion wie H-Ras-GTP und N-Ras-GTP zusammen.

4.4 Analyse der Aktivierung von Ras in den Karzinomzelllinien durch Stimulation mit EGF

Epidermal Growth Faktor (EGF) ist ein bekannter Aktivator des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs. Wie sich die Stimulation mit EGF auf die Ras-Aktivität in den Lungenkarzinomzelllinien und Panc1 auswirkt, wurde in den folgenden Versuchen mittels Ras-GTP-Bindungsassays analysiert. Zudem wurde die Auswirkung von EGF auf das Migrationsverhalten der Karzinomzelllinien untersucht.

4.4.1 Analyse der Aktivierung von Ras durch Stimulation mit EGF in den Lungenkarzinomzelllinien und Panc1 im Ras-GTP-Bindungsassay

Für die EGF-Stimulationsversuche wurden die Karzinomzelllinien bis zu 80 % Konfluenz in Wachstumsmedium kultiviert. Zur Reduktion des Ras-aktivierenden Einflusses von FCS wurde das Wachstumsmedium beim Erreichen der gewünschten Konfluenz gegen DMEM ohne Zusätze gewechselt. Die Zellen wurden für weitere 24 h kultiviert, bevor EGF in einer Konzentration von 20 ng/ml DMEM zu den Zellen gegeben wurde. Da die EGF-induzierte Ras-Aktivität schnell ihr Maximum erreicht und rasch abklingt, erfolgten zunächst Versuche zur Bestimmung des optimalen EGF-Expositionszeitraums für die Erfassung des Aktivitätsmaximums von Ras im Ras-GTP-Bindungsassay. Hierfür wurde zu den Zelllinien A427 und HCC44 für je 1, 2 und 5 min EGF in der oben genannten Konzentration gegeben. Weiterhin wurde zur Analyse des Einflusses des im Wachstumsmedium enthaltenen 10 % FCS auf die Ras-Aktivität FCS für je 3 oder 5 min hinzugegeben. Nach Ablauf der gewünschten Expositionszeit wurden Ras-GTP-Bindungsassays wie in Kapitel 3.17 beschrieben durchgeführt. Abbildung 4.16 zeigt die Aktivierung von Ras durch EGF und FCS im zeitlichen Verlauf.

4.4. Analyse der Aktivierung von Ras in den Karzinomzelllinien durch Stimulation mit EGF

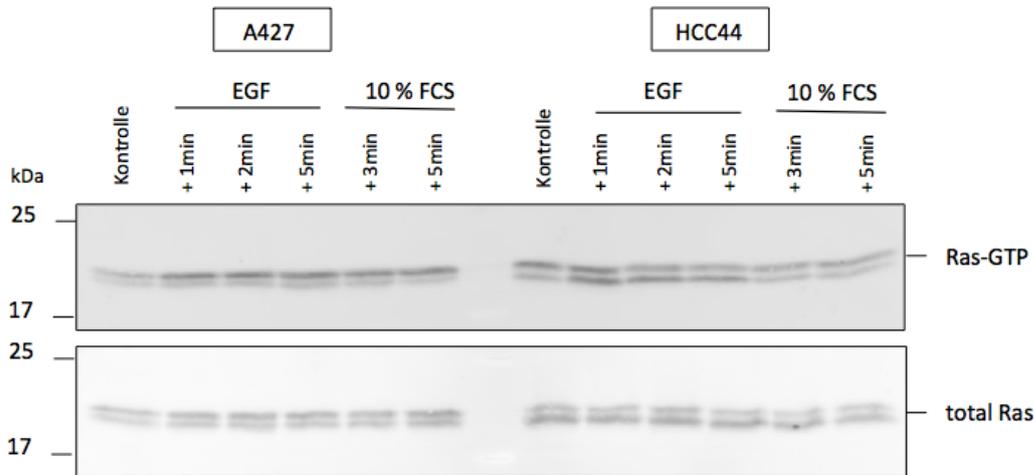


Abbildung 4.16: **Darstellung der EGF- und FCS-induzierten Ras-Aktivität in A427 und HCC44 in Abhängigkeit von der Expositionsdauer.** 20 ng/ml EGF wurde für 1, 2 oder 5 min zu den in DMEM ohne Zusätze für 24 h kultivierten Zellen gegeben, 10 % FCS für 3 oder 5 min. Anschließend wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert nach SDS-PAGE und Immunblot-Verfahren Ras-GTP-Bindungsassays durchgeführt. Der Nachweis von Ras-GTP wurde mit anti-pan-Ras OP40 im ECL-Fusion-System durchgeführt (oben). Als Beladungskontrolle wurden 50 µg des verwendeten Zelllysats nach Auftrennung im 13,5 % SDS-Gel mittels Immunblot auf Nitrocellulose übertragen und total Ras mittels anti-pan-Ras OP40 im ECL-Fusion-System detektiert (unten).

In den Versuchen zeigte sich nach EGF-Stimulation für beide Zelllinien eine deutliche erkennbare Zunahme von Ras-GTP. Unterschiede zwischen den Zelllinien bei der Stimulation der Ras-Isoformen durch EGF wurden bereits in diesem Versuch deutlich. So kam es bei A427 nach EGF-Stimulation überwiegend zur Zunahme von K-Ras-GTP in der oberen Ras-Bande, welche nach ca. 2 min ihr Maximum erreichte. In HCC44 wurden durch EGF innerhalb der ersten Minute nach Exposition alle Ras-Isoformen aktiviert. K-Ras-GTP zeigte sich nach zwei Minuten bereits wieder deutlich rückläufig, während H- und N-Ras-GTP in der unteren Ras-Bande auch 5 Minuten nach Exposition vermehrt vorlagen. Eine Zunahme von Ras-GTP durch die Stimulation mit 10 % FCS konnte nur in A427 beobachtet werden.

Der optimale Zeitraum für eine EGF-Exposition zur Erfassung der Aktivierung aller Ras-Isoformen wurde nach Auswertung dieser Versuche mit 1-2 min gewählt, da nach Ablauf dieser Zeit bereits ein Rückgang der Ras-Aktivierung gezeigt werden konnte und auch in weiteren Zelllinien, die nicht Teil des abgebildeten Versuchs waren, möglich ist.

Zur Analyse der Stimulation von Ras-GTP durch EGF in den verschiedenen Karzinomzelllinien wurden pro Zelllinie je zwei Zellkulturschalen für 24 h in DMEM ohne Zusätze kultiviert. Zu den Zellen eines Ansatzes wurde für 2 Minuten 20 ng/ml EGF hinzugefügt, der andere

4.4. Analyse der Aktivierung von Ras in den Karzinomzelllinien durch Stimulation mit EGF

Ansatz blieb unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert und Ras-GTP-Bindungsassays durchgeführt. Je 50 µg Zelllysat aus jedem Ansatz wurden vor Durchführung des Ras-GTP-Bindungsassays als Beladungskontrolle asserviert und die Menge an Ras (total Ras) im Immunblot nachgewiesen. In den Western-Blot Analysen konnte für alle Zelllinien eine Zunahme der Menge an Ras-GTP durch die Behandlung mit EGF nachgewiesen werden. In jeder Zelllinie zeigte sich durch die Behandlung mit EGF eine unterschiedlich starke Aktivierung der einzelnen Isoformen in der oberen oder unteren Ras-Bande. Abbildung 4.17 zeigt exemplarisch die Veränderungen der Ras-Aktivität durch Stimulation mit EGF in den Karzinomzelllinien.

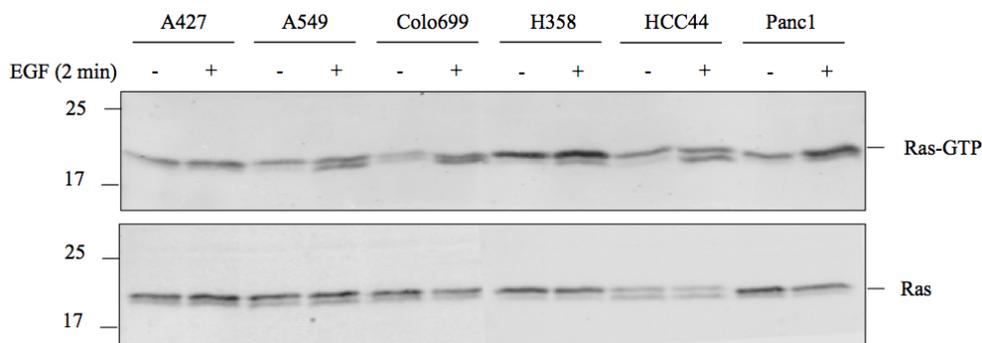


Abbildung 4.17: **Beeinflussung der Ras-Aktivität in den Karzinomzelllinien durch zweiminütige Stimulation mit 20 ng EGF/ml Kulturmedium.** Zwei Ansätze jeder Zelllinie wurden für 24 h in DMEM ohne Zusätze kultiviert. Zu einem Ansatz wurde für 2 min EGF zugegeben (+), die Zellen des anderen Ansatzes blieben unbehandelt (-). Anschließend wurden alle Zellen zu RIPA-Lysat verarbeitet, Ras-GTP im Ras-GTP-Bindungsassay präzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot auf Nitrozellulose übertragen und Ras mit anti-pan-Ras OP40 im ECL-Fusion-System detektiert (oben). Zum Nachweis von total Ras wurden je 50 µg RIPA-Lysat der EGF-stimulierten und unbehandelten Zellen in einem getrennten Gel aufgetragen, auf Nitrocellulose übertragen und Ras mit anti-pan-Ras OP40 im ECL-Fusion System nachgewiesen (unten).

Die Stimulation mit EGF führte in allen Zelllinien außer A427 zu einer Zunahme der Aktivität einzelner oder aller Ras-Isoformen. Für A549 zeigte sich eine deutliche Zunahme der Ras-Isoformen in der unteren Ras-Bande, was einer Aktivitätszunahme von H-Ras und/oder N-Ras entspricht. K-Ras in der oberen Ras-Bande blieb in A549 unverändert. In Colo699 fand eine gleichmäßige Aktivierung von K-Ras in der oberen und H-Ras/N-Ras in der unteren Ras-Bande statt. Bei H358 kam es durch die Stimulation zum klaren Anstieg von H-Ras-GTP/N-Ras-GTP, während K-Ras-GTP nur minimal zunahm. HCC44-Zellen zeigten eine deutliche Zunahme von H-Ras-GTP/N-Ras-GTP, während K-Ras-GTP unverändert blieb. In Panc1 wurde durch EGF vor allem K-Ras aktiviert, während H-Ras und N-Ras-GTP nur minimal anstiegen. Der Nachweis von total Ras zeigte erwartbar keinen Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen.

4.4. Analyse der Aktivierung von Ras in den Karzinomzelllinien durch Stimulation mit EGF

4.4.2 Analyse der Aktivitätsveränderungen von H-Ras, K-Ras und N-Ras in den Karzinomzelllinien nach Stimulation mit EGF

Bereits in den Stimulationsversuchen mit Nachweis von allen Ras-Isoformen konnten vermutet werden, dass die Ras-Isoformen in Abhängigkeit von der untersuchten Karzinomzelllinie unterschiedlich stark auf die Aktivierung durch EGF ansprechen. Die Aktivitätszunahme der Ras-Isoformen H-Ras, K-Ras und N-Ras durch Stimulation mit EGF, Unterschiede zwischen den Isoformen und Unterschiede zwischen den Zelllinien wurden in der folgenden Versuchsreihe mittels Ras-GTP-Bindungsassays genauer charakterisiert. Der Versuchsaufbau erfolgte analog zu Kapitel 4.4.1. Nach Präzipitation des Ras-GTP aus den EGF-stimulierten Zellen und der nicht-stimulierten Kontrolle wurden die Ras-Isoformen mit den isoformspezifischen Antikörpern (siehe Kap.:2.8.1) im Western-Blot Verfahren nachgewiesen. Die erhaltenen Ras-Banden wurden in einem zweiten Schritt densitometrisch ausgewertet. Eine exemplarische Darstellung der Western-Blot-Analysen zeigt Abbildung 4.18.

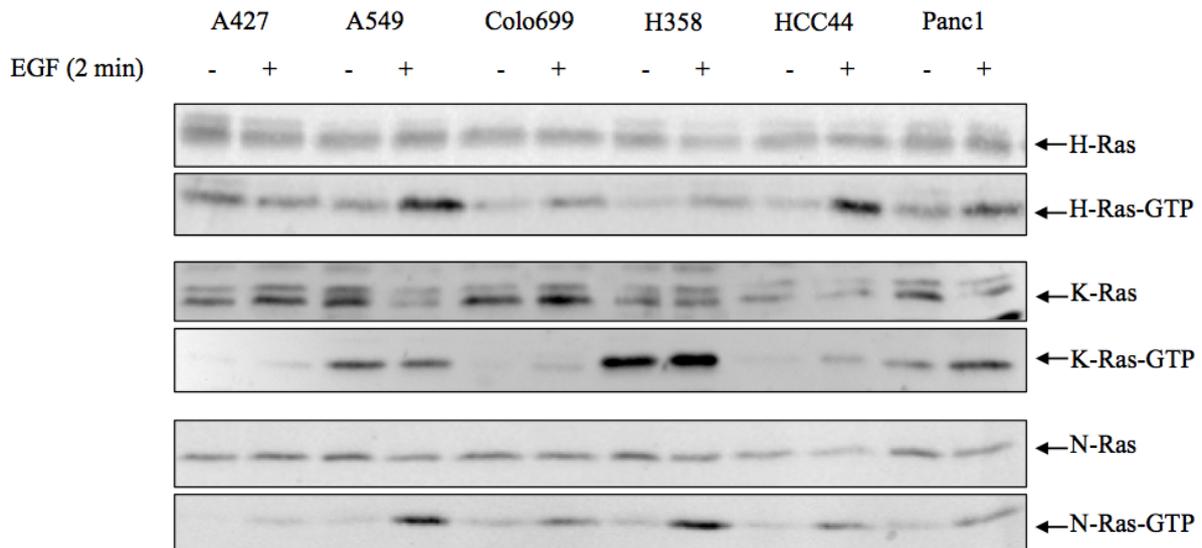


Abbildung 4.18: **Charakterisierung der EGF-induzierten Zunahme von H-Ras-GTP, K-Ras-GTP und N-Ras-GTP in den Lungenkarzinomzelllinien und Panc1.** Zwei Ansätze pro Zelllinie wurden 24 h in DMEM ohne Zusätze kultiviert. Zu einem Ansatz wurde für 2 min mit 20 ng/ml EGF gegeben (+), der andere blieb unbehandelt (-), anschließend wurden die Zellen aus beiden Ansätzen zu RIPA-Lysat verarbeitet. Ras-GTP wurde im Ras-GTP-Bindungsassay präzipitiert, auf Nitrozellulose übertragen und mit den Ras-isoformspezifischen Antikörpern inkubiert. Die Entwicklung erfolgte im ECL-Fusion- (N-Ras, K-Ras) oder LiCor-System (H-Ras). Der Nachweis von total H-, K- und N-Ras aus 50 µg Lysat erfolgte mittels Immunoblot aus den im Ras-GTP-Bindungsassay verwendeten Zelllysaten.

4.4. Analyse der Aktivierung von Ras in den Karzinomzelllinien durch Stimulation mit EGF

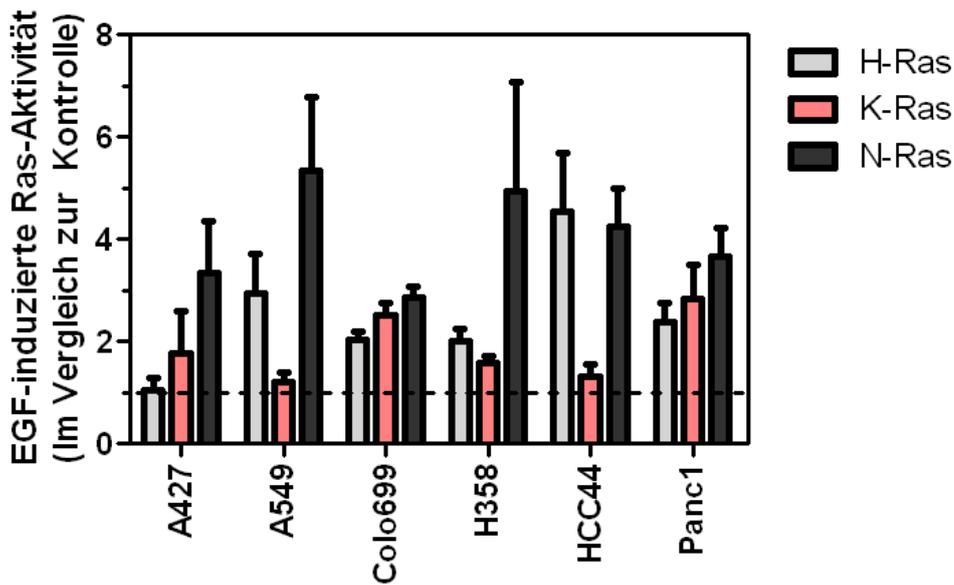


Abbildung 4.19: Darstellung der Zunahme von H-Ras-GTP, K-Ras-GTP und N-Ras-GTP in den Karzinomzelllinien durch zweiminütige Stimulation mit 20 ng EGF/ml Medium. Die Aktivitätszunahme der Ras-Isoformen wurde durch densitometrische Vermessung der spezifischen Banden mit Hilfe des Programms ImageQuant 5.0 ermittelt. Als Referenzwert für die Aktivitätszunahme wurde der densitometrisch gemessene Wert der unstimulierten Kontrolle verwendet und als 1 definiert. Angabe der Abweichung als SEM; n=2 für H-Ras und N-Ras, n=4 für K-Ras.

In den Immunblots konnte eine unterschiedliche Aktivierung der Ras-Isoformen durch EGF in den Zelllinien gezeigt werden. Die Menge an N-Ras-GTP konnte in allen Zelllinien durch die Zugabe von EGF erhöht werden. Zudem konnte für N-Ras im Vergleich zu K-Ras und H-Ras in allen Zelllinien die stärkste Aktivitätszunahme durch eine Stimulation mit EGF nachgewiesen werden. Die densitometrische Auswertung zeigte im Vergleich zur N-Ras-Aktivität in der unstimulierten Kontrolle eine Zunahme von N-Ras-GTP um das 5,3-fache (+/- 1,4) in A549, gefolgt von H358 (4,9 +/- 2,1), HCC44 (4,2 +/- 0,7), Panc1 (3,6 +/- 0,5), A427 (3,3 +/- 1,0) und Colo699 (2,8 +/- 0,2).

Für K-Ras-GTP zeigte sich ebenfalls eine Zunahme durch die Stimulation mit EGF, die jedoch deutlich geringer als für N-Ras-GTP ausfiel. Am größten war die K-Ras-GTP-Zunahme mit einer Steigerung um das 2,8-fache (+/- 0,6) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle in Panc1, gefolgt von Colo699 (2,5 +/- 0,2), A427 (1,7 +/- 0,8) und H358 (1,5 +/- 0,1). In HCC44 (1,3 +/- 0,2) und A549 (1,2 +/- 0,1) war der Zuwachs von K-Ras-GTP nur äußerst gering.

H-Ras-GTP nahm durch EGF-Stimulation in allen untersuchten Karzinomzelllinien mit Ausnahme von A427 zu. In HCC44 nahm H-Ras-GTP mit einer Steigerung um das 4,5-fache

4.5. Analyse der Ras-Aktivierung via G-Protein-gekoppelter Rezeptoren am Beispiel des LPA-Rezeptors

(+/- 1,1) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am deutlichsten zu. In den übrigen Zelllinien war die Zunahme von H-Ras-GTP durch EGF-Stimulation sehr gleichmäßig. In A549 betrug die H-Ras-GTP Menge nach Stimulation im Vergleich zur Kontrolle das 2,9-fache (+/- 0,7), in Panc1 das 2,3-fache (+/- 0,3), in Colo699 das Doppelte (2,0 +/- 0,1), genauso wie in H358 (2,0 +/- 0,2).

4.5 Analyse der Ras-Aktivierung via G-Protein-gekoppelter Rezeptoren am Beispiel des LPA-Rezeptors

Die EGF-Rezeptor-vermittelte Ras-Aktivierung wurde in vorhergehenden Versuchen aufgezeigt. Da der EGF-Rezeptor zur Familie der Tyrosinkinase gehört, wurde im nächsten Versuch untersucht, ob eine Ras-Aktivierung über andere Rezeptorfamilien ebenso möglich ist und ob eine Stimulation über verschiedene Rezeptorfamilien Unterschiede in der Stimulation der Ras-Isoformen bewirkt. Hierfür wurde die Stimulation mittels Lysophosphatidylsäure (LPA) und den zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehörigen LPA-Rezeptor gewählt [48].

Die Versuche wurden analog zu den EGF-Stimulationsversuchen durchgeführt. Die Karzinomzellen wurden nach 2-minütiger Exposition mit 10 µM LPA lysiert, anschließend Ras-GTP-Bindungsassays durchgeführt und Ras-GTP im Western Blot mittels pan-Ras-Antikörper und Ras-isoformspezifischen Antikörpern detektiert. Hier konnte in einem Versuch eine gute Aktivierung von N-Ras durch LPA in allen Karzinomzelllinien außer HCC44 gezeigt werden, wie Abb. 4.20 zeigt.

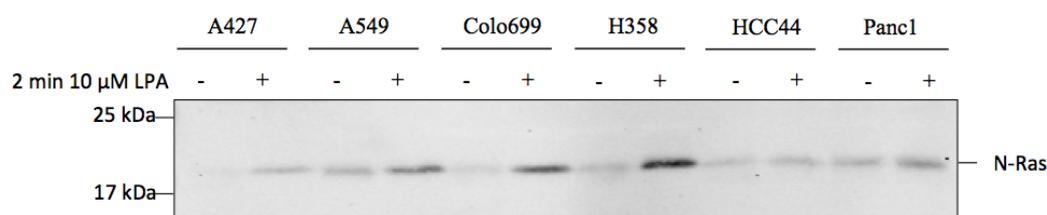


Abbildung 4.20: **Aktivierung von N-Ras in den Lungenkarzinomzelllinien und Panc1 durch zweiminütige Stimulation mit Lysophosphatidylsäure (LPA).** Die Karzinomzellen wurden für eine Minute mit 10 µM LPA stimuliert, zu RIPA-Lysat verarbeitet und Ras-GTP-Bindungsassays durchgeführt. Anschließend erfolgte der Transfer auf Nitrozellulose, die Inkubation mit dem N-Ras-spezifischen Primärantikörper und die Entwicklung im ECL-Fusion. (n=1)

Eine Zunahme von N-Ras-GTP durch die Stimulation mit LPA konnte in allen Zelllinien mit Ausnahme von HCC44 verzeichnet werden. Die deutlichste Zunahme von N-Ras-GTP im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigten die Zelllinien A549, Colo699 und H358.

In weiteren Versuchen mit analogem Versuchsaufbau konnte im Ras-GTP-Bindungsassay

4.6. Charakterisierung der Zellmigration in Wachstumsmedium und DMEM ohne Zusätze

keine Ras-Aktivierung mehr gezeigt werden. Zur Klärung dieses Sachverhalts erfolgten weitere Versuche. Hierfür wurden A549-Zellen für je 5 min, 3 min, 2 min oder 1 min mit LPA stimuliert, ein Ansatz mit A549-Zellen blieb unbehandelt. Anschließend wurden die Ansätze zu RIPA-Lysat verarbeitet. Aus einem Teil des Lysats wurden erneut Ras-GTP-Bindungsassays durchgeführt und mit pan-Ras-Antikörper inkubiert. Der andere Teil des Lysats wurde im SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit phospho-ERK-Antikörper inkubiert. Abbildung 4.21 zeigt einen exemplarischen Immunblot des Versuchs:

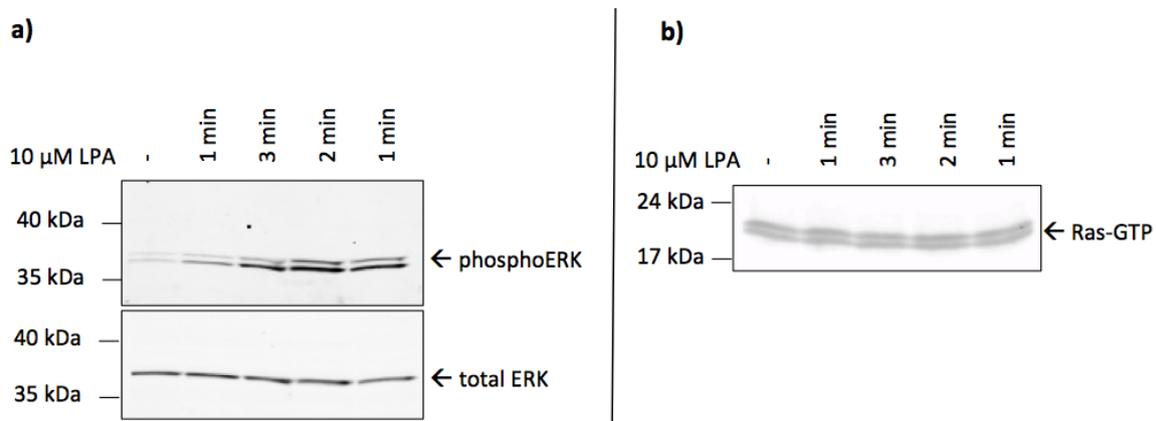


Abbildung 4.21: **Aktivierung von ERK 1/2 in A549-Zellen durch LPA-Stimulation.** A549-Zellen wurden in DMEM ohne Zusätze kultiviert, für 1-5 min mit 10 µM LPA stimuliert und zu RIPA-Lysat verarbeitet. Ein Teil des Lysats wurde auf Nitrocellulose übertragen, mit Phospho-p42/44 MAPK XP (Cell Signaling) inkubiert und phosphoryliertes, aktives ERK 1/2 (phosphoERK) im LiCor-System detektiert. Als Beladungskontrolle wurde der Blot mit panERK-Antikörper inkubiert und total ERK 2 ebenfalls im LiCor-System detektiert (a). Der andere Teil des Zelllysats und aus einer nicht stimulierten Kontrolle wurde Ras-GTP im Ras-GTP-Bindungsassay präzipitiert und Ras-GTP im Immunblot mit pan-Ras-Antikörper nachgewiesen (b).

Im Immunblot konnte eine klare Zunahme von phosphoryliertem ERK 1/2 in A549-Zellen durch die Stimulation mit LPA gezeigt werden. Da ERK ein Ras-Effektorprotein ist, ist eine vorhergehende Aktivierung von Ras wahrscheinlich, welche eventuell im verwendeten Assay-System nicht detektierbar war oder zum Zeitpunkt der Verarbeitung der Zellen zu Lysat bereits abgeklungen war. Die Ras-Aktivierung durch LPA konnte in weiteren Versuchen nicht im GTP-Bindungsassay nachgewiesen werden, sodass die Versuchsreihe unvollendet blieb.

4.6 Charakterisierung der Zellmigration in Wachstumsmedium und DMEM ohne Zusätze

Adenokarzinome der Lunge vom Typ NSCLC sowie das Pankreaskarzinom zeigen eine frühe und ausgeprägte Metastasierung. Deswegen wurde im nächsten Schritt das Migrationsverhalten

4.6. Charakterisierung der Zellmigration in Wachstumsmedium und DMEM ohne Zusätze

der Zellen der verwendeten Lungenkarzinomzelllinien und der Pankreaskarzinomzelllinie mittels Wounding Assays untersucht. Die Zelllinie A427 wurde aufgrund ihres nichtkonfluenten Wachstums von dieser Versuchsreihe ausgeschlossen.

Für die Wounding Assays wurden die Karzinomzellen ausgesät und entweder mit Wachstumsmedium oder mit DMEM ohne Zusätze überschichtet. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurde zur Inhibition der Zellteilung Mitomycin C zugegeben, anschließend wurde eine strichförmige Wunde in den Zellrasen gesetzt. Diese wurde an drei Stellen markiert, an welchen der Wunddurchmesser nach definierten Zeitabständen (0 h, 8 h, 24 h und 48 h) vermessen wurde. Anhand der Verkleinerung des Wundendurchmessers im Zeitverlauf konnte die Migrationsstrecke der Zellen durch Subtraktion des Wundendurchmessers zum Messungszeitpunktes $t(x)$ vom Wundendurchmesser zu Versuchsbeginn (t_0) berechnet werden. Für jede Zelllinie wurden insgesamt drei Wounding Assays mit Wachstumsmedium und drei Wounding Assays mit DMEM ohne Zusätze durchgeführt. Abbildung 4.22 zeigt exemplarisch lichtmikroskopische Bilder des Wundverschluss zu Versuchsbeginn (t_0), nach 24 h (t_{24}) und 48 h (t_{48}) durch die verwendeten Karzinomzelllinien.

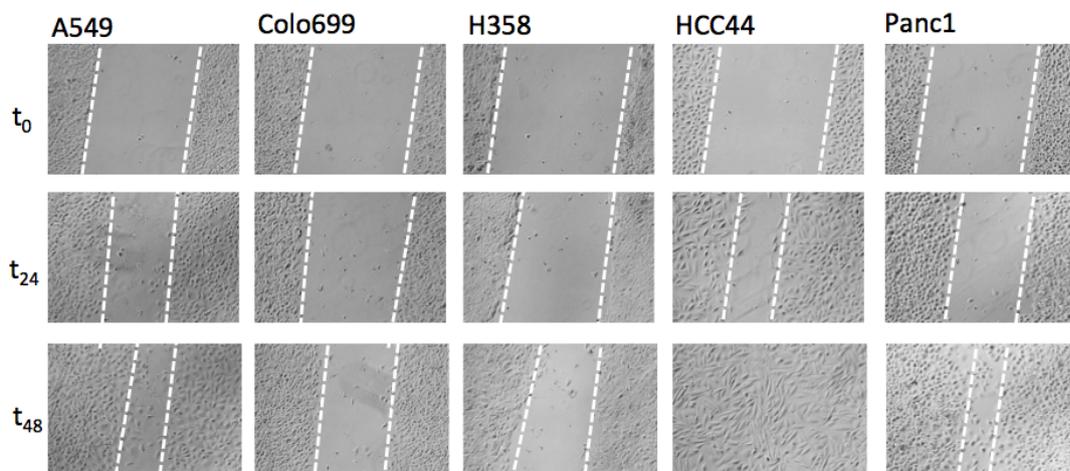


Abbildung 4.22: Wundverschluss im Wounding Assay der Lungenkarzinomzelllinien A549, Colo699, H358, HCC44 und Pankreaskarzinomzelllinie Panc1. Zu Versuchsbeginn (t_0) erfolgte das Setzen einer strichförmigen Wunde in den konfluenten Zellrasen, welche nach 24 h (t_{24}) und 48 h (t_{48}) lichtmikroskopisch (10x-Vergrößerung) dokumentiert und vermessen wurde.

In den Versuchen, in denen Wachstumsmedium eingesetzt wurde, konnte bei allen Zelllinien eine deutliche Verringerung des Wundendurchmessers und somit ein Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit dokumentiert werden. A549-Zellen legten in 24 h durchschnittlich 446 μm zurück, Colo699 357 $\mu\text{m}/24$ h. H358 zeigte mit durchschnittlich 270 $\mu\text{m}/24$ h die geringste Migrationsgeschwindigkeit. Die schnellste Migration war mit durchschnittlich 1179 $\mu\text{m}/24$ h

4.6. Charakterisierung der Zellmigration in Wachstumsmedium und DMEM ohne Zusätze

bei der Zelllinie HCC44 zu beobachten, Panc1 zeigten mit $663 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ ebenfalls eine schnelle Migration. Durch HCC44-Zellen wurde der Wundspalt innerhalb von 48 h geschlossen. H358 zeigte ein sehr kompaktes, konfluentes Erscheinungsbild mit engen Zellverbänden, aus welchen an einzelnen Stellen Zellen in den Wundspalt migrierten. Es entstand ein Wundspalt mit unregelmäßiger Oberfläche, welcher im Beobachtungszeitraum nie verschlossen wurde. Auch durch Colo699 fand innerhalb von 48 h kein Wundverschluss statt. A549 und Panc1 konnten innerhalb von 48 h ebenfalls keinen kompletten Wundverschluss erzeugen, nach 48 h bildeten sich bei diesen Zelllinien aber bereits Berührungspunkte zwischen den Zellen an den Wundrändern. Der Wundverschluss wurde nur durch die Zellmigration herbeigeführt, da die Proliferation der Zellen durch die Behandlung mit Mitomycin C zu Versuchsbeginn inhibiert worden war.

In Abbildung 4.23 ist die durchschnittliche migrierte Strecke in 24h in Mikrometern aus $n=3$ Versuchen für alle Karzinomzellen dargestellt.

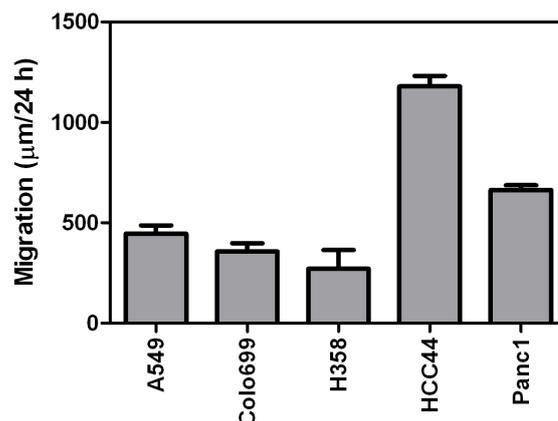


Abbildung 4.23: **Migrationsstrecke der Karzinomzelllinien im Wounding Assay in Wachstumsmedium nach 24 h.** Die lichtmikroskopisch gemessene Breite des Wundspaltes nach 24 h wurde von der gemessenen Breite des Wundspaltes zu Versuchsbeginn subtrahiert und so die zurückgelegte Migrationsstrecke errechnet ($(\text{Wundendurchmesser } (t_0) - \text{Wundendurchmesser } t(24))/2$). Dargestellt ist der Mittelwert aus $n=3$ Versuchen sowie die Standardabweichung als SEM.

Zur Charakterisierung des Einflusses von Wachstumsfaktoren im Kulturmedium auf die Migration erfolgten Wounding Assays in DMEM ohne Zusätze. Hier zeigte sich für alle verwendeten Karzinomzelllinien eine deutlich verminderte Migrationsgeschwindigkeit. Wie in den Versuchen mit Wachstumsmedium zeigte HCC44 den schnellsten Wundverschluss, gefolgt von Panc1. Ebenfalls wie in Wachstumsmedium war der Wundverschluss durch H358 am langsamsten, gefolgt von A549 und Colo699. A549 legte durchschnittlich $152 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ zurück, was einem prozentualen Rückgang von 66,04 % im Vergleich zu Wachstumsmedium entspricht. Colo699 legten $195 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ (-45,43 %), H358 $121 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ (-55,47 %), HCC44 $407 \mu\text{m}/24 \text{ h}$ (-65,66 %) und

4.6. Charakterisierung der Zellmigration in Wachstumsmedium und DMEM ohne Zusätze

Panc1 336 $\mu\text{m}/24\text{ h}$ (-49,21 %) zurück.

Eine vergleichende graphische Darstellung der Migrationsstrecke in Wachstumsmedium mit der in DMEM ohne Zusätze zeigt Abbildung 4.24.

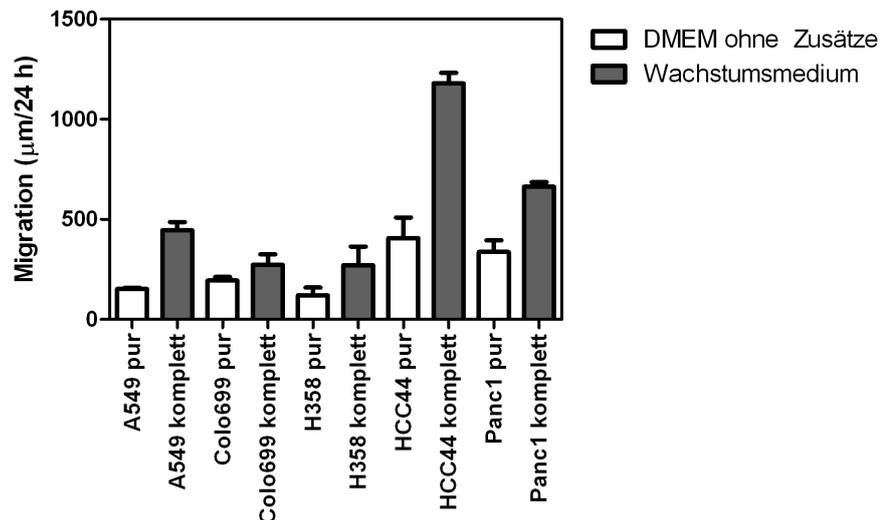


Abbildung 4.24: Migrationsstrecke der Karzinomzellen im Wounding Assay in Wachstumsmedium und in DMEM ohne Zusätze nach 24 h. Dargestellt sind Mittelwerte aus n=3 Versuchen sowie die Standardabweichung als SEM.

4.6.1 Veränderungen des Migrationsverhaltens im Wounding Assay durch Stimulation mit EGF

Zur Charakterisierung des Einflusses von EGF auf den Wundverschluss durch die Karzinomzelllinien erfolgten weitere Wounding Assays. Hierfür wurden pro Karzinomzelllinie zwei Ansätze für 24 h in Wachstumsmedium kultiviert. Nach Erreichen konfluenten Zellrasens wurden mit einer Pipettenspitze drei Wunden in den Zellrasen geritzt und anschließend zu einem Ansatz DMEM ohne Zusätze und zum anderen DMEM + 30 ng/ml EGF hinzu gegeben. Die Wunden wurden zu Versuchsbeginn sowie nach 24 h und 48 h lichtmikroskopisch vermessen und die zurückgelegte Strecke aus der Verkleinerung des Wundspalts berechnet (siehe Kap.: 4.6).

Abbildung 4.25 zeigt vergleichend die Migration der Zellen in DMEM pur und in DMEM pur + 30ng EGF/ml Medium. Da einige Zelllinien bereits vor Ablauf von 48 Stunden den Wundspalt komplett verschlossen hatten, wurden für die Auswertung die Messerergebnisse nach 24 Stunden verwendet.

4.6. Charakterisierung der Zellmigration in Wachstumsmedium und DMEM ohne Zusätze

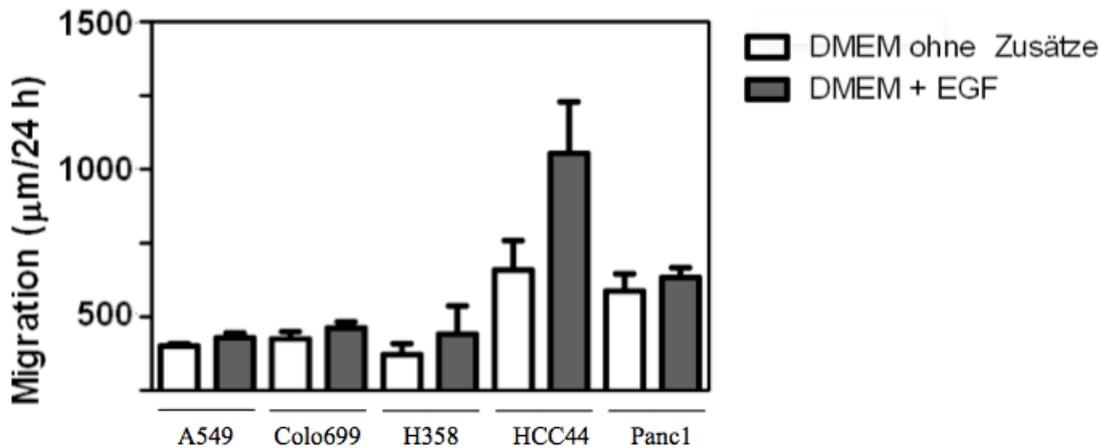


Abbildung 4.25: **Migrationsstrecke der Karzinomzellen im Wounding Assay nach 24 h in DMEM ohne Zusätze (weiß) und DMEM + 30 ng/ml EGF (grau).** Pro Zelllinie wurden zwei Schalen ausgesät, 24 h mit Wachstumsmedium inkubiert. Nach dem Setzen der Wunde mit einer Pipettenspitze wurde zu einer Schale DMEM ohne Zusätze und zur Anderen DMEM + 30 ng/ml EGF zugegeben. Die Wunde wurde zu den Zeitpunkten (t_0), (t_{24}) und (t_{48}) lichtmikroskopisch vermessen. Die Migrationsstrecke wurde aus dem Wundendurchmesser ($(t_0) - \text{Wundendurchmesser}(t_{48})/2$) berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert/-SEM aus n=3 Versuchen.

Durch die Zugabe von EGF konnte für alle untersuchten Karzinomzelllinien ein deutlich schnellerer Wundverschluss gezeigt werden.

Die größte EGF-induzierte Steigerung des Wundverschluss zeigten HCC44-Zellen, welche bei 97,9 %-iger Zunahme der zurückgelegten Strecke in den Wundspalt nach 24 h fast die doppelte Strecke wie die nicht-behandelte Kontrollgruppe im selben Zeitraum zurücklegten. Zudem zeigten HCC44 wie bereits in den Wounding Assays in Kapitel 4.6 den schnellsten Wundverschluss aller verwendeten Zellen. Auch hier muss jedoch die überdurchschnittliche Größe dieser Zellen bedacht werden, welche bei gleicher Wundbreite für alle Zellen zum schnelleren Wundverschluss beiträgt. Eine mit 60,9 % ebenfalls beträchtliche Steigerung der zurückgelegten Strecke nach EGF-Behandlung zeigten H358-Zellen, gefolgt von A549 (17,1 %), Panc1 (13,9 %) und Colo699 (7,9 %). Somit konnte ein Effekt von EGF in den Lungenkarzinomzelllinien sowohl auf zellulärer Ebene in Form von gesteigertem Migrationsverhalten als auch auf Proteinebene in Form einer Zunahme von Ras-GTP nachgewiesen werden. Die EGF-Stimulation änderte nichts an der Reihenfolge der Migrationsgeschwindigkeit der Karzinomzelllinien - wie bereits in Kapitel 4.6 zeigte HCC44 den schnellsten Wundverschluss, gefolgt von Panc1, Colo699, A549 und H358.

4.7 Veränderung des Migrationsverhaltens durch Inhibition von Ras

Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses von Ras-GTP auf das Migrationsverhalten im Wounding Assay erfolgten Versuche, in denen Ras in den Karzinomzelllinien durch Ras-Inhibitoren blockiert wurde. Hierfür wurden die Ras-Inhibitoren FTI-227, Fendiline und FTS verwendet. FTI-227 gehört zur Familie der Farnesyltransferase-Inhibitoren und damit zu den ersten bekannten Ras-Inhibitoren. *In Vitro* verhindern Farnesyltransferase-Inhibitoren die Ras-Farnesylierung und somit die weitere posttranslationale Prozessierung von H-Ras, K-Ras 4A und N-Ras am Golgi-Apparat sowie den Transport zur Zellmembran. *In vivo* können K- und N-Ras die Inhibition jedoch durch alternative Prenylierung mittels Geranylgeranyltransferase 1 umgehen, weshalb FTIs keine klinische Relevanz haben. Fendiline ist ein Kalziumkanalblocker vom L-Typ, welcher als einziger hier verwendete Inhibitor spezifisch K-Ras deaktiviert. Der inhibitorische Effekt ist unabhängig von der Funktion von Fendilinen als Kalziumkanalblocker und nicht vollständig geklärt. Die Interaktion von K-Ras mit der Plasmamembranen wird durch Fendiline verhindert und der Raf-MAPK-Signalweg hierdurch inaktiviert. [92]. FTS fungiert als ein spezifischer Ras-Antagonist. Durch Interaktion mit Ras-Bindungsstellen an der Zellmembran und deren Blockade wird Ras von der Plasmamembran gelöst und in der Zelle abgebaut. In H- und K-Ras-transformierten Fibroblasten und Panc1-Zellen konnte eine Inhibition des Wachstums durch FTS gezeigt werden [96].

Die Wounding Assays wurden analog zu den in Kapiteln 4.6 und 4.6.1 beschriebenen Versuchsaufbau mit den Zelllinien A549, Colo699, H358, HCC44 und Panc1 durchgeführt. Pro Zelllinie wurden vier Ansätze ausgesät, und die Zellen nach dem Wounding mit je 10 μM FTS, Fendiline oder FTI-227 behandelt. Die Zellen eines Ansatzes blieb als unbehandelte Kontrolle ohne weitere Zusätze. Nach 24 h erfolgte ein Medienwechsel mit erneuter Zugabe des jeweiligen Ras-Inhibitors, die Dokumentation des Wundspaltes erfolgte lichtmikroskopisch zu Versuchsbeginn (t_0), sowie nach 24 h (t_{24}) und 48 h (t_{48}). Durch Exposition der Zellen mit FTS oder Fendiline für mehr als 24 h kam es insbesondere in H358 und HCC44 zu zunehmender Apoptose, was wiederum zu einer Vergrößerung des Wundspaltes und formell zu negativer Migration führte. Aus diesem Grund waren die Messwerte nach 48 h nicht zuverlässig verwertbar.

In Abbildung 4.26 ist die Migrationsstrecke nach 24 h nach Behandlung mit den Ras-Inhibitoren und in der unbehandelten Kontrolle dargestellt.

4.7. Veränderung des Migrationsverhaltens durch Inhibition von Ras

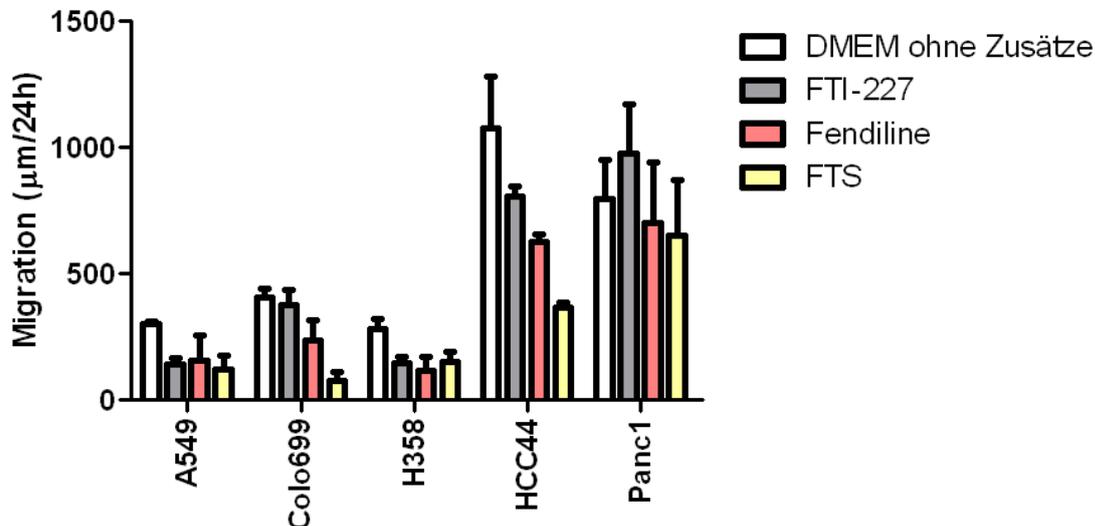


Abbildung 4.26: **Veränderungen der Migrationsstrecke in 24 h durch Zugabe der Ras-Inhibitoren FTI-227, Fendiline und FTS zu den Karzinomzelllinien.** Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in DMEM ohne Zusätze kultiviert und dann mit 10 µM je eines Ras-Inhibitors behandelt. Das Wounding erfolgte mit einer Pipettenspitze, anschließend wurde der Wundspalt zu Versuchsbeginn (t_0), 24 h (t_{24}) und 48h (t_{48}) lichtmikroskopisch vermessen. Aus der Differenz der Spaltbreite nach 24 h wurde die zurückgelegte Strecke in µm errechnet. (n=3, SEM)

Durch die Zugabe von Ras-Inhibitoren ins Zellkulturmedium konnte mit einer Ausnahme stets ein Rückgang der zurückgelegten Migrationsstrecke nach 24 h beobachtet werden. FTI-227 bewirkte in den Zelllinien A549, Colo699 und HCC44 den geringsten Rückgang der Migrationsstrecke, in Panc1 zeigte sich sogar eine Zunahme der Migrationsstrecke um 22,2 %. Durchschnittlich nahm die zurückgelegte Strecke durch die Behandlung mit FTI-227 in A549 um 53,8 %, in Colo699 um 11,6 %, in H358 um 46,8 % und in HCC44 um 24,9 % ab. Durch Zugabe von Fendiline konnte eine Reduktion der Migrationsstrecke in allen Zelllinien erzielt werden, welche in Colo699, H358, HCC44 und Panc1 stärker ausfiel als durch die Behandlung mit FTI-227. Durch Fendiline konnte in A549 ein Rückgang um 48,5 %, in Colo699 41,6 %, in H358 56,3 %, in HCC44 um 41,5 % und in Panc1 um 12,2 % verzeichnet werden. Die stärkste Abnahme der Migrationsstrecke nach 24 h zeigte sich durch die Behandlung mit FTS, durch welche in A549 60,8 % weniger Strecke zurück gelegt wurde, gefolgt von Colo699 (80,7 %), H358 (35,73 %), HCC44 (66,0 %) und Panc1 (18,4 %). FTS zeigte auch den stärksten zytotoxischen Effekt, aufgrund großer apoptotischer Areale mit Verfälschung des Wundspaltes konnten aus diesem Grund die 48 h-Werte in vielen Fällen nicht verwertet werden.

4.8 Effekte von Ras-Inhibitoren auf die EGF-induzierte Zellmigration

Durch die Behandlung mit 30 ng/ml EGF konnte in Kapitel 4.6.1 eine Zunahme der zurückgelegten Migrationsstrecke nach 24 h im Wounding Assay dokumentiert werden. Ob eine Zunahme der Migrationsstrecke durch EGF-Stimulation auch unter Ras-Blockade durch die Ras-Inhibitoren FTI-227, Fendiline und FTS möglich ist, wurde nachfolgend untersucht. Hierfür wurden jeweils acht Ansätze pro Zelllinie ausgesät und bis zu konfluentem Wachstum in DMEM ohne Zusätze kultiviert. Anschließend wurden zu drei Ansätzen je 10 μ M FTI-227, Fendiline oder FTS und zu weiteren drei FTI-227, Fendiline und FTS sowie 30 ng/ml EGF gegeben. Die Zellen der übrigen zwei Ansätze dienten als Kontrolle und waren mit DMEM ohne Zusätze oder DMEM + 30 ng/ml EGF überschichtet. Nach dem Wounding erfolgte die lichtmikroskopische Vermessung wieder zu Versuchsbeginn sowie nach 24 h und 48 h.

In Abbildung 4.27 ist die durchschnittliche Migrationsstrecke nach 24 h aus n=3 Versuchen dargestellt.

4.8. Effekte von Ras-Inhibitoren auf die EGF-induzierte Zellmigration

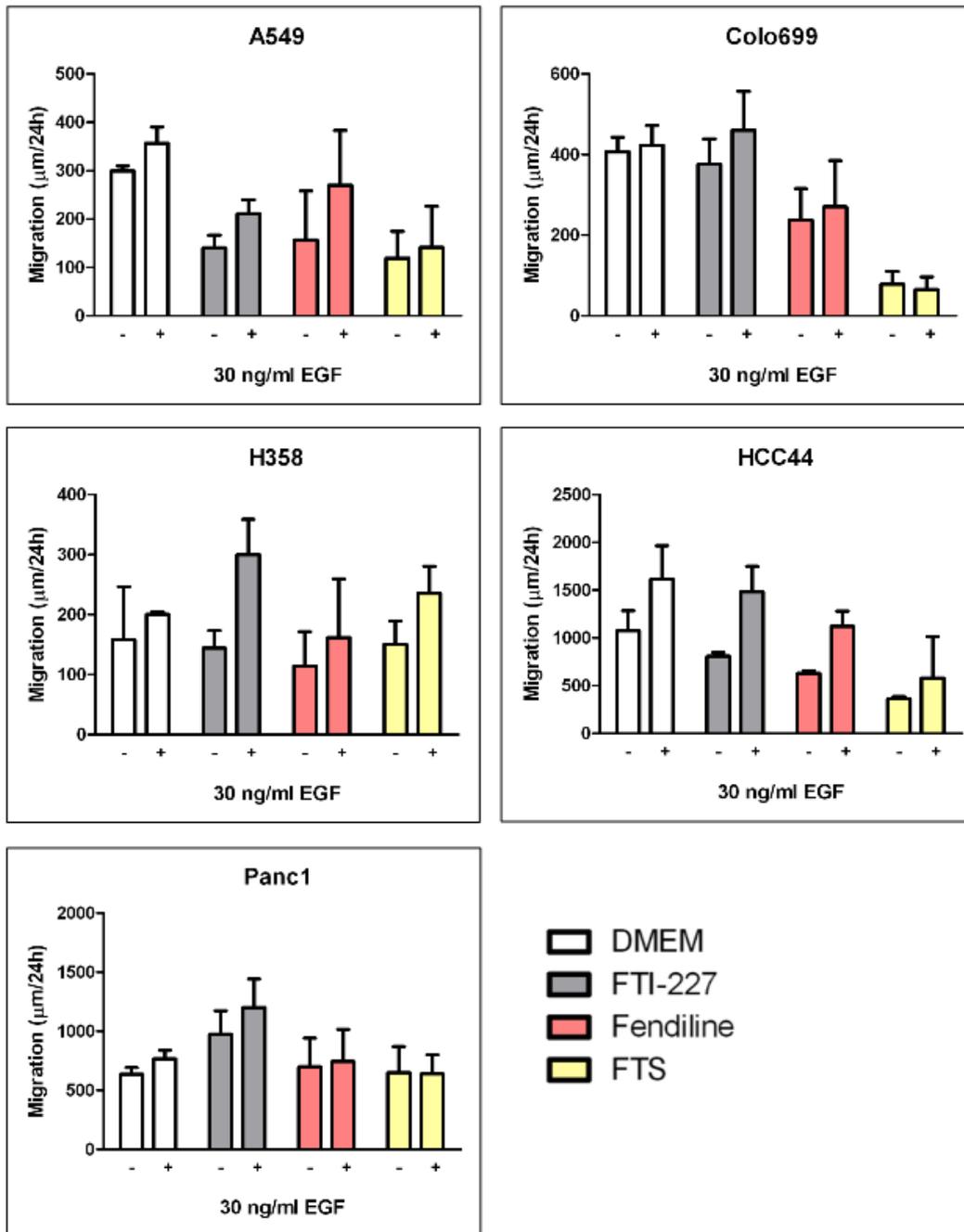


Abbildung 4.27: Effekte von EGF auf die Migration in 24 h von Karzinomzellen, die mit Ras-Inhibitoren behandelt wurden. Die Zellen wurden bis zu Konfluenz in DMEM ohne Zusätze kultiviert und anschließend mit 10 µM FTI-227, Fendiline oder FTS behandelt. Zur EGF-stimulierten Gruppe wurden gleichzeitig zum Ras-Inhibitor 30 ng/ml EGF gegeben. Nach dem Wounding erfolgte die lichtmikroskopische Vermessung des Wundspaltes nach 0 h, 24 h und 48 h. Die Berechnung der zurückgelegten Migrationsstrecke erfolgte aus der Vermessung des Wundspaltes nach 24 h. n=3, SEM.

Die Versuche zeigen, dass es trotz gleichzeitiger Behandlung mit einem der Ras-Inhibitoren FTI-227, Fendiline oder FTS durch Zugabe von 30 ng/ml EGF zu einer Zunahme der Migration der Karzinomzellen kommen kann. Der Effekt der EGF-Behandlung hängt sowohl vom zugege-

4.8. Effekte von Ras-Inhibitoren auf die EGF-induzierte Zellmigration

benen Ras-Inhibitor als auch von der behandelten Zelllinie ab.

So zeigten alle Karzinomzellen des mit FTI-227 und 30 ng/ml EGF behandelten Ansatzes eine schnellere Migration als die Zellen des Ansatzes, der nur mit FTI-227 behandelt wurde (A549: +50%, Colo655: +22,3 %, H358: +107 %, HCC44: +83,4 %, Panc1: +23,2 %). In den Zelllinien Colo699, H358 und Panc1 überstieg die Migration unter Behandlung mit FTI-227 + EGF sogar die in DMEM + 30 ng/ml EGF.

Auch die Migration innerhalb von 24 h der Zellen, die mit Fendiline behandelt wurden, konnte trotz des Ras-Inhibitors durch zusätzliche Gabe von 30 ng/ml EGF gesteigert werden (A549: +73,0 %, Colo699: +13,9 %, H358 +41,2 %, HCC44: +78,2 %, Panc1: +6,2 %). In HCC44 und Panc1 überstieg die Kombination aus Fendiline und EGF die Migrationsstrecke der Vergleichsgruppe in DMEM ohne Zusätze, blieb jedoch in allen Ansätzen hinter der Migration in DMEM + EGF zurück.

Bei mit FTS behandelten Zellen kam es durch Zugabe von 30 ng/ml EGF nur in den Zelllinien in AA549, H358 und HCC44 zu einer Zunahme der Migration in 24 h (A549: +18,5 %, H358: +56,6 %, HCC44: +79,0 %). In den Zelllinien Colo699 und Panc1 zeigte die Kombination von FTS und EGF keine oder eine Migrationsdämpfende Wirkung (Colo699: -16,6 %, Panc1: -1,8 %). Im Gegensatz zu den Ansätzen mit FTI-227 und Fendiline blieb die Migration unter FTS zudem bei allen Zelllinien hinter der Migration in DMEM ohne Zusätze zurück.

Zusammenfassend zeigt sich unter Behandlung mit FTI-227 eine gute Stimulierbarkeit mit EGF. Auch bei Behandlung mit Fendiline wird durch Zugabe von EGF eine Zunahme der Migration beobachtet, welche jedoch geringer ausfällt. Unter FTS kann nicht bei allen Zellen eine Zunahme der Migration durch Stimulation mit EGF erzielt werden und in den Zellen mit Zunahme der Migration fällt diese geringer aus als unter FTI-227 und Fendiline + EGF. Die deutlichste Zunahme der Migration durch EGF-Stimulation unter Behandlung mit Ras-Inhibitoren zeigen die Zelllinien HCC44 und H358, während sie in Panc1 und Colo699 für alle Ras-Inhibitoren am geringsten ausfällt.

5. Diskussion

Ras-Proteine sind monomere, GTP-bindende Proteine, die in ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form mit über 20 Effektorproteinen interagieren und über z.B. den Ras-ERK-Signalweg und den PI3K-AKT-Signalweg eine Rolle in der Zellmotilität, Zelldifferenzierung und Zellproliferation spielen [58]. Ras-Proteine liegen in humanen Zellen in den vier Isoformen H-Ras, N-Ras und K-Ras 4A/4B vor. K-Ras 4A wird im menschlichen Organismus nur in einigen Organsystemen wie z.B. Lunge und Nieren exprimiert und spielt im Vergleich zum ubiquitär exprimierten K-Ras 4B eine untergeordnete Rolle [91]. Die Ras-Isoformen interagieren aufgrund der Unterschiede in der HVR unterschiedlich mit der Plasmamembran, was die Lokalisierung in verschiedenen Zellkompartimenten und Nanoclustern und hierüber selektives Effektorrecruitment bewirkt [67]. Mit einer aktivierenden Ras-Mutation in 27 % aller menschlichen Karzinome ist Ras das häufigste onkogen mutierte Protein. Mehrheitlich besteht eine onkogene Mutation von K-Ras 4B, welche in 85 % aller Ras-Mutation-tragenden Tumore vorkommt, während *N-Ras*-Mutationen (in 11 % der Tumore) und *H-Ras*-Mutationen in 4 % der Tumore) deutlich seltener sind [71]. Das Bronchialkarzinom ist das menschliche Karzinom mit der höchsten Prävalenz und mit 1.6 Millionen Todesopfern jährlich auch das mit der höchsten Letalität [23]. In Lungenkarzinomen handelt es sich bei aktivierenden Ras-Mutationen fast ausschließlich um K-Ras, ca. 20 % aller Lungenkarzinome und 25 % der Lungenkarzinome vom NSCLC-Typ enthalten onkogen mutiertes K-Ras. Mutiertes H-Ras oder N-Ras kommen zusammen genommen in weniger als 1 % der Lungenkarzinome vor. Das Vorliegen von mutiertem K-Ras ist beim Lungenkarzinom ebenso wie bei anderen K-Ras-Mutation tragenden Tumoren wie Pankreas- oder Kolonkarzinomen mit erhöhter Letalität und schwereren Verläufen vergesellschaftet. Es wird vermutet, dass die besondere Onkogenität von K-Ras unter Anderem durch die Fähigkeit von K-Ras 4B bedingt ist, durch Bindung von Calmodulin neben dem MAPK auch den PI3a/AKT-Signalweg maximal aktivieren zu können, was durch H-Ras und N-Ras nicht möglich ist [65].

Die in dieser Arbeit analysierten Lungenkarzinomzelllinien A549, A427, HCC44, H358 sind Träger einer aktivierenden K-Ras-Mutation, Colo699 enthält Wildtyp-K-Ras. Die gut charakterisierte Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 mit aktivierender K-Ras-Mutation diente als Vergleich.

5.1 Expression von H-, K- und N-Ras in humanen Lungenkarzinomzelllinien und Panc1-Zellen

In dieser Arbeit wurden die vier NSCLC-Zelllinien A427, A549, H358 und HCC44 mit aktivierender K-Ras-Aktivierung sowie Colo699 mit Wildtyp-K-Ras hinsichtlich der Expression der Ras-Isoformen H-Ras, K-Ras und N-Ras charakterisiert. Durch Immunblots mit rekombinanten Ras-Proteinen konnten Antikörper identifiziert und Bedingungen etabliert werden, unter welchen trotz der 85-%igen Homologie in der Aminosäuresequenz der Ras-Proteine spezifisch je eine Isoform erkannt wurde (Abb. 4.2). Die Ergebnisse der Immunblots zeigten das Vorliegen der Ras-Isoformen H-Ras, K-Ras und N-Ras in jeder untersuchten Karzinomzelllinie (Abb. 4.7-4.9). Aufgrund posttranslationaler Modifikationen ist K-Ras größer als H-Ras und N-Ras und stellt die obere Bande in der Doppelbande der endogenen Ras-Proteine dar, wie auch Dr. Ute Dreissiacker für Panc1 in ihrer Arbeit *Charakterisierung der Regulation der Migration humaner Panc1-Pankreaskarzinomzellen durch konstitutiv aktives EGFP-K-Ras (G12V)* (Universität Ulm, 2005) darstellen konnte. Dieselbe Aufteilung in obere und untere Ras-Bande beschreiben Omerovic et al für HeLa Zellen [66]. Die Lokalisation von K-Ras in der oberen Ras-Bande und N-Ras sowie H-Ras in der unteren Ras-Bande konnte der vorliegenden Arbeit durch eine zweite Färbung der Immunblots mit pan-Ras-Antikörper und digitaler Überlagerung bestätigt werden. Anhand dieser Verteilung konnte das Verhältnis der Expression von Ras-Isoformen in einer Zelllinie semiquantitativ abgeschätzt werden. Da sich H- und N-Ras in der unteren Ras-Bande befinden, kann mit dieser Methode jedoch nur die Summe dieser beiden Isoformen im Verhältnis zu K-Ras beurteilt werden, Aussagen zum Verhältnis von H- zu N-Ras können nicht getätigt werden. Die Abschätzungen ergaben in A427 und Colo699 eine Expression von K-Ras, die der Summe von exprimiertem H- und N-Ras entsprach. In A549, H358 und Panc1 wurde mehr K-Ras als H- und N-Ras exprimiert, sodass sich letztlich in allen untersuchten Zelllinien K-Ras als die am stärksten exprimierte Isoform erwies. Newlaczyk und Co-Autoren zeigen in komparativen Analysen der Expression von Ras-Isoformen in einer großen Auswahl von Karzinomzelllinien ebenfalls die Expression aller Ras-Isoformen in den untersuchten Zelllinien. In der Mehrzahl der Zelllinien war K-Ras die am stärksten exprimierte Isoform, während H-Ras meist weniger als 20 % des total Ras repräsentiert [64]. Wang und Co-Autoren konnten mit Hilfe von Massenspektrometrie und *selected reaction monitoring* (SRM) in einer Auswahl von gesundem humanen Milz- und Darmschleimhautgewebe sowie humanen Kolonkarzinomzelllinien die Anzahl der Ras-Moleküle quantifizieren. Die Analysen zeigten erhebliche Unterschiede in der Menge des

5.2. Aktivität von H-, K- und N-Ras in humanen Lungenkarzinomzelllinien und Panc1-Zellen

exprimierten total Ras zwischen den Zelllinien, die Relation der Isoformen zueinander blieb jedoch erhalten. Auch diese Arbeit bestätigte K-Ras als die am stärksten exprimierte Ras-Isoform (63 +/- 10 %), gefolgt von N-Ras (23 +/- 5 %) und H-Ras (14 +/- 7 %) [95]. Auch in Untersuchungen der Genexpression von Ras-Isoformen in verschiedenen humanen Tumorgeweben wurde durch Newlaczyl et al das Verhältnis der Ras-Isoformen in dieser Reihenfolge bestätigt, wobei die Genexpression nicht uneingeschränkt der Proteinexpression entsprechen muss. Da die Arbeit die Splicevarianten K-Ras 4A und K-Ras 4B differenziert, ergab sich die Relation K-Ras 4B > N-Ras > K-Ras 4A > H-Ras [63]. Die Analyse von Ras-Transkriptionsleveln in verschiedenen gesunden Gewebetypen von Mäusen zeigte, dass K-Ras auch in gesundem Gewebe in den meisten Gewebearten > 80 % von Ras repräsentiert, während die Anteile von N-Ras (15 %) und H-Ras (1,9 %) erheblich geringer sind [62]. Insgesamt kann die Vermutung geäußert werden, dass die wichtige Rolle von K-Ras 4B sowohl in der Entstehung vieler Karzinome als auch in der embryologischen Entwicklung mit der im Vergleich zu den anderen Ras-Isoform erhöhten Gen- und Proteinexpression zusammen hängen kann.

Aus den Untersuchungen in dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer aktivierenden K-Ras-Mutation und geringerer Expression von H- oder N-Ras in den untersuchten Zelllinien abgeleitet werden. Auch für andere Zelllinien scheint hier kein Zusammenhang zu bestehen. Prior et al. untersuchten heterozygote knock-in Klone der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW48, die unterschiedliche aktivierende K-Ras-Mutationen oder K-Ras-Wildtyp enthielten [52]. SW48-Klone mit aktivierender K-Ras-Mutation zeigten im Vergleich zu SW48-Klonen mit Wildtyp-K-Ras keine signifikanten Unterschiede in der endogenen Expression von Wildtyp-Ras. Die Studie zeigte jedoch ein erhöhtes Vorkommen von total Ras (H-Ras, K-Ras4B und N-Ras) in allen Zelllinien mit aktivierender K-Ras-Mutation im Vergleich zu Zelllinien mit Wildtyp-Ras. Khanzada et al. konnten eine erhöhte Expression aller Ras-Isoformen auch für SCLC-Zellen im Vergleich zu gesunden Typ-II-Lungenepithelzellen zeigen [45].

5.2 Aktivität von H-, K- und N-Ras in humanen Lungenkarzinomzelllinien und Panc1-Zellen

Zur Aktivitätsbestimmung der Ras-Proteine in den Karzinomzelllinien wurden Ras-GTP-Bindungsassays durchgeführt. Hierfür wird das rekombinante Fusionsprotein GST-RBD mit enthaltener *ras binding domain* des Ras-Effektors c-raf zur selektiven Bindung von Ras-GTP genutzt [18]. Die selektive Bindung von Ras-GTP an die RBD, nicht jedoch an GST wurde bestätigt

5.2. Aktivität von H-, K- und N-Ras in humanen Lungenkarzinomzelllinien und Panc1-Zellen

(Abb. 4.11). Erwartungsgemäß lag in den Zelllinien mit aktivierender K-Ras-Mutation K-Ras-GTP in größerer Menge vor als in der Wildtyp-K-Ras tragenden Zelllinie Colo699. Insgesamt lag die Menge von K-Ras-GTP in allen Zelllinien über der von H- und N-Ras-GTP (Abb. 4.12) und unterschied sich zwischen den Zelllinien erheblich. Prior et al konnten an SW48-Klonen mit unterschiedlichen, aktivierenden K-Ras-Mutationen eine Zunahme von total Ras um bis zu > 65 % im Vergleich zu SW-48 mit Wildtyp-K-Ras beobachten [52]. Da sich die SW48-Zellklone im Gehalt an Wildtyp-Ras nicht unterschieden, ist diese Zunahme auf die Menge an aktivem, mutiertem K-Ras zurück zu führen. Die Analysen der SW48-Klone ergaben, dass K-Ras-GTP je nach vorhandener Mutation 15-40 % des total Ras und 40-60 % des total K-Ras ausmacht. Dies zeigt, dass auch diese Zellklone, so wie die in dieser Arbeit untersuchten Karzinomzelllinien, sich in der Menge an K-Ras-GTP stark unterscheiden.

Dies zeigt, dass K-Ras nicht nur den Großteil des endogenen Ras repräsentiert, sondern bei Vorliegen einer K-Ras-Mutation das mutierte, konstitutiv aktive K-Ras einen großen Teil des total K-Ras ausmacht. Bei den Mutationen G12A, G12D und G12R war der Anteil von mutiertem K-Ras an total K-Ras mit ca. 75 % sogar noch höher. In dieser Arbeit wurden die Zelllinien A427 und Panc1 mit einer Mutation in diesem Bereich (G12D) untersucht. A427 zeigten im Vergleich zu den anderen Zelllinien jedoch eine unterdurchschnittliche Menge von K-Ras-GTP, Panc1 lag im Durchschnitt. Ein Zusammenhang zwischen mutationsspezifischem onkogenem Signalling und erhöhtem Anteil von onkogenem Ras an total Ras scheint jedoch denkbar. Die Bedeutung der Menge von aktivem K-Ras, insbesondere bei der konstitutiven Aktivierung nachgeschalteter Signalwege und damit einhergehender Steigerung der Onkogenität, ist jedoch komplex und eine große Menge K-Ras-GTP ist nicht einfach mit erhöhter Malignität gleichzusetzen. So konnten z.B. Buard et al bereits 1996 in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien keine Korrelation zwischen malignem Phänotyp und dem alleinigen Vorhandensein einer aktivierenden K-Ras-Mutation oder der Überexpression von Ras nachweisen [11]. Sarkisian et al. zeigten im Gegenteil, dass die Überexpression von Ras eher zu Tumorseneszenz als zu Tumorwachstum führt [78]. Eine niedrige Effektoraktivierung in Karzinomzelllinien mit aktivierender Ras-Mutation wurde vielfach beschrieben; z.B. konnten Dreissigacker et al. in Panc1-Zellen trotz aktivierender K-Ras-Mutation keine konstitutive Aktivierung des nachgeschalteten MAPK-Signalwegs nachweisen; diese erfolgte in Panc1 erst durch Aktivierung von Wildtyp-N-Ras [20]. Durch die ausführliche Analyse der Aktivität der RAF und PI3K-Signalwege in SW48-Zellen mit G12V-Ras-Mutation konnten Prior et al. zeigen, dass allein durch Ras mit G12V-Mutation keine gesteigerte Aktivität dieser Signalwege generiert werden kann [38]. Ein weiteres Beispiel zeigten Omerovic

5.2. Aktivität von H-, K- und N-Ras in humanen Lungenkarzinomzelllinien und Panc1-Zellen

und Co-Autoren, die in DU145-Zellen mit Wildtyp-Ras eine vergleichbare oder sogar erhöhte Aktivierung von Akt und MAPK im Vergleich zu Zelllinien mit onkogener Ras-Mutation nachweisen konnten [66]. Durch Stimulation mit FBS konnte in dieser Studie trotzdem in Zellen mit onkogenem Ras eine Aktivierung von Akt erzielt werden. Es scheint demnach, dass onkogenes Ras weitgehend von der Effektoraktivierung abgekoppelt ist, das verbleibende Wildtyp-Ras in den Zelllinien jedoch die Fähigkeit zur Effektoraktivierung erhält. Aus diesem Grund fällt den in der Karzinomzelle vorliegenden Wildtyp-Ras-Isoformen eine wichtige Rolle zu. Die Aktivität der Wildtyp-Ras-Isoformen in den Karzinomzelllinien wurde in dieser Arbeit ebenfalls charakterisiert. Im Gegensatz zur Aktivität von K-Ras war die Aktivität von Wildtyp-H- und N-Ras in den untersuchten Karzinomzelllinien vergleichbar stark. Aufgrund der Lokalisierung beider Isoformen in der unteren Ras-Bande konnte das Verhältnis von H-Ras-GTP zu N-Ras-GTP durch die in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht abgeschätzt werden. Da H-Ras in gesundem Gewebe den kleinsten Anteil von total Ras bildet [62], kann vermutet werden, dass H-Ras-GTP den kleineren Teil des Ras-GTP in der unteren Ras-Bande darstellt. Eine untergeordneten Beitrag von H-Ras-GTP an total Ras-GTP auch nach Stimulation mit EGF konnten Omerovic et al in HeLa-Zellen bestätigen [66]. Ein direkter Zusammenhang zwischen überdurchschnittlicher K-Ras-Aktivität durch am Ehesten onkogenes K-Ras und erniedrigter oder erhöhter H-Ras- und N-Ras-Aktivität konnte in den untersuchten Zelllinien nicht gezeigt werden. Eine indirekte Verknüpfung der Aktivität von onkogenem Ras mit Wildtyp-Ras in Tumorzellen wird jedoch über den Aktivierungsstatus von Ras-Effektorproteinen beschrieben. So korreliert eine hohe Aktivierung von Ras-Effektorproteinen negativ mit dem Aktivierungsstatus von Wildtyp-Ras in Zellen aus Pankreas- (MIA PaCa-2) und Blasenkarzinom (T24) sowie in Rhabdomyosarkomzellen (RD) [106]. Generell gibt es widersprüchliche Daten bezüglich der Rolle von Wildtyp-Ras in Tumoren mit onkogener Ras-Mutation, mit Daten die sowohl für eine tumorsuppressive als auch für eine tumorfördernde Rolle sprechen [107]. Zum Beispiel beschreiben Balmain et al. eine tumorsuppressive Wirkung von WT-H-Ras und K-Ras in K-Ras tragenden Lungenkarzinomen [90], wohingegen Matallanas et al. eine zellprotektive Wirkung von WT-K-Ras in Kolonkarzinomzelllinien mit aktivierender K-Ras-Mutation durch Untedrückung proapoptotischer Signalwege beschreibt [54].

5.3 Aktivierung von wildtypischem Ras und onkogenem Ras über externe Stimulation mit EGF und LPA

Onkogene Mutationen von Ras führen zu konstitutiver Ras-Aktivierung, wobei insbesondere mutiertes K-Ras durch Aktivierung von *downstream*-Signalwegen wie MAPK und PI3K eine besondere Onkogenität besitzt [65]. Neben konstitutiv aktivem Ras spielen auch die in der Zelle vorliegenden wildtyp-Ras-Isoformen wichtige Rollen in der Regulation von Effektorsignalwegen und Wachstumsfaktor-vermitteltem *signalling*. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass onkogen mutiertes K-Ras allein keine verstärkte Aktivierung zentraler Signalwege verursachen kann und hierfür Wildtyp-Ras in der Karzinomzelle benötigt wird [38, 106]. Die Auswirkung des Wachstumsfaktors EGF auf die Aktivität von onkogenem K-Ras und die der wildtypischen Ras-Isoformen in NSCLC-Zellen wurde in dieser Arbeit im Ras-GTP-Bindungsassay untersucht. Die Aktivierung EGF-abhängigen Signallings erfolgt nach Bindung an einen von vier bekannten EGF-Rezeptoren (EGFR HER1-HER4), welche zur Gruppe der Rezeptorthyrosinkinase (RTK) zählen. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde zeigen in allen Zelllinien eine deutliche Aktivierbarkeit der als Wildtyp vorliegenden Ras-Isoformen H- und N-Ras sowie K-Ras (in Colo699) durch EGF, die einzige Ausnahme bildete H-Ras in A427. Als mit Abstand am stärksten durch EGF aktivierbar zeigte sich in den untersuchten Karzinomzelllinien N-Ras. Diese Ergebnisse finden sich auch in der Literatur. So zeigen Omerovic und Kollegen in einer Arbeit an HeLa-Zellen (humanes Zervixkarzinom), dass durch Stimulation mit EGF oder HGF auch in diesen Zellen N-Ras am stärksten aktivierbar ist, gefolgt von K-Ras und H-Ras [66]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten ebenfalls eine Aktivierbarkeit von K-Ras auch in Zelllinien mit aktivierender K-Ras-Mutation, die jedoch deutlich schwächer ausfiel als die Aktivierung von Wildtyp-K-Ras in Colo699. Die Zunahme von K-Ras-GTP durch Stimulation mit EGF in Zelllinien mit vorliegender aktivierender K-Ras-Mutation bestätigt, dass in diesen Zelllinien auch potentiell aktivierbares Wildtyp-K-Ras vorliegt. Das Vorliegen von Wildtyp-K-Ras in Karzinomzellen mit aktivierender K-Ras-Mutation bestätigen Prior et al. in Untersuchungen an humanen Kolonkarzinomzelllinien (SW48) [52]. In isogenen SW48-Klonen mit knock-in verschiedener aktivierender K-Ras-Mutationen oder K-Ras-Wildtyp wurde Massenspektrometrisch die Menge an K-Ras bestimmt. Durch Vergleich des total Ras der Wildtyp-K-Ras-SW48-Klone mit den K-Ras-Mutation tragenden SW48-Klonen wurde indirekt der Anteil von onkogenem K-Ras an total K-Ras bestimmt. Der Anteil wurde auf ca. 40-60 % geschätzt, was im Umkehrschluss bedeutet, dass auch 40-60 % des K-Ras als Wildtyp-K-Ras vorliegen und

5.3. Aktivierung von wildtypischem Ras und onkogenem Ras über externe Stimulation mit EGF und LPA

somit potentiell aktivierbar sind. Da mehrere Studien eine Abkopplung von onkogenem Ras von der Effektoraktivierung vermuten lassen [38, 66]), ist die Aktivierbarkeit von Wildtyp-Ras durch EGF in den Tumorzellen von großer Bedeutung. Young et al. zeigten, dass onkogenes K-Ras die Aktivierung und basale Regulierung von downstream-Effektoren wie MAPK reguliert, während die Wildtyp-Ras-Isoformen das RTK-abhängige Signalling von Wachstumsfaktoren vermitteln [106]. Zur Wachstumsfaktor-vermittelten MAPK-Aktivierung wird in Tumorzellen demnach Wildtyp-Ras benötigt. Dies konnten Prior et al an weiteren Studien mit K-Ras-Mutation tragenden SW48-Zellen zeigen. In Hungermedium bestand in diesen Zellen trotz konstitutiv aktivem K-Ras keine vermehrte Aktivierung des Ras-Signalnetzwerkes, was die These einer Abkopplung von onkogenem Ras aus den downstream-Signalwegen bestätigt oder durch negative Feedback-Mechanismen bedingt sein könnte. Erst eine Stimulation dieser Zellen mit EGF führte über die Aktivierung von Wildtyp-Ras zur deutlichen Aktivierung der zentralen, Ras-vermittelten Signalwege [38]. Dreissigacker und Co-Autoren fanden in Panc1-Zellen mit aktivierender K-Ras Mutation eine Zunahme der MAPK-Aktivität ebenfalls erst nach Aktivierung von Wildtyp-N-Ras in der Tumorzelle [20]. Die Fähigkeit der Tumorzelle, RTK-vermitteltes Signalling über Wildtyp-Ras zu modulieren, wird durch die Tatsache verstärkt, dass der EGFR von 40-50 % der NSCLC in deutlich erhöhter Menge exprimiert wird, wodurch diese Zelllinien für eine (Auto-)Stimulation mit EGF sensibilisiert sind [6]. Matallanas et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass onkogen mutiertes K-Ras durch eine autokrine Signalschleife den EGFR selbst aktivieren und somit die Rekrutierung von Wildtyp-Ras initiieren kann [54]. Die Beobachtung in dieser Studie, dass Wildtyp-Ras in Zellen mit einer aktivierenden Ras-Mutation durch EGF weniger stark aktivierbar ist, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. In Colo699 (Wildtyp-Ras) zeigte zwar die gleichmäßigste Aktivierung aller drei Ras-Isoformen, insgesamt fiel die Aktivitätszunahme der Ras-Isoformen durch EGF-Stimulation in dieser Zelllinie jedoch unterdurchschnittlich aus. Die Aktivierbarkeit der Wildtyp-Rasisoformen durch EGF bildet über die Aktivierung von sowohl RTK- als auch MAPK-abhängigen Signallings die essentielle Basis für das exponentielle Wachstum, die onkogene Transformation und das Überleben Ras-mutierter Tumoren [54, 106]. Hierzu passend ist in der Literatur für die auch in dieser Arbeit verwendeten NSCLC-Zellen A549 eine deutliche Zunahme der Proliferation durch Zugabe von EGF beschrieben worden [102].

Neben der Vermittlung von RTK-abhängigem Signalling spielen die wildtypischen Ras-Isoformen in der Tumorzelle auch eine Rolle in der Modulation der basalen Ras-Effektor-Aktivierung. Gerade fortgeschrittene, entdifferenzierte Tumore mit mutiertem K-Ras entwickeln eine regelrechte Abhängigkeit von Wildtyp H- und N-Ras. Grabocka und Kollegen zeigten durch

gezielten *knockdown* von Wildtyp-H- und N-Ras in isogenen DLD-1 Zellen (Kolonkarzinom) mit unterschiedlichen K-Ras-Mutationen, dass diese Ras-Isoformen die K-Ras-abhängige Aktivierung der Signalwege Raf/MAPK und PI3K/AKT antagonisieren können [28]. Dies ist bedeutsam, da beide Signalwege bei Aktivierung durch Beeinträchtigung der Chk1-Aktivität zur Inhibition der *DNA damage response* (DDR) führen. Diese verhindert katastrophale DNA-Schäden in K-Ras-mutierten Tumoren, sodass durch die Inhibition von Raf/MAPK und PI3K/AKT durch H- und N-Ras eine funktionierende Reparatur gravierender DNA-Schäden in der Tumorzelle unterstützt wird. Diese Tatsache überträgt Wildtyp H- und N-Ras letztlich eine überlebenswichtige Rolle in der Erhaltung und dem Überleben des Tumorphänotyps und etabliert Wildtyp H- und N-Ras als interessantes mögliches therapeutisches Ziel in der Tumorthherapie [28]. Bereits der *knockdown* nur einer Wildtyp-Ras-Isoform resultiert über eine Überaktivierung von Erk/Akt in der Inhibition von Chk1 und hierdurch in der Beeinträchtigung des DDR-Systems [28].

Neben RTK-vermitteltem Signaling werden zahlreiche zelluläre Prozesse durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie den Lysophosphatidylsäure (LPA)-Rezeptor reguliert. In dieser Arbeit konnte die Aktivierung von N-Ras in NSCLC-Zellen durch Behandlung mit LPA gezeigt werden. Weitere Versuche, die Auswirkung von LPA-Stimulation auf H- und K-Ras zu untersuchen, erbrachten keine verwertbaren Ergebnisse. LPA, ein Wachstumsfaktor-ähnliches Phospholipid, reguliert über mindestens 6 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine Vielzahl zellulärer Prozesse und führt in K-Ras-mutierten Pankreaskarzinomzellen zu erhöhter Motilität [105]. Auch für die Lunge konnte eine prokarzinogene Rolle von LPA-Signaling in Zusammenhang mit der Autotaxin-LPA-Achse gezeigt werden [53]. Die Möglichkeit, auch über LPA Wildtyp-Ras NSCLC-Zellen mit onkogen mutiertem K-Ras zu aktivieren, zeigt die Möglichkeit der Tumorzelle, auch über verschiedene Rezeptortypen eine Steigerung des zellulären Signalings zur Erhaltung von Tumormotilität und Proliferation zu generieren. Weitere Versuche zur Untersuchung und Differenzierung der Aktivierung von WT-Ras-Isoformen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind an dieser Stelle jedoch notwendig.

5.4 Motilität und Metastasierung

Ein wesentlicher Indikator für Malignität von Tumorzellen ist deren Fähigkeit zu unkontrollierter Proliferation und dem Ausbilden von Metastasen. Aktivierende K-Ras-Mutationen tragen durch Aktivierung von in Zellmotilität, Zelldifferenzierung und Zellproliferation involvierten

Signalwegen maßgeblich zur Entstehung eines solchen malignen Phänotyps bei. Die Ergebnisse dieser Arbeit in der zweidimensionalen Migration unter Zellkulturbedingungen beim Wundverschluss zeigen für die NSCLC-Zellen eine sehr große Heterogenität beim Wundverschluss. Auch mikroskopisch bestanden erhebliche Unterschiede in Zellgröße und Wachstumsmuster. In den durchgeführten *Wounding Assays* konnte bei den sehr großen HCC44 mit onkogener K-Ras-Mutation der schnellsten Wundverschluss beobachtet werden, während die ebenfalls onkogenes K-Ras tragende, deutlich kleinere Zelllinie H358 trotz hoher endogener K-Ras-Aktivität noch hinter Colo699 (K-Ras-WT) am langsamsten war. Die Geschwindigkeit des Wundverschlusses korreliert bei den untersuchten Karzinomzelllinien demnach nicht direkt mit der Menge an (konstitutiv) aktivem K-Ras, es zeigte sich lediglich ein klarer Zusammenhang zwischen der Zellgröße und der Geschwindigkeit beim Wundverschluss. Weitere Faktoren wie Wachstumsmuster und insbesondere Aktivierung und cross-talk verschiedener Signalwege wurden in dieser Arbeit nicht analysiert. Durch Stimulation mit EGF konnte eine Steigerung der Migrationsstrecke in 24 h gezeigt werden, die mit einer Steigerung von 7,9 % (Colo699) - 97,9 % (HCC44) zwischen den Zelllinien sehr unterschiedlich ausfiel. Die in Stimulationsexperimenten im Ras-GTP-Bindungsassay gezeigte Aktivierung von H- und N-Ras durch EGF in Zellen mit onkogen mutiertem K-Ras und in die der Literatur beschriebene Vermittlung von RTK-vermitteltem *signalling* durch Wildtyp-Ras in mutiertem Ras-tragenden Zellen könnte hierzu maßgeblich beitragen [20, 66]. Auch der Anteil von Wildtyp-K-Ras an onkogenem K-Ras, den Prior und Kollegen in SW48-Zellen auf ca. 40-80 % berechneten, dürfte hierbei eine Rolle spielen [52]. Die Untersuchung der Rolle von Ras-Proteinen im Migrations- und Metastasierungsverhalten der NSCLC-Zelllinien erfolgte durch die Zugabe der Ras-Inhibitoren FTI-227, Fendiline oder FTS bei weiteren *Wounding Assays*. Den geringsten Effekt zeigte der Farnesyltransferaseinhibitor FTI-227, wodurch es in Colo699 und Panc1 zu keiner Reduktion der Migration kam und in den Zelllinien A549, H358 und HCC44 zwischen 25 - 54 %. Hierzu passt, dass K- und N-Ras *in vivo* alternativer Prenylierung durch Geranylgeranylase-1 unterlaufen, dadurch volle Funktionalität erreichen und hierdurch der Effekt von Farnesyltransferaseinhibitoren wie FTI-227 umgangen wird [99]. Auch deshalb haben diese Substanzen keine klinische Relevanz erreicht. Versuche, durch eine Kombinationstherapie aus FTI und Geranylgeranylaseinhibitoren (GGTI) die Funktion von N- und K-Ras zu inhibieren, sind aufgrund der extrem hohen Toxizität dieser Kombinationen gescheitert. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Stimulation der FTI-227-behandelten Zellen mit EGF eine deutliche Zunahme der Migrationsstrecke bei allen Zelllinien beobachtet werden, die zum Teil sogar die Migrationsstrecke der nicht mit FTI-227-behandelten Kontrollgruppe überstieg. Grundlage

hierfür könnte einerseits die durch Whyte und Kollegen gezeigte insuffiziente Ras-Blockade durch FTI-227 sein [99]. Weiterhin gibt es in der Literatur Hinweise dafür, dass die Blockade von onkogenem Ras und das damit einhergehende Fehlen von negativen Feedbackmechanismen zu einer kompensatorischen Sensibilisierung der Tumorzelle für EGF-Stimulatoin und somit letztlich gesteigerter Aktivierung von Ras-Isoformen führen kann [106]. Young und Kollegen zeigten an Mia PaCa-2, RD- und T24-Zellen, in denen onkogenes Ras mittels siRNA-*knockdown* ausgeschaltet wurde, eine Verstärkung des EGFR-vermittelten *signalling* im Vergleich zur Kontrollgruppe mit onkogenem Ras.

Die Effekte einer spezifischen K-Ras-Blockade wurden in dieser Arbeit mit dem K-Ras-Inhibitor Fendiline durchgeführt. Durch die Zugabe von Fendiline kam es in den behandelten Karzinomzelllinien zu einer Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit zwischen 12 % (Panc1) - 56 % (H358) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Fendiline verhindert durch Interaktion mit der *polybasic domain* von K-Ras dessen Interaktion mit der Plasmamembran, wodurch K-Ras-vermitteltes *signalling* effizient unterbunden und K-Ras in der Zelle abgebaut wird [92]. Da Fendiline spezifisch nur K-Ras inhibiert, kann anhand der Ergebnisse durch den Rückgang der Migrationsstrecke der Beitrag von K-Ras zur Migration abgeschätzt werden. Ob dieser Rückgang auf die Inhibition von Wildtyp-K-Ras oder onkogenem K-Ras in diesen Zellen zurückzuführen ist, kann an Hand der Versuche zunächst nicht differenziert werden. Durch Stimulation mit EGF zeigte sich in der vorliegenden Arbeit für alle Zelllinien außer Colo699 eine Steigerung der Migrationsstrecke auf das Niveau der Kontrollgruppe, die nicht mit Fendiline behandelt wurde. Die Ergebnisse mehrerer Studien konnten zeigen, dass EGF-vermitteltes Signaling in Zelllinien mit onkogener Ras-Mutation durch Wildtyp-Ras vermittelt wird [38, 106]. Da durch Fendiline neben onkogenem K-Ras auch das in der Tumorzelle vorliegende Wildtyp-K-Ras effizient blockiert wird, zeigen die Ergebnisse die Fähigkeit von Wildtyp H- und N-Ras, die Blockade von Wildtyp-K-Ras funktionell kompensieren zu können. Hierdurch zeigt sich einmal mehr die komplexe Rolle von Wildtyp H- und N-Ras, die einerseits die RTK-Vermittelte Aktivierung von MAPK und PI3K bewirken, jedoch auch K-Ras-abhängige Aktivierung derselben Signalwege in entdifferenzierten Tumoren antagonisieren können [28, 106].

Der stärksten Rückgang der Migrationgeschwindigkeit wurde in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen durch die Zugabe von FTS bewirkt, welches zur Abnahme Migrationsstrecke um 18,4 (Panc1) - 80,7 % (HCC44) führte. Im Gegensatz zur Behandlung mit Fendiline und FTI-227 zeigte FTS jedoch eine hohe Zytotoxizität in allen untersuchten Zelllinien. FTS, auch bekannt als Salirasib, ist ein funktioneller Ras-Antagonist und disloziert Ras Isoformunabhängig

von der Plasmamembran, wodurch dessen Abbau in der Zelle eingeleitet wird [74]. Sowohl in vitro als auch in vivo führt FTS zu einer vielversprechender Reduktion von Tumorwachstum in Mäusen [30]. Bei FTS-Behandlung über einen längerem Zeitraum lässt sich bei vielen Tumorzellen jedoch eine zunehmende Immunität gegen die zytotoxischen Effekte der FTS-Therapie nachweisen, wie Schmukler und Kollegen durch Behandlung von Kolonkarzinomzellen vom Typ HCT-116 (mit mutiertem K-Ras) mit FTS über einen Zeitraum von 6 Monaten nachweisen konnten. HCT-116-Zellen, die durch eine einjährige Behandlung mit FTS über eine erworbene Resistenz verfügten, wiesen deutliche erhöhte Levels des LC3-Proteins auf als nicht-resistente HCT-116-Zellen. LC3 fördert Autophagie, welche als Resistenzmechanismus das Zellüberleben unter FTS fördert [79]. Die Mechanismen der erworbenen FTS-Resistenz lassen sich möglicherweise auch auf andere Tumortypen übertragen. Durch Stimulation mit EGF konnte in der vorliegenden Arbeit in den FTS-behandelten Zelllinien eine geringere Zunahme der Migrationsstrecke als in den FTI-227- oder Fendiline-behandelten Zelllinien beobachtet werden. Ursächlich hierfür könnte der isoformunspezifische Abbau von Ras durch FTS sein, welcher zur Reduktion von Gesamt-Ras in der Zelle führt und eine Kompensation durch H- und N-Ras (wie im Fall von Fendiline) erschwert. Insgesamt zeigen die durchgeführten Migrationsstudien mit Ras-Inhibitoren die deutlichen Unterschiede der NSCLC-Zellen beim Ansprechen auf die Behandlung mit Ras-Inhibitoren und bestätigen die vergleichsweise schlechte Wirksamkeit von FTIs, die Kompensation von H- und N-Ras für K-Ras sowie die hohe Toxizität und Wirksamkeit von FTS.

5.5 Ausblick

Aktivierende Ras-Mutationen finden sich in 27 % aller menschlichen Tumore. In Kolon-, Pankreas- und Lungenadenokarzinomen betreffen Ras-Mutationen fast ausschließlich K-Ras, was mit früher Metastasierung, aggressivem Wachstum und letztlich erhöhter Sterblichkeit assoziiert ist. Onkogenes Ras ist deshalb für die Tumorthherapie ein hochinteressantes Ziel und Gegenstand ausgedehnter Forschung, eine kurative Therapie Ras-mutierter Tumore ist bis dato jedoch nicht verfügbar. Therapeutische Ansätze beinhalten direkte und indirekte Ansätze. Direkte Ras-Inhibition erfolgt z.B. durch G12C-Inhibitoren, welche die Bindung von GTP an Ras verhindern oder Substanzen, die Ras-Interaktion mit SOS 1 RASGEF blockieren. Indirekte Ras-Inhibitoren wie z.B. FTIs verhindern die Plasmamembranverankerung von Ras durch Verhinderung der nötigen PTMs, dislozieren Ras von der Plasmamembran (Salirasib) oder stören den Transport

zur Plasmamembran. Weitere Therapieansätze beinhalten unter Anderem die Blockade von Ras-abhängigem *signaling* durch Inhibition von Effektoren von RAF oder PI3K oder den *knockdown* des KRAS-Gens mittels siRNA [68]. Trotz der verschiedenen Ansätze erweisen sich Therapien mit isolierter Inhibition von onkogenem Ras und dessen Signaling bisher als nicht erfolgreich. Gründe hierfür sind zum Beispiel das Entstehen von Therapieresistenzen nach längerer Behandlungsdauer wie im Falle von FTS, das Aktivieren von kontraproduktiven Feedback-Mechanismen mit Reaktivierung von MAPK-Signaling (z.B. MEK-Inhibitoren) und die große Tumorpheterogenität mit sehr unterschiedlichem Ansprechen auf die Therapieansätze. Die Komplexität der Feedback-Mechanismen und Effektorregulation von onkogenem Ras macht die Suche nach weiteren therapeutischen Zielproteinen zu einem wichtigen Ziel zukünftiger Forschung. Als ein solches interessantes Zielprotein entwickelt sich neben onkogenem Ras zunehmend Wildtyp-Ras in Tumorzellen mit Ras-Mutation. So vermittelt Wildtyp-Ras das RTK-abhängige Signaling, von welchem onkogenes K-Ras weitgehend abgekoppelt ist [106]. Die effektive Aktivierung von H- und N-Ras in NSCLC-Zellen mit Vorliegen einer onkogenen K-Ras-Mutation durch EGF und die daraus resultierende Aufhebung des Effekts von Ras-Inhibitoren im Migrationsassay konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Zudem spielt Wildtyp-Ras in sehr entdifferenzierten Tumoren über die Antagonisierung K-Ras-abhängigem Signaling eine wichtige Rolle im Zellüberleben, der *knockdown* nur einer Wildtyp-Ras-Isoform resultierte durch Beeinträchtigung des DDR-Systems in vermehrtem Zelltod [28]. Der Fall von FTS zeigt jedoch, dass auch eine Inhibition aller Ras-Isoformen nicht dauerhaft wirksam sein muss. Trotz guter Tumorreduktion im kurzfristigen Verlauf zeigen Zellen *in vitro* innerhalb weniger Monate die Entwicklung effizienter Resistenzmechanismen durch Autophagie [79]. Für eine dauerhaft erfolgreiche Tumorthherapie muss demnach neben der Inhibition von Wildtyp-Ras und onkogenem Ras auch der Cross-talk mit anderen Signalwegen berücksichtigt werden. Da 40-50 % der Tumore eine Überexpression des RTK aufweisen, bietet sich die Blockade mit RTK-Inhibitoren an. Wheeler und Kollegen zeigten jedoch bereits 2010 in klinischen Studien eine Resistenz von K-Ras-mutierten Tumoren gegen RTK-Inhibitoren, die vermutlich auf eine K-Ras-vermittelte Unterdrückung von RTKs zurück geht. Somit ist eine isolierte Therapie mit RTK-Inhibitoren ebenfalls nicht aussichtsreich [98,106]. Die aktuelle Studienlage deutet mehr und mehr auf die Notwendigkeit effektiver Kombinationstherapien hin. Hidenori und Co-Autoren konnten für die Kombination des MEK-Inhibitors Trametinib mit einem FGFR-Inhibitor durch Blockade des Ras-abhängigen *signaling* mit paralleler Unterdrückung der RTK-Wildtyp-Ras-Achse zur Tumorregression in KRAS-mutierten Lungenkarzinomzelllinien zeigen [36]. Zusammenfassend scheint entsprechend der Komplexi-

tät und Heterogenität im Bereich von K-Ras-mutierten Tumoren und speziell bei NSCLCs ein allgemeingültiger Therapieansatz wenig erfolgversprechend. Vielmehr werden tumorspezifische Kombinationstherapien anhand von Proteinexpressionsmustern in Zukunft an Wichtigkeit gewinnen. Die Wildtyp-Ras-Isoformen können hierbei als ein therapeutisches Ziel unter Vielen eine Reduktion von Tumorwachstum und -malignität unterstützen.

6. Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung

Ras-Proteine gehören zur Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine, die als molekulare Schalter in der Zelle eine zentrale Rolle einnehmen. Eine aktivierende Mutation von K-Ras findet sich in etwa 30 % der humanen Adenokarzinome der Lunge. In dieser Arbeit wurde die Expression, Aktivität und Wachstumsfaktor-vermittelte Aktivierbarkeit von K-Ras im Vergleich zu den beiden Ras-Isoformen H-Ras und N-Ras in Lungenkarzinomzellen untersucht und der Einfluss von K-Ras auf das Migrationsverhalten analysiert. Hierfür wurden humane Lungenadenokarzinomzelllinien mit aktiverender K-Ras-Mutation (A427, A549, H358, HCC44) und ohne Mutation (Colo699) untersucht. Als Vergleich diente die Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 mit aktivierender K-Ras Mutation. Das Vorliegen aller Ras-Isoformen konnte im Immunblot in jeder untersuchten Zelllinien bestätigt werden. Als am stärksten exprimierte Isoform konnte K-Ras identifiziert werden, gefolgt von N-Ras und H-Ras. In Ras-GTP-Bindungsassays wurde gezeigt, dass K-Ras auch den größten Anteil des aktiven Ras in allen untersuchten Zelllinien repräsentiert. Durch Stimulation mit epidermal growth factor (EGF) konnten alle Ras-Isoformen aktiviert werden, am stärksten nahm die Aktivität von N-Ras zu. K-Ras ließ sich in Zellen mit Wildtyp K-Ras (Colo699) oder heterozygoter K-Ras-Mutation (A427, H358, HCC44) stimulieren, in Zellen mit homozygoter K-Ras-Mutation (A549) konnte keine weitere Aktivierung erzielt werden. Zur Charakterisierung des Migrationsverhaltens der Zellen wurden Wounding Assays, bei denen die Dauer bis zum Verschluss einer in einen konfluenten Zellrasen gesetzten Wunde gemessen wird, durchgeführt. Hier zeigte sich eine große Heterogenität zwischen den Zelllinien bei der benötigten Zeit bis zum Wundverschluss. Durch EGF-Stimulation konnte ein beschleunigter Verschluss des Wundspalts beobachtet werden, wobei die Zunahme der Verschlussgeschwindigkeit mit einer Steigerung zwischen 7,9 % - 97,9 % im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle sehr unterschiedlich ausfiel. Eine Ras-Blockade mit Farnesyltransferase-Inhibitor FTI-227, den K-Ras-Inhibitoren Fendiline bzw. FTS führte zur Verlangsamung der Zellmigration. Durch Behandlung der Zellen mit Ras-Inhibitor und Stimulation mit EGF konnte der inhibitorische Effekt von FTI-227 und Fendiline revertiert werden. Bei FTS, welches auch die stärkste Verlangsamung der Migration hervorrief, konnte der inhibitorische Effekt durch Stimulation mit EGF nicht

kompensiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte die Verteilung und unterschiedliche Aktivierbarkeit der Ras-Isoformen durch EGF sowie die Relevanz von K-Ras für die Migration in Lungenadenokarzinomzelllinien gezeigt werden.

6.2 Abstract

Ras proteins belong to a family of small GTP-binding proteins, which play a central role as molecular switches in the cell. Approximately 30 % of all human adenocarcinomas of the lung carry an activating mutation of K-Ras. In the present study the expression, activity and growth factor-mediated activation of K-Ras in lung adenocarcinoma cells was compared to those of Ras isoforms H-Ras and N-Ras. We further analyzed the influence of K-Ras on migratory behavior of these cells. For this purpose, human lung adenocarcinoma cell lines with active K-Ras mutation (A427, A549, H358, HCC44) and without mutation (Colo699) were investigated. The well characterized pancreatic carcinoma cell line Panc1 with activating K-Ras mutation was used for comparison. The presence of all Ras isoforms was confirmed in each cell line by immunoblot procedure. K-Ras was identified as the primarily expressed isoform, followed by N-Ras and H-Ras. In Ras-GTP binding assays it was shown that K-Ras also represents the largest portion of active Ras in all cell lines studied. Stimulation with *epidermal growth factor* (EGF) lead to activation of all Ras isoforms, with N-Ras activity increasing the most. K-Ras was stimulated in cells with wild-type K-Ras (Colo699) or heterozygous K-Ras mutation (A427, H358, HCC44) whereas no activation was observed in cells with homozygous K-Ras mutation (A549). To characterize the migratory behavior of the cells, wounding assays were performed in which the duration until closure of a wound placed in a confluent cell layer was measured. Here, a great heterogeneity between the cell lines in the time period to close the wound was observed. EGF stimulation resulted in an accelerated closure of the wound gap in all cells, with an increase in the closure rate between 7.9 % and 97.9 % compared to the unstimulated control. A Ras blockade with the farnesyltransferase inhibitor FTI-227 or one of the K-Ras inhibitors Fendiline and FTS decreased cell migration. By treating the cells with Ras inhibitor and co-stimulation with EGF, the inhibitory effects of FTI-227 and Fendiline could be reverted. However, the inhibitory effect of FTS, which also caused the strongest slowdown in migration, could not be compensated by stimulation with EGF. In the present work, the distribution, activity and different activation of the Ras isoforms by EGF as well as the relevance of K-Ras in migration of lung adenocarcinoma cell lines were demonstrated.

Literaturverzeichnis

- [1] I. Ahearn, K. Haigis, D. Bar-Sagi, and M. Philips. Regulating the regulator: post-translational modification of Ras. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(1):39–51, 2011.
- [2] D. Alessi, Y. Saito, D. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, U. Rapp, A. Ashworth, C. J. Marshall, and S. Cowley. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J*, 13(7):1610–1619, 1994.
- [3] D. R. Alessi, L. R. Pearce, and J. M. García-Martínez. New Insights into mTOR Signaling: mTORC2 and Beyond. *Sci. Signal*, 2(67):27pp, 2009.
- [4] M. Barbacid. Ras genes. *Annu Rev Biochem*, 56:779–827, 1987.
- [5] F. Barlesi et al. Preliminary results of routine EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PI3KCA mutations detection and EML4-ALK gene fusion assessment on the first 10,000 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *J Clin Oncol*, 31:486s, 2013.
- [6] G. Bethune, D. Bethune, N. Ridgway, and Z. Xu. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *Thorac Dis.*, 2(1):48–51, 2010.
- [7] P. Boissier and U. Huynh-Do. The guanine nucleotide exchange factor Tiam1: a Janus-faced molecule in cellular signaling. *Cell Signal*, 26(3):483–91, 2014.
- [8] J. Bos. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.*, pages 4682–4689, 1989.
- [9] J. Bos. Ras-like GTPases. *Biochim Biophys Acta*, 1333(2):M16–31, 1997.
- [10] W. Brugger, N. Triller, M. Blasinska-Morawiec, S. Curescu, R. Sakalauskas, G. Manikhas, J. Mazieres, R. Whittom, C. Ward, K. Mayne, K. Trunzer, and F. Cappuzzo. Prospective

- molecular marker analyses of EGFR and KRAS from a randomized, placebo-controlled study of erlotinib maintenance therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 29(31):4113–20, 2011.
- [11] A. Buard, P. Zipfel, R. Frey, and M. KM. Maintenance of growth factor signaling through Ras in human colon carcinoma cells containing K-Ras mutations. *Int J Cancer*, (4):539–46, 1996.
- [12] M. Burotto, E. Manasanch, J. Wilkerson, and F. T. Gefitinib and erlotinib in metastatic non-small cell lung cancer: a meta-analysis of toxicity and efficacy of randomized clinical trials. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(4):400–410, 2015.
- [13] E. Castellano, M. Molina-Arcas, A. Krygowska, P. East, P. Warne, A. Nicol, and J. Downward. Ras signalling through PI3-Kinase controls cell migration via modulation of Reelin expression. *Nat Commun.*, 7, 2016.
- [14] F. Chang, L. Steelman, J. Lee, J. Shelton, P. Navolanic, W. Blalock, R. Franklin, and J. McCubrey. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*, (17):1263–1293, 2003.
- [15] E. Choy, V. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. Ivanov, and M. Philips. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell*, 98:60–80, 1999.
- [16] W. Cooper, D. Lam, S. O’Toole, and J. Minna. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis*, 5:S479–S490, 2013.
- [17] A. Cox, S. Fesik, A. Kimmelman, J. Luo, and C. Der. Drugging the undruggable Ras: Mission Possible? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 13:828–851, 2014.
- [18] J. de Rooij and J. Bos. Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene*, 14(5):623–5, 1997.
- [19] J. Downward. Control of ras activation. *Cancer Surv.*, 27:87–100, 1996.
- [20] U. Dreissigacker, M. Mueller, M. Unger, P. Siegert, F. Genze, P. Gierschik, and K. Giehl. Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and

- invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. *Cellular Signalling*, pages 1156–68, 2005.
- [21] S. Eisenberg, A. Laude, A. Beckett, C. Mageean, V. Aran, M. Hernandez-Valladares, Y. Henis, and I. Prior. The role of palmitoylation in regulating Ras localization and function. *Biochem Soc Trans.*, 41(1):79–83, 2013.
- [22] N. Fehrenbacher, D. Bar-Sagi, and M. Philips. Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Mol Oncol.*, 3(4):297–307, 2009.
- [23] J. Ferlay et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.*, 136(5):E359–E386, 2015.
- [24] E. Ferro and L. Trabalzini. RalGDS family members couple Ras to Ral signalling and that's not all. *Cellular Signalling*, 22:1804–1810, 2010.
- [25] R. Ferro and M. Falasca. Emerging role of the KRAS-PDK1 axis in pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.*, 20:10752–10757, 2014.
- [26] C. Fumarola, M. A. Bonelli, P. G. Petronini, and R. R. Alfieri. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochemical Pharmacology*, 90:197–207, 2014.
- [27] K. Giehl. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol. Chem.*, 386:193–205, 2005.
- [28] E. Grabocka, Y. Pylayeva-Gupta, M. Jones, V. Lubkov, E. Yemanaberhan, L. Taylor, H. Jeng, and D. Bar-Sagi. Wild-type H- and N-Ras promote mutant K-Ras-driven tumorigenesis by modulating the DNA damage response. *Cancer Cell*, 25:243–256, 2014.
- [29] F. Griesinger. Systemtherapie bei molekularen Subgruppen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. *Trillium Krebsmedizin*, (01), 2014.
- [30] R. Haklai, G. Elad-Sfadia, Y. Egozi, and Y. Kloog. Orally administered FTS (salirasib) inhibits human pancreatic tumor growth in nude mice. *Chemother Pharmacol*, 61(1):89–96, 2008.
- [31] S. Hammerschmidt and H. Wirtz. Lung Cancer: Current Diagnosis and Treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 106(49):809–20, 2009.
- [32] J. Hancock. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, (4):373–384, 2003.

- [33] J. Hancock, H. Paterson, and C. Marshall. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell*, 63:133–139, 1990.
- [34] Y. Henis, J. Hancock, and I. Prior. Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters. *Mol. Membr.Biol.*, 26:80–92, 2009.
- [35] R. S. Herbst, J. V. Heymach, and S. M. Lippman. Lung Cancer. *N Engl J Med*, 359(13):1367–80, 2008.
- [36] K. Hidenori and E. Hiromichi. Key roles of EMT for adaptive resistance to MEK inhibitor in K-Ras mutant lung cancer. *Small GTPases*, 8(3):172–176, 2017.
- [37] G. A. Hobbs, C. J. Der, and K. L. Rossman. Ras isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci*, 129(7):1287–1292, 2016.
- [38] F. E. Hood, B. Klinger, A. U. Newlaczyl, A. Sieber, M. Dorel, S. P. Oliver, J. M. Coulson, N. Blüthgen, and I. A. Prior. Isoform-specific Ras signaling is growth factor dependent. *Molecular Biology of the Cell*, 2019.
- [39] N. Hossein, A. Ehsan, N.-R. Saeideh, D. Radovan, and R. A. Mohammad. The Ras-Effector Interface: Isoform-Specific Differences in the Effector Binding Regions. *Plos one*, 11(12):e0167145, 2016.
- [40] K. Janssen. Murine models of colorectal cancer: studying the role of oncogenic K-Ras. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60:495–506, 2003.
- [41] R. Kalluri and R. Weinberg. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.*, 120(3):1786, 2009.
- [42] S. Kenfield, E. Wei, M. Stampfer, B. Rosner, and G. Colditz. Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. *Tobacco Control*, 17(3):198–204, 2008.
- [43] K. Khan, T. Yap, L. Yan, and D. Cunningham. Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer. *Chin. J. Cancer.*, 32:253–265, 2014.
- [44] P. Khan, A. Manna, S. Saha, S. Mohanty, S. Mukherjee, M. Mazumdar, D. Guha, and T. Das. Aspirin inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and migration of oncogenic k-ras-

- expressing non-small cell lung carcinoma cells by down-regulating e-cadherin repressor slug. *BMC cancer*, 16(1):39, 2016.
- [45] U. Khanzada, O. Pardo, C. Meier, J. Downward, M. Seckl, , and A. Arcaro. Potent inhibition of small-cell lung cancer cell growth by simvastatin reveals selective functions of ras isoforms in growth factor signalling. *Oncogene*, 25(6):877, 2006.
- [46] K. Koera, K. Nakamura, K. Nakao, J. Miyoshi, K. Toyoshima, T. Hatta, H. Otani, A. Aiba, and M. Katsuki. K-Ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene*, 15(10):1151–9, 1997.
- [47] T. Kosaka, Y. Yatabe, H. Endoh, H. Kuwano, T. Takahashi, and T. Mitsudomi. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Research*, 64:8919–8923, 2004.
- [48] O. Kranenburg and W. Moolenaar. Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. *Oncogene*, 20(13):1540–6, 2001.
- [49] S. Leever, B. Vanhaesebroeck, and M. Waterfield. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(2):219–25, 1999.
- [50] P. Liu, C. Morrison, L. Wang, et al. Identification of somatic mutations in non-small cell lung carcinomas using whole exome sequencing. *Carcinogenesis*, 33:1270–6, 2012.
- [51] D. Ma, H. Jia, M. Qin, W. Dai, T. Wang, E. Liang, G. Dong, Z. Wang, Z. Zhang, and F. Feng. MiR-181a-5p inhibits cell proliferation and migration by targeting Kras in non-small cell lung cancer A549 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 47(8):630–8, 2015.
- [52] C. J. Mageean, J. R. Griffiths, D. L. Smith, M. J. Clague, and I. A. Prior. Absolute Quantification of Endogenous Ras Isoform Abundance. *PLoS One*, 10(11):e0142674, 2015.
- [53] C. Magkrioti, N. Oikonomou, E. Kaffe, M.-A. Mouratis, N. Xylourgidis, I. Barbayianni, P. Megadoukas, V. Harokopos, C. Valavanis, and J. Chun. The autotaxin—lysophosphatidic acid axis promotes lung carcinogenesis. *Cancer research*, 78(13):3634–3644, 2018.
- [54] D. Matallanas, D. Romano, F. Al-Mulla, E. O’Neill, W. Al-Ali, P. Crespo, B. Doyle, C. Nixon, O. Sansom, M. Drosten, M. Barbacid, and W. Kolch. Mutant K-Ras activation of the proapoptotic MST2 pathway is antagonized by wild-type K-Ras. *Mol Cell*, 44(6):893–906, 2011.

- [55] G. Maurer, B. Tarkowski, and M. Baccharini. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene*, (30):3477–3488, 2011.
- [56] J. McCubrey, L. Steelman, W. Chappell, S. Abrams, E. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A. Martelli, and R. Franklin. Roles of the Raf/MEK/ERK Pathway in Cell Growth, Malignant Transformation and Drug Resistance. *Biochim Biophys Acta.*, 1773(8):1263–1284, 2007.
- [57] M. McKay and D. Morrison. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, 26:3113–3121, 2016.
- [58] M. Mendoza, E. Er, and J. Blenis. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci.*, 36(6):320–8, 2011.
- [59] M. C. Mendoza, E. E. Er, and J. Blenis. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), 2011.
- [60] H. Nagy-Mignotte, P. Guillem, A. Vesin, A. Toffart, M. Colonna, V. Bonnetterre, P. Brichon, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Lantuejoul, J. Timsit, and D. Moro-Sibilot. Primary lung adenocarcinoma: characteristics by smoking habit and sex. *European Respiratory Journal*, 38:1412–1419, 2011.
- [61] C. Neuzillet, P. Hammel, A. Tijeras-Raballand, A. Couvelard, and E. Raymond. Targeting the ras-erk pathway in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(1-2):147–162, 2013.
- [62] A. Newlaczył. *Isoform-specific Ras expression and signalling*. PhD thesis, University of Liverpool, 2016.
- [63] A. U. Newlaczył, J. M. Coulson, and I. A. Prior. Quantification of spatiotemporal patterns of Ras isoform expression during development. *Scientific Reports*, 7(41297), 2017.
- [64] A. U. Newlaczył, F. E. Hood, and a. A. P. Judy M. Coulson. Decoding Ras isoform and codon-specific signalling. *Biochem Soc Trans.*, 42(4):742–746, 2014.
- [65] R. Nussinov, C. Tsai, and H. Jang. Oncogenic Ras Isoforms Signaling Specificity at the Membrane. *Cancer Res.*, 78(3):593–602, 2018.
- [66] J. Omerovic, D. Hammond, M. Clague, and I. Prior. Ras isoform abundance and signalling in human cancer cell lines. *Oncogene*, 27:2754–2762, 2008.

- [67] J. Omerovic, A. Laude, and I. Prior. Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell. Mol. Life Sci.*, 64:2575 – 2589, 2007.
- [68] C. Pecot, S. Wu, S. Bellister, J. Filant, R. Rupaimoole, T. Hisamatsu, R. Bhattacharya, A. Maharaj, S. Azam, C. Rodriguez-Aguayo, A. Nagaraja, M. Morelli, K. Gharpure, T. Waugh, V. Gonzalez-Villasana, B. Zand, H. Dalton, S. Kopetz, G. Lopez-Berestein, L. Ellis, and A. Sood. Therapeutic silencing of K-Ras using systemically delivered siRNAs. *Mol Cancer Ther.*, 13(12):2876–85, 2014.
- [69] I. Prior, C. Muncke, R. Parton, and J. Hancock. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell. Biol.*, 160:165–170, 2003.
- [70] I. A. Prior and J. F. Hancock. Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 23:145– 153, 2011.
- [71] I. A. Prior, P. D. Lewis, and C. Mattos. A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res*, 72:2457–2467, 2012.
- [72] K. Rajalingam, R. Schreck, U. Rapp, and S. Albert. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et biophysica acta*, 1773:1177–1195, 2007.
- [73] G. J. Riely, J. Marks, and W. Pao. K-Ras Mutations in Non–Small Cell Lung Cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(2):201–205, 2009.
- [74] B. Rotblat, M. Ehrlich, R. Haklai, and Y. Kloog. The Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid (Salirasib) disrupts the spatiotemporal localization of active Ras: a potential treatment for cancer. *Methods Enzymol*, 439:467–489, 2008.
- [75] S. Roy, B. Wyse, and J. Hancock. H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis. *Mol. Cell. Biol.*, 22:5128 – 5140, 2002.
- [76] E. Rozengurt. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol.*, 213(3):589–602, 2007.
- [77] R. P. Sahu, S. Batra, P. K. Kandala, T. L. Brown, and S. K. Srivastava. The role of K-Ras gene mutation in TRAIL-induced apoptosis in pancreatic and lung cancer cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67(2):481–487, 2011.

- [78] C. Sarkisian, B. Keister, D. Stairs, R. Boxer, S. Moody, and L. Chodosh. Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol.*, 9(5):493–505, 2007.
- [79] Schmukler, E, E. Wolfson, Z. Elazar, Y. Kloog, and R. Pinkas-Kramarski. Continuous treatment with FTS confers resistance to apoptosis and affects autophagy. *PLoS One*, 12(2):e0171351, 2017.
- [80] N. J. Schuld, J. S. Vervacke, E. L. Lorimer, N. C. Simon, A. D. Hauser, J. T. Barbieri, M. D. Distefano, and C. L. Williams. The chaperone protein smgGds interacts with small gtpases entering the prenylation pathway by recognizing the last amino acid in the caax motif. *Journal of Biological Chemistry*, 289(10):6862–6876, 2014.
- [81] H. M. Schuller. Mechanisms of smoking related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nature Reviews*, 2:455–463, 2002.
- [82] S. Sengupta, T. R. Peterson, and D. M. Sabatini. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell*, 40(2):310–322, 2010.
- [83] J. Song, M. Takeda, and R. I. Morimoto. Bag1–Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nature Cell Biology*, (3):276–282, 2001.
- [84] T. Sperka, K. J. Geißler, U. Merkel, I. Scholl, I. Rubio, P. Herrlich, and H. L. Morrison. Activation of Ras Requires the ERM-Dependent Link of Actin to the Plasma Membrane. *PLoS One*, 6(11):e27511, 2011.
- [85] A. Stephen, D. Esposito, R. Bagni, and F. McCormick. Dragging Ras Back in the Ring. *Cancer Cell*, 25(3):272–281, 2014.
- [86] M. Stähle, C. Veit, U. Bachfischer, K. Schierling, B. Skripczynski, A. Hall, P. Gierschik, and K. Giehl. Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK. *J. Cell Sci.*, 116:3835–3846, 2005.
- [87] K. Suda, K. Tomizawa, and T. Mitsudomi. Biological and clinical significance of K-Ras mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation. *Cancer Metastasis Rev*, 29(1):49–60, 2010.

- [88] M. Terashima, Y. Togashi, K. Sato, H. Mizuuchi, K. Sakai, K. Suda, Y. Nakamura, E. Banno, H. Hayashi, M. De Velasco, Y. Fujita, S. Tomida, T. Mitsudomi, and K. Nishio. Functional Analyses of Mutations in Receptor Tyrosine Kinase Genes in Non-Small Cell Lung Cancer: Double-Edged Sword of DDR2. *Clin Cancer Res*, 22(14):3663–71, 2016.
- [89] J. Thissen, J. Gross, K. Subramanian, T. Meyer, and P. Casey. Prenylation-dependent association of ki-Ras with microtubules. Evidence for a role in subcellular trafficking. *J. Biol. Chem.*, 272:30362–30370, 1997.
- [90] M. To, R. Rosario, P. Westcott, K. Banta, and A. Balmain. Interactions between wild-type and mutant Ras genes in lung and skin carcinogenesis. *Oncogene.*, 32(34):4028–33, 2013.
- [91] F. D. Tsai, M. S. Lopes, M. Zhou, O. Ponce, J. J. Fiordalisi, J. J. Gierut, A. D. Cox, K. M. Haigis, M. R. Philips, et al. K-ras4a splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3):779–784, 2015.
- [92] D. van der Hoeven and J. F. Hancock. Fendiline Inhibits K-Ras Plasma Membrane Localization and Blocks K-Ras Signal Transmission. *Mol Cell Biol*, 33(2):237, 2013.
- [93] P. Van Schil, A. Sihoe, and W. Travis. Pathologic classification of adenocarcinoma of lung. *J Surg Oncol.*, 108(5):320–6, 2013.
- [94] A. Walsh and D. Bar-Sagi. Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras. *J. Biol. Chem.*, 276:15609–15615, 2001.
- [95] Q. Wang, R. Chaerkady, J. Wu, H. Hwang, N. Papadopoulos, and L. Kopelovich. Mutant proteins as cancer-specific biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108(6):2444–9, 2011.
- [96] B. Weisz, K. Giehl, and Y. Kloog. A new functional Ras antagonist inhibits human pancreatic tumor growth in nude mice. *Oncogene*, 18:2579–2588, 1999.
- [97] J. Weyandt, B. Lampson, S. Tang, M. Mastrodomenico, D. Cardona, and C. Counter. Wild-type Hras suppresses the earliest stages of tumorigenesis in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *PLoS ONE*, 10:e0140253, 2015.
- [98] D. Wheeler, E. Dunn, and P. Harari. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*, 7:493–507, 2010.

- [99] D. Whyte, P. Kirschmeier, T. Hockenberry, I. Nunez-Oliva, L. James, J. Catino, W. Bishop, and J. Pai. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem.*, 272(22):14459–64, 1997.
- [100] D. Woods, D. Parry, H. Cherwinski, E. Bosch, E. Lees, and M. McMahon. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, 17(9):5598–5611, 1997.
- [101] L. Wright and M. Philips. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res*, 47(5):883–91, 2006.
- [102] L. Xiqing, Z. Zunlan, and L. Mingyue. Epidermal growth factor affects the growth and proliferation of non-small cell lung cancer A549 and H23 cells. *Chinese Journal of applied diagnosis and treatment*, 29:562–564, 2015.
- [103] J. Yan, S. Roy, A. Apolloni, A. Lane, and J. Hancock. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 273(•):24052–24056, 1998.
- [104] Y. Yoon, H. Kim, S. Han, D. Oh, S. Im, Y. Bang, and T. Kim. K-Ras mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor dure to AKT or STAT3 activation: implication for combinatorial approach. *Mol Carcinog.*, 4(49):353–62, 2010.
- [105] K. Yoshikawa, E. Tanabe, A. Shibata, S. Inoue, M. Kitayoshi, S. Okimoto, N. Fukushima, and T. Tsujiuchi. Involvement of oncogenic k-ras on cell migration stimulated by lysophosphatidic acid receptor-2 in pancreatic cancer cells. *Experimental cell research*, 319(3):105–112, 2013.
- [106] A. Young, D. Lou, and F. McCormick. Oncogenic and wild-type Ras play divergent roles in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling. *Cancer Discov*, 3(1):112–23, 2013.
- [107] B. Zhou, J. Channing, and D. Adrienne. The role of wild type Ras isoforms in cancer. *Semin Cell Dev Biol.*, 58:60–69, 2016.

A. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift