

Justus-Liebig-Universität Gießen  
Fachbereich 11: Innere Medizin  
Signaltransduktion zellulärer Motilität

**Identifikation der Interaktionsdomäne von Galektin-8  
und K-Ras4B sowie der Einfluss von Galektin-8 auf  
Ras-abhängige Signalwege in Tumorzellen**

---

***Identifying the interaction domain of Galectin-8 and  
K-Ras4B and the influence of Galectin-8 on  
Ras-dependent signal transduction in tumor cells***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.  
der Fakultät für Naturwissenschaften  
der Universität Gießen

angefertigt von:  
Christopher Meinohl  
Gießen, 04.04.2020

Die vorliegende Arbeit wurde an der Professur für Signaltransduktion zellulärer Motilität des Fachbereiches 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von Oktober 2015 bis April 2019 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl angefertigt.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Dammann

Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Klaudia Giehl

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
1. Einleitung.....	1
1.1 Ras-Proteine .....	1
1.1.1 Struktur von Ras-Proteinen.....	1
1.1.2 Posttranslationale Modifikation von Ras-Proteinen .....	3
1.1.3 Lokalisation und Transport von Ras-Proteinen .....	5
1.1.4 Ras-vermittelte Signaltransduktion.....	6
1.1.5 Ras- <i>Signaling</i> an Endomembranen .....	9
1.1.6 Ras-Nanocluster .....	10
1.2 Galektine .....	11
1.2.1 Galektin-8.....	13
1.2.2 Galektin-1 und Galektin-3.....	15
1.2.3 Interaktion von Galektinen mit Ras-Proteinen .....	16
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	17
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Material .....	18
2.1.1 Chemikalien .....	18
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	18
2.1.3 Reagenzien, Marker, Enzyme und molekularbiologische <i>Kits</i> .....	19
2.1.4 Geräte .....	20
2.1.5 Software .....	20
2.1.6 Plasmide .....	21
2.1.7 Oligonukleotide .....	22
2.1.8 siRNA.....	23
2.1.9 Prokaryotische und eukaryotische Zellen.....	23
2.1.10 Antikörper.....	24
2.1.10.1 Primäre Antikörper .....	24
2.1.10.2 Sekundäre Antikörper.....	26
2.1.10.3 Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz .....	26
2.1.11 Rekombinante Proteine.....	27
2.2 Methoden .....	28
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	28

2.2.1.1	Herstellung von <i>Lysogeny Broth</i> (LB)-Medium nach Miller.....	28
2.2.1.2	Antibiotika versetztes LB-Medium bzw. LB-Agar-Medium zur Selektion transformierter Bakterien.....	28
2.2.1.3	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Bakterien.....	28
2.2.1.4	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> Bakterien.....	29
2.2.1.5	Kultivierung der transformierten <i>Escherichia coli</i> in LB-Medium.....	30
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	30
2.2.2.2	Spaltung der DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen.....	30
2.2.2.3	Dephosphorylierung von 5' Phosphatgruppen.....	31
2.2.2.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
2.2.2.5	<i>In vitro</i> -Mutagenese.....	31
2.2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion.....	32
2.2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	32
2.2.2.8	DNA-Aufreinigung.....	33
2.2.2.9	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	33
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	33
2.2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	33
2.2.3.2	Bestimmung der Zellzahl unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer.....	35
2.2.3.3	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit PEI.....	35
2.2.3.4	siRNA Transfektion von PANC-1-Zellen mit DMRIE-C bzw. Lipofectamine 2000.....	35
2.2.3.5	siRNA Transfektion von Colo699-Zellen mit DharmaFECT 1.....	36
2.2.3.6	Migrationsassay.....	37
2.2.3.7	Proliferationsassay.....	37
2.2.3.8	Transfektion von Sf9-Zellen mit Baculovirus DNA.....	38
2.2.3.9	Amplifikation von Baculoviren.....	38
2.2.3.10	Behandlung von H5-Insektenzellen mit Baculovirus-haltigem Überstand.....	38
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	39
2.2.4.1	Herstellung von Proteinlysaten.....	39
2.2.4.2	Präparation von partikulären und löslichen Proteinen.....	40
2.2.4.3	Proteinbestimmung mittels des <i>BCA Protein Assays</i> .....	40
2.2.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	41
2.2.4.5	Coomassie-Blau Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	42
2.2.4.6	Western Blot.....	43
2.2.4.7	Detektion von Proteinen mit spezifischen primären Antikörpern.....	44
2.2.4.8	Nachweis der primären Antikörper mittels sekundärer Antikörper....	44

2.2.4.9	Ras-Aktivitätsassay .....	45
2.2.4.10	Ko-Immunopräzipitation und <i>in vitro</i> -Interaktionsstudien unter Verwendung des <i>μMacs Isolation Kits</i> .....	45
2.2.4.11	Aufreinigung von His-getaggten Proteinen unter Verwendung von Nickel-NTA Agarose .....	47
2.2.4.12	Dot-Blot .....	49
2.2.4.13	Immunfluoreszenz .....	49
2.2.5	Datenanalyse und Statistik .....	50
2.2.5.1	Densitometrische Bestimmungen .....	51
2.2.5.2	Aminosäuresequenz-Analyse .....	51
2.2.5.3	Auswertung von Migrationsassays .....	51
2.2.5.4	Auswertung von Proliferationsassays .....	52
2.2.5.5	Auswertung von Immunfluoreszenz-Aufnahmen .....	52
3.	Ergebnisse .....	53
3.1	Interaktionsstudien von Ras und Gal-8 .....	53
3.1.1	Erzeugung von Gal-8-Mutanten .....	53
3.1.2	Erzeugung von Ras-Mutanten .....	53
3.1.3	<i>In vitro</i> -Interaktion von EGFP-Ras und endogenen Galektinen aus PANC-1-Proteinlysaten .....	55
3.1.4	Ko-Immunopräzipitation von endogenem K-Ras und Gal-8 in PANC-1-Zellen .....	57
3.1.5	Nachweis der Interaktion von K-Ras und Gal-8 mittels Dot-Blot .....	59
3.1.5.1	Nachweis und Konzentrationsbestimmung von His-K-Ras(G12V) und His-Gal-8 <i>long</i> .....	60
3.1.5.2	Dot-Blot .....	62
3.1.6	<i>In vitro</i> -Interaktion von EGFP-Ras und Gal-8-Mutanten .....	63
3.1.7	Abhängigkeit der Interaktion zwischen K-Ras und Gal-8 vom gebundenen Guaninnukleotid .....	65
3.1.8	Abhängigkeit der K-Ras/Gal-8 Interaktion von der posttranslationalen Prenylierung von K-Ras .....	67
3.1.9	Interaktion von Ras-Lysin-Mutanten mit Galektinen .....	68
3.1.9.1	Interaktion von Ras-Lysin-Mutanten mit Gal-8 .....	69
3.1.9.2	Interaktion von Ras-Lysin-Mutanten mit Gal-1 .....	71
3.1.10	Interaktion von Mutanten der polybasischen Domäne von K-Ras mit Gal-8 .....	72
3.1.11	Interaktion von Gal-8 mit Rho-GTPasen .....	73
3.1.12	Zusammenfassung der Ergebnisse der Interaktionsstudien von Ras und Gal-8 .....	75
3.2	Einfluss von Gal-8 auf den Ras/Raf/MEK/ERK und PI3K/Akt-Signalweg in PANC-1- und Colo699-Zellen .....	76

3.2.1	Die Depletion von Gal-8 führt zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2.....	76
3.2.2	Die Depletion von Gal-8 beeinflusst die Proteinmenge von EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1-Zellen .....	78
3.2.2.1	Beeinflussung der Expression von EGFP-K-Ras(G12V) nach Depletion von Gal-8 in PANC-1-Zellen.....	78
3.2.2.2	Subzelluläre Lokalisation und Aktivität von EGFP-K-Ras(G12V) nach Depletion von Gal-8 in PANC-1-Zellen.....	79
3.2.2.3	Einfluss einer Gal-8-Depletion auf den proteasomalen Abbau von EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1-Zellen .....	81
3.2.3	Die Depletion von Gal-8 inhibiert die Expression und die Phosphorylierung von Akt .....	83
3.2.4	Der <i>knockdown</i> von Gal-8 inhibiert die Proteinexpression von Akt2 .....	84
3.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Gal-8 auf den Ras/Raf/MEK/ERK- und den PI3K-Akt-Signalweg .....	85
3.3	Einfluss von Gal-8 auf die Migration und Proliferation von PANC-1- und Colo699-Zellen.....	86
3.3.1	Effekt der Depletion von Gal-8 auf die Migration von PANC-1 und Colo699-Zellen .....	86
3.3.2	Effekt der Depletion von Gal-8 auf die Proliferation von PANC-1-Zellen.....	87
3.4	Lokalisation von Gal-8 in PANC-1-Zellen.....	89
3.4.1	Analyse der Lokalisation von Gal-8 und K-Ras in PANC-1-Zellen .....	89
3.4.2	Analyse der Lokalisation von Gal-8 und Rab5, Rab7 sowie Rab11 in PANC-1-Zellen .....	91
4.	Diskussion .....	96
4.1	Interaktionsstudien von Gal-8 und K-Ras.....	96
4.1.1	<i>In vitro</i> -Interaktionsstudien von Gal-8 und K-Ras.....	96
4.1.2	Interaktionsstudien von Gal-8 und K-Ras in der Zelle .....	98
4.1.3	Eingrenzung der Interaktionsdomäne in Gal-8 .....	99
4.1.4	Eingrenzung der Interaktionsdomäne von K-Ras.....	102
4.1.5	<i>In vitro</i> Interaktionsstudien von Gal-8 und weiteren GTPasen .....	106
4.2	Bedeutung von Gal-8 im Ras/Raf/MEK/ERK- und im PI3K/Akt-Signalweg ..	107
4.2.1	Die Depletion von Gal-8 führt zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 bei gleichzeitiger Zunahme der EGFP-K-Ras(G12V)-Proteinmenge.....	108
4.2.2	Potentielle Beteiligung von Gal-8 an der Proteasom-vermittelten Degradation von K-Ras.....	109
4.2.3	Die Depletion von Gal-8 führt zu einer Reduktion der Akt-Proteinmenge ...	109
4.3	Bedeutung von Gal-8 für die Migration und die Proliferation in PANC-1-Zellen und Colo699-Zellen .....	111
4.4	Lokalisation von Gal-8 in PANC-1-Zellen.....	112

---

4.5 Therapeutische Einsatzmöglichkeiten .....	113
5. Zusammenfassung .....	116
6. Summary .....	118
7. Literatur .....	120
8. Anhang .....	127
8.1 Plasmide .....	127
8.1.1 pCGN/HA-N-CRD- <i>hinge</i> .....	127
8.1.2 pCGN/HA-C-CRD- <i>hinge</i> .....	128
8.1.3 pVL1393/His-Galectin-8 <i>long</i> .....	129
8.1.4 pEGFP-C3/K-Ras(G12V) .....	130
8.1.5 pEGFP-C3/HA-H-Ras(G12V).....	131
8.1.6 pEGFP-C3/HA-N-Ras(G12V).....	132
8.1.7 pVL1393/His-K-Ras(G12V).....	133
8.2 Ergänzende Abbildungen .....	134
8.2.1 Einfluss des Gal-8- <i>knockdowns</i> auf den Proteingehalt von endogenem K-Ras.....	134
8.3 Rohdaten .....	134
9. Curriculum Vitae .....	135
10. Publikationen, Konferenzbeiträge und Auszeichnungen .....	136
11. Danksagung .....	137
12. Selbstständigkeitserklärung.....	138

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Struktur von Ras-Proteinen.....	3
Abb. 1.2: Der Ras/Raf/MEK/ERK und der PI3K/Akt Signalweg.....	8
Abb. 1.3: Struktureller Aufbau von Gal-8.....	14
Abb. 3.1: Struktureller Aufbau von Gal-8 und Übersicht über die verwendeten Gal-8-Mutanten.....	53
Abb. 3.2: Darstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Ras-Mutanten .....	54
Abb. 3.3: <i>In vitro</i> -Interaktion von EGFP-Ras und endogenen Galektinen. ....	56
Abb. 3.4: Ko-Immunopräzipitation von Ras-Proteinen und Gal-8 aus PANC-1-Lysaten.....	59
Abb. 3.5: Nachweis und Konzentrationsbestimmung der gereinigten His-K-Ras(G12V)- und His-Gal-8 <i>long</i> -Proteinen.....	61
Abb. 3.6: Dot-Blot zur Analyse der direkten Interaktion zwischen K-Ras und Gal-8..	63
Abb. 3.7: <i>In vitro</i> -Interaktion von EGFP-Ras und Gal-8-Mutanten.....	65
Abb. 3.8: Abhängigkeit der K-Ras/Gal-8 Interaktion von der Guaninnukleotid-Bindung.....	67
Abb. 3.9: Abhängigkeit der K-Ras/Gal-8 Interaktion von der posttranslationalen Prenylierung von Ras.....	68
Abb. 3.10: Interaktion von Ras und Gal-8 in Abhängigkeit von der Farnesyldomäne von Ras. ....	70
Abb. 3.11: Interaktion von Ras-Lysin-Mutanten mit Gal-1. ....	71
Abb. 3.12: Mutanten der polybasischen Domäne von K-Ras in Interaktion mit Gal-8. ....	72
Abb. 3.13: Interaktion von Gal-8 mit weiteren GTPasen. ....	74
Abb. 3.14: Einfluss der Gal-8 Depletion auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in PANC-1- und Colo699-Zellen.....	77
Abb. 3.15: Beeinflussung der Expression von EGFP-K-Ras(G12V) nach Gal-8-Depletion in PANC-1-Zellen. ....	79
Abb. 3.16: Subzelluläre Lokalisation und Aktivität von EGFP-K-Ras(G12V) nach Gal-8-Depletion in PANC-1-Zellen.....	81
Abb. 3.17: Depletion von Gal-8 in Kombination mit der Inhibition des Proteasoms führt zu einem Anstieg von EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1-Zellen.....	82
Abb. 3.18: Die Depletion von Gal-8 inhibiert die Expression und die Phosphorylierung von Akt. ....	83
Abb. 3.19: Die Depletion von Gal-8 inhibiert Akt2. ....	84
Abb. 3.20: Effekt der Depletion von Gal-8 auf die Migration von PANC-1 und Colo699-Zellen. ....	87
Abb. 3.21: Effekt des Gal-8- <i>knockdowns</i> auf die Proliferation von PANC-1-Zellen. ...	88
Abb. 3.22: Analyse der Lokalisation von Gal-8 und K-Ras in PANC-1-Zellen. ....	90
Abb. 3.23: Analyse der Lokalisation von Gal-8 und Rab5 in PANC-1-Zellen. ....	92
Abb. 3.24: Analyse der Lokalisation von Gal-8 und Rab7 in PANC-1-Zellen. ....	93



Abb. 3.25: Analyse der Lokalisation von Gal-8 und Rab11 in PANC-1-Zellen.....	94
Abb. 4.1: Darstellung von zwei potentiellen Prenyl-bindenden Taschen innerhalb der N-terminalen Domäne von Gal-8.....	101
Abb. 4.2: Modell der Farnesyl-Bindungstasche der N-terminalen CRD von Gal-8. .	101
Abb. 4.3: Die hydrophobe Bindungstasche von Gal-1.....	105
Abb. 8.1: Das Plasmid pCGN/HA-N-CRD- <i>hinge</i> . ....	127
Abb. 8.2: Das Plasmid pCGN/HA-C-CRD- <i>hinge</i> . ....	128
Abb. 8.3: Das Plasmid pVL1393/His-Galectin-8 <i>long</i> . ....	129
Abb. 8.4: Das pEGFP-C3/K-Ras(G12V) Plasmid. ....	130
Abb. 8.5: Das Plasmid pEGFP-C3/HA-H-Ras(G12V).....	131
Abb. 8.6: Das Plasmid pEGFP-C3/HA-N-Ras(G12V).....	132
Abb. 8.7: Das Plasmid pVL1393/His-K-Ras(G12V).....	133
Abb. 8.8: Einfluss des Gal-8- <i>knockdowns</i> auf den Proteingehalt von endogenem K-Ras. ....	134

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der Expression von Galektin-1, -3 und -8 in Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien .....	13
Tab. 2: Verwendete Chemikalien. ....	18
Tab. 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien. ....	18
Tab. 4: Verwendete Reagenzien, Marker, Enzyme und molekularbiologische Kits... ..	19
Tab. 5: Verwendete Geräte. ....	20
Tab. 6: Verwendete Software. ....	20
Tab. 7: Verwendete Plasmide. ....	21
Tab. 8: Primer, die in dieser Arbeit für <i>in vitro</i> Mutagenese verwendet wurden.....	22
Tab. 9: Primer, die in dieser Arbeit für PCR verwendet wurden. ....	22
Tab. 10: Übersicht über die verwendeten siRNAs.....	23
Tab. 11: Übersicht über die verwendeten <i>E. coli</i> Stämme.....	23
Tab. 12: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien. ....	24
Tab. 13: Verwendete Primärantikörper.....	24
Tab. 14: Verwendete Sekundärantikörper angesetzt in TBS.....	26
Tab. 15: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz in PBS-CMF ...	26
Tab. 16: Verwendete rekombinante und kommerziell erworbene Proteine. ....	27
Tab. 17: Pipettierschema für siRNA Transfektionen in PANC-1 unter Verwendung von DMRIE-C.....	36
Tab. 18: Pipettierschema für siRNA Transfektionen in PANC-1 unter Verwendung von Lipofectamine 2000.....	36
Tab. 19: Pipettierschema für siRNA Transfektionen in Colo699 unter Verwendung von DharmaFECT 1.....	37
Tab. 20: Zusammensetzung des Polyacrylamidtrenn- und Sammelgels.....	42
Tab. 21: Verwendete Aminosäuresequenzen und deren UniProtKB-Nummer.....	51

## Abkürzungsverzeichnis

APT	<i>acyl protein transferase</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
C	Cystein (im Aminosäuren Ein-Buchstabencode)
C-CRD	C-terminale <i>carbohydrate recognition domain</i>
cDNA	kodierende DNA
CMF-PBS	Calcium- und Magnesium-freie Phosphat-gepufferte Saline
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i> / carbohydrat-bindende Domäne
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DHHC9-GPC16	<i>DHHC domain-containing 9-Golgi complex associated protein of 16 kDa</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTase	Farnesyltransferase
FTI	Farnesyltransferase Inhibitor
FTS	<i>farnesyl thiosalicylic acid</i>
g	Erdbeschleunigung (9.81 m s <sup>-2</sup> )
Gal-1	Galektin-1
Gal-3	Galektin-3
Gal-8	Galektin-8
Gal-8l	Galektin-8 <i>long</i>
Gal-8s	Galektin-8 <i>short</i>
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GST-RBD	Glutathion-S-Transferase gekoppelt an <i>Ras binding domain</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H5	<i>Trichoplusia ni</i> High-Five™
HeLa-Zellen	Henrietta Lacks-Zellen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HVR	Hypervariable Region
ICMT	Isoprenylcysteinocarboxylmethyltransferase
K	Lysin (im Aminosäuren Ein-Buchstabencode)

Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth</i> -Medium
M	molar (mol pro Liter)
m/V	Masse pro Volumen
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
N-CRD	N-terminale <i>carbohydrate recognition domain</i>
NDP52	<i>Nuclear dot protein 52 kDa</i>
NEB	New England Biolabs GmbH
nm	Nanometer
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i> , nichtkleinzellige Lungenkarzinome
o. Ä.	oder Ähnliches
PA	Phosphatidsäure
PAT	<i>palmitoyl acyl transferase</i>
PBD	polybaische Domäne
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCTA-1	<i>prostate carcinoma tumor antigen-1</i>
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PDB	<i>Protein Database</i> , Website: <a href="https://www.rcsb.org/">https://www.rcsb.org/</a>
PDE6 $\delta$	Phosphodiesterase Typ 6 $\delta$
PEI	Polyethylenimin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat
PtdSer	Phosphatidylserin
RBD	<i>Ras binding domain</i>
RCE1	<i>Ras-converting-enzyme 1</i>
Rho-GDI	<i>Rho-Protein GDP dissociation factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SD	<i>standard deviation</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
SOS	<i>son-of-sevenless</i>
U	<i>units</i>
ü. N.	über Nacht
V	Volt
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

# 1. Einleitung

## 1.1 Ras-Proteine

Die Ras-Superfamilie umfasst mehr als 150 kleine GTP-bindende Proteine, die in sechs Unterfamilien kategorisiert werden: Ras, Rho, Arf, Rab, Ran und Rad [1]. Die drei ubiquitär exprimierten Ras-Gene (*K-Ras*, *H-Ras* und *N-Ras*) codieren für die Ras-Proteine H-Ras, N-Ras und für die zwei Spleißvarianten K-Ras4A und K-Ras4B. Ras-Proteine können sich in einem aktiven GTP-gebundenen Zustand und in einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand befinden. Extrazelluläre Stimuli aktivieren Rezeptoren, wie zum Beispiel Rezeptortyrosinkinasen (RTK) oder G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR), welche daraufhin verschiedene Proteine aktivieren, die zu den sogenannten Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) gehören und für den Austausch von gebundenem GDP zu GTP verantwortlich sind [2]. Das aktive GTP-gebundene Ras-Protein vermittelt an der Plasmamembran eine Aktivierung von *downstream*-Proteinen verschiedenster Signalwege, die unter anderem Prozesse wie Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Transformation beeinflussen [3, 4]. GTPase-aktivierende-Proteine (GAPs) sorgen im Anschluss für die Stimulation der intrinsischen GTPase-Aktivität von Ras, was letztlich zur Hydrolyse des GTP und somit zum inaktiven GDP-gebundenen Zustand von Ras führt [5]. Die intrinsische GTPase Aktivität von Ras liegt in vielen bekannten Ras-Mutanten (Mutationen im Codon 12, 13 oder 61) stark reduziert vor, sodass Ras nicht mehr in den inaktiven GDP-gebundenen Zustand übergehen kann. Diese Punktmutationen von Ras finden sich in vielen humanen Krebsarten, unter anderem im Pankreaskarzinom. Dort liegt die G12V-Mutation von K-Ras mit einer Abundanz von 90 % vor [6]. Dies bedeutet, dass ein Großteil der Ras-Proteine im GTP-gebundenen Zustand an der Plasmamembran verbleibt und dort unkontrolliert *downstream*-Proteine verschiedenster Signalwege aktiviert. Diese Tatsache begünstigt in manchen Zellarten die oben genannten Prozesse, wie zum Beispiel Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Transformation [3, 4]. Es sei erwähnt, dass soweit nicht anders gekennzeichnet im Folgenden die Bezeichnung K-Ras mit der Isoform K-Ras4B gleichgesetzt wurde.

### 1.1.1 Struktur von Ras-Proteinen

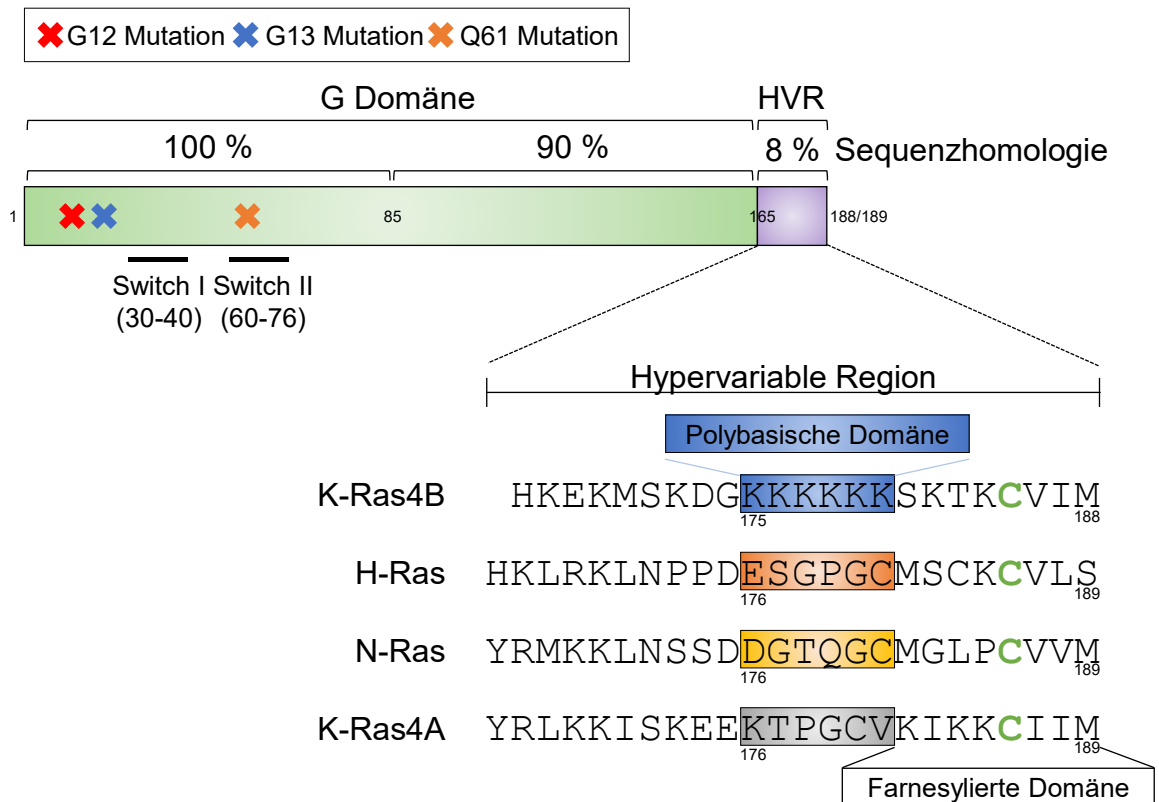
Die vier Ras-Proteine H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B besitzen eine Länge von 188 bzw. 189 Aminosäuren (Abb. 1.1). Die ersten 85 Aminosäuren der einzelnen Ras-

Proteine verfügen über eine Homologie von 100 %, während die Aminosäuren 85-165 nur noch eine Homologie von ungefähr 90 % aufweisen. Diese sogenannte G-Domäne (Aminosäuren 1-165) ist aus sechs  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufgebaut, welche von fünf  $\alpha$ -Helices umgeben wird [7]. Die letzten 23 bzw. 24 Aminosäuren weisen nur noch eine Sequenzhomologie von 8 % auf, weswegen diese Region auch als hypervariable Region (HVR) bezeichnet wird [8].

Innerhalb der G-Domäne sind zwei sogenannten *Switch*-Regionen (*Switch*-I: Aminosäure 30-40; *Switch*-II: Aminosäure 60-76) vorhanden, die eine erhöhte Flexibilität aufweisen, sodass eine Konformationsänderung des Ras-Proteins auftritt, je nachdem, ob Ras im GDP- oder GTP-gebundenem Zustand vorliegt. Ein aktiver Austausch von GDP zu GTP wird über GEFs vermittelt. GEFs interagieren mit der *Switch*-II- und einer *P-loop*-Struktur und führen aufgrund der Flexibilität der *Switch*-II-Struktur zur Öffnung der GDP-bindenden Tasche. Daraus folgt ein Austausch des GDP zu einem GTP, da innerhalb der Zelle die Konzentration an GTP zehnfach höher ist, als die des GDP [3]. Die *P-loop*-Struktur sorgt für die Stabilität des Sauerstoffatoms des  $\gamma$ -Phosphates von GTP, sodass Ras im GTP-gebundenen Zustand aufgrund der Konformationsänderung über spezifische Aminosäure-domänen mit *downstream*-Effektorproteinen interagiert und die Signaltransduktionskaskade aktiviert wird [9]. GAPs sorgen im Anschluss für eine beschleunigte intrinsische Hydrolyse des GTP zu GDP [5].

Mutationen innerhalb der G-Domäne von Ras-Proteinen treten häufig auf. Die bekanntesten Mutationen finden sich an den Aminosäuren G12, G13 und Q61 [3]. Eine der häufigsten Mutationen ist die G12V-Mutation, die in allen drei Ras-Isoformen nachgewiesen werden konnte. Diese führt dazu, dass die GAP-vermittelte Hydrolyse von GTP nicht stattfinden kann, sodass Ras im GTP-gebundenen und somit aktiven Zustand verbleibt, was zu schwerwiegenden Fehlregulationen in diversen Signalwegen führt [10].

Am C-Terminus der Ras-Aminosäuresequenz befindet sich die HVR, welche in einem CAAX-Motiv endet. Das Cystein dieses Motivs ist essentiell für die posttranslationale Modifikation von Ras, welche im folgenden Kapitel genauer beschrieben. Eine weitere strukturelle Domäne stellt die polybasische Domäne (PBD) dar, welche nur in K-Ras4B zu finden ist und aus sechs aufeinanderfolgenden Lysinen (Einbuchstaben-code: K) besteht. Innerhalb der C-terminalen Aminosäuresequenz von H- und N-Ras finden sich statt der Lysine weitere Cysteine, welche posttranslational modifiziert werden können [11].



**Abb. 1.1: Struktur von Ras-Proteinen.** Ras-Proteine bestehen aus einer hochkonservierten G-Domäne und einer hypervariablen Region (HVR) am C-Terminus, welche eine Aminosäuren-Sequenzhomologie von nur 8 % aufweist. Die HVR zeichnet sich durch eine polybasische und eine farnesylierte Domäne aus. Für letztere ist das CAAX-Motiv, bestehend aus den letzten vier Aminosäuren eines jeden Ras-Proteins, essentiell. Innerhalb der G-Domäne finden sich zwei Switch-Regionen, die durch ihre Flexibilität nach Interaktion mit GEFs für einen Austausch von GDP zu GTP sorgt, sodass Ras im aktiven Zustand vorliegt. Durch häufig auftretende Mutationen, wie zum Beispiel der G12V Mutation, ist ein Übergang von einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand in einen inaktiven, GDP-gebundenen Zustand nicht mehr möglich, da die Öffnung der Switch-I-Region beeinträchtigt ist (verändert nach [8]).

### 1.1.2 Posttranslationale Modifikation von Ras-Proteinen

Nach Genexpression und Translation der Ras-Proteine werden diese in mehreren Schritten posttranslational modifiziert. Der C-Terminus der Ras-Proteine endet mit einem CAAX-Motiv, wobei C die Aminosäure Cystein, A eine aliphatische Aminosäure und X eine beliebige Aminosäure darstellt. Abhängig von der letzten Aminosäure des CAAX-Motivs findet entweder eine Bindung der cytosolischen Farnesyltransferase (FTase, bei X=S oder M) oder eine Bindung der Geranylgeranyltransferase 1 (GGTase, bei X=L) statt. Eine 15-Kohlenstoff Farnesyl- bzw. eine 20-Kohlenstoff Geranylgeranylgruppe wird über eine Thioether-Bindung an das Cystein des CAAX-Motivs angehängt [12]. Studien, die einen Farnesyltransferase-Inhibitor einsetzen, haben belegt, dass Ras-Proteine, die in einem Serin oder einem Methionin terminieren und

somit ein klassisches Farnesyltransferase-Substrat darstellen, unter Umständen auch posttranslational geranylgeranyliert werden können [13]. Farnesyliertes Ras akkumuliert an der cytosolischen Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums (ER) [14] und wird dort vom *Ras-converting-enzyme 1* (RCE1) weiter modifiziert. Die RCE1 entfernt die letzten drei Aminosäuren des CAAX-Motivs durch eine carboxyl-terminale Proteolyse [15]. Ras verbleibt weiterhin am ER. Dort wird eine Methyl-Gruppe mittels Veresterung an der  $\alpha$ -carboxyl-Gruppe des farnesylierten Cysteins angebracht. Diese Reaktion wird durch das Enzym Isoprenylcysteinylmethyltransferase (ICMT) katalysiert [16]. Durch die beschriebenen Modifikationen ändert sich die hydrophile Eigenschaft des C-Terminus der Ras-Proteine in eine hydrophobe. Über diesen hydrophoben C-Terminus ist z.B. eine Lokalisation von Ras an der Plasmamembran möglich, die von entscheidender Bedeutung für viele Signaltransduktionsprozesse ist [16]. Die Farnesylierung alleine resultiert allerdings nur in einer schwachen Membranbindungskapazität, sodass die Farnesylierung nur im Zusammenspiel mit sogenannten *second signals* die korrekte intrazelluläre Lokalisation der Ras-Proteine ermöglicht. Für K-Ras4B ist das *second signal* eine aus sechs Lysinen bestehende Aminosäureabfolge, die als polybasische Domäne (PBD) bezeichnet wird (Abb. 1.1). Zusätzlich befinden sich in unmittelbarer Nähe zwei weitere Lysine, sodass insgesamt acht Lysine innerhalb der HVR von K-Ras4B vorhanden sind. Aufgrund der positiven Ladungseigenschaft der Lysine findet eine elektrostatische Interaktion mit den negativ-geladenen Kopfgruppen der Phosphatidylserinen an der inneren Seite der Plasmamembran statt [17]. Die Farnesylierung, zusammen mit den positiv-geladenen Lysinen, resultiert in einer ausreichend starken Affinität von K-Ras4B an Lipidmembranen [18]. Die weiteren Ras-Isoformen werden in Form von Palmitoylierung über Palmitoylacyltransferasen (PAT) posttranslational modifiziert. Die PAT *DHHC domain-containing 9-Golgi complex associated protein of 16 kDa* (DHHC9-GPC16) wurde als bislang einziges Enzym identifiziert, welches H-, N- und K-Ras4A an der cytosolischen Oberfläche des Golgi-Apparates palmitoyliert. Die zwei Cysteine in H-Ras (Position 181 und 184, C181 und C184) bzw. ein Cystein in N-Ras (Position 181, C181) und in K-Ras4A (Position 180, C180), welche *upstream* des farnesylierten Cysteins liegen, können palmitoyliert vorliegen. Die Cysteine des H-Ras stellen den Sonderfall dar, dass entweder das Cystein an Position 181 oder an Position 184 palmitoyliert werden oder beide Cysteine [17]. Obwohl DHHC9-GPC16 die bislang einzig identifizierte PAT von Ras-Proteinen ist, führte ein *knockdown* von DHHC9-GPC16 nicht zu einer Mislokalisierung oder einem



Ausbleiben der Palmitoylierung der Ras-Proteine [19]. Die Palmitoylierung von Ras-Proteinen ist durch zelluläre Acylproteinthioesterasen (APTs) reversibel. Die Regulation der Depalmitoylierung von Ras-Proteinen erfolgt über APT1 und APT2 [20], sowie über die kürzlich identifizierte ABHD17A [21]. Dies resultiert in einen nicht-vesikulären Austausch von H- und N-Ras von der Plasmamembran zu Endomembranen, dem ER oder dem Golgi, wo sie über PATs erneut palmitoyliert werden können [22].

### 1.1.3 Lokalisation und Transport von Ras-Proteinen

Nach Palmitoylierung besitzen H- und N-Ras eine etwa 100-fach höhere Membranaffinität, sodass diese an der zytosolischen Oberfläche der Membran des Golgi akkumuliert vorliegen. Von dort werden H-Ras und N-Ras mittels klassischem vesikulärem Transport zu Endomembranen oder direkt zur Plasmamembran transportiert [23]. Studien zeigten, dass die Palmitoylierung von H- und N-Ras an C181 ausreichend ist, um über den klassischen vesikulären Transport zur Plasmamembran transportiert zu werden. Die weitere Palmitoylierung von H-Ras an C184 spielt keine Rolle für den Transport zur Plasmamembran, ist aber für die korrekte laterale Segregation von H-Ras im GTP-gebundenen Zustand notwendig (s. Kap. 1.1.6) [24]. Die Palmitoylierung von K-Ras4A ist nicht notwendig für eine korrekte Lokalisation an der Plasmamembran, da Lysine, ähnlich wie bei K-Ras4B, eine stabile elektrostatische Interaktion zwischen K-Ras4A und den negativ-geladenen Kopfgruppen der Phospholipide an der Plasmamembran ermöglichen [25].

Der Transport von posttranslational farnesylierten K-Ras4B zur Plasmamembran konnte bislang nicht vollständig charakterisiert werden. Für andere posttranslational modifizierte Proteine, wie zum Beispiel die Rho-Proteine, welche posttranslational geranylgeranyliert werden, wurden sogenannte RhoGDIs (*Rho-Protein GDP dissociation inhibitor*) identifiziert und charakterisiert, welche den Transport der Rho-GTPasen vom Golgi zur Plasmamembran regulieren können [26]. Weiterhin können RhoGDIs aufgrund einer prenyl-bindenden Tasche die hydrophobe Geranylgeranyl-Gruppe am terminalen Cystein von Rho-Proteinen binden [27] und somit einen Verbleib von Rho im Zytoplasma ermöglichen [26]. Auf Basis dieses Wissens wurden für Ras ebenfalls prenyl-bindende Proteine beschrieben, wie zum Beispiel VPS35, PRA1 und SmgGDS [28–30]. Das bekannteste Protein, welches in der Lage ist, die Prenylierung von Ras zu binden, ist die Phosphodiesterase Type 6 $\delta$  (PDE6 $\delta$ ). Die Kristallstruktur der PDE6 $\delta$  zeigt eine strukturelle Homologie zur prenyl-bindenden Tasche von RhoGDI, welche

zwischen zwei  $\beta$ -Faltblattstrukturen gelegen ist. Dies ermöglicht die Interaktion zwischen PDE6 $\delta$  und K-Ras4B in der Zelle und den Transport zur Plasmamembran. Die Interaktion ist dabei unabhängig vom gebundenen Guaninnukleotid [31]. Ein *knock-down* oder eine Inhibition von PDE6 $\delta$  durch siRNA bzw. dem PDE6 $\delta$ -Inhibitor Delta-rasin führt zu einer fehlerhaften Lokalisation von K-Ras4B von der Plasmamembran Richtung Zytoplasma [22]. Kontroverserweise sind *PDE6 $\delta$ -knockdown* Mäuse lebensfähig und fertil [32], während ein *KRAS-knockdown* in Mäusen embryonal tödlich ist [33].

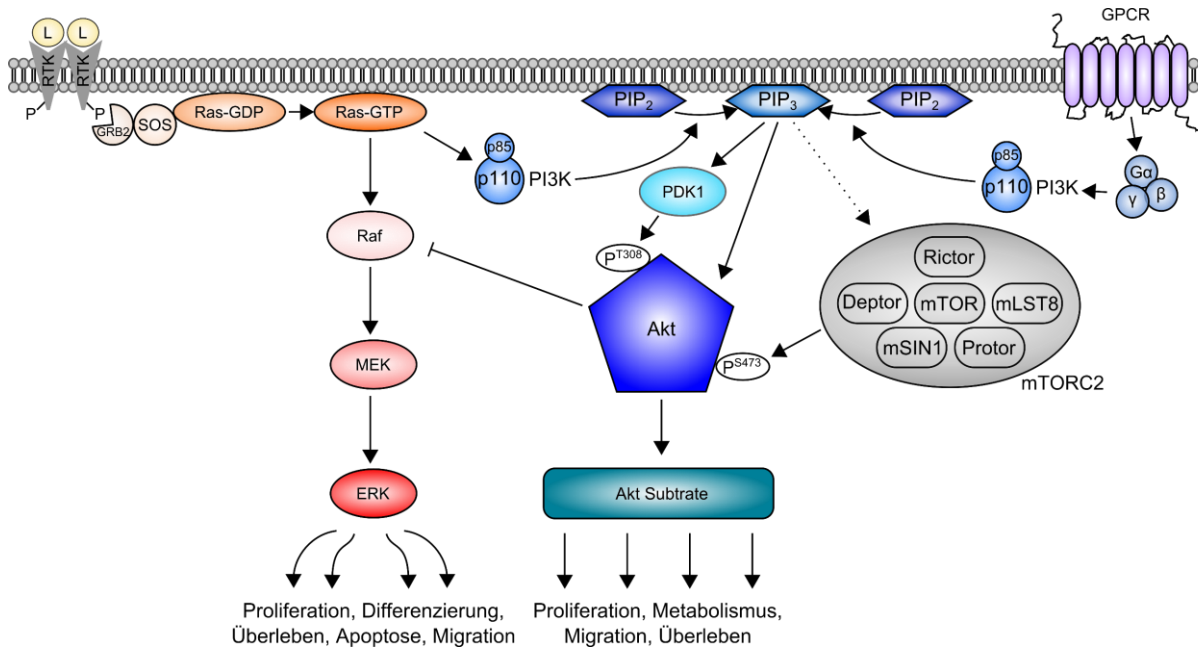
K-Ras4B wird durch Endozytose, spontane Dissoziation, Phosphorylierung oder über einen Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin abhängigen Signalweg von der Plasmamembran gelöst [34]. Abgelöst von der Plasmamembran interagiert K-Ras4B im Zytoplasma erneut mit PDE6 $\delta$ . Zusätzlich dazu wird die GTP-gebundene Arf-like 2 (Arl2) rekrutiert, welche den Komplex aus K-Ras4B/ PDE6 $\delta$ /Arl2 zur negativ-geladenen Membran der *Recycling*-Endosomen dirigiert. Von diesen kann K-Ras4B über einen vesikulären Transport zurück an die Plasmamembran geführt werden [35].

#### 1.1.4 Ras-vermittelte Signaltransduktion

Liegt Ras an der Plasmamembran gebunden vor, kann es durch extrazelluläre Stimuli aktiviert werden. Diese können Wachstumsfaktoren, Cytokine, Hormone, Stressfaktoren und Neurotransmitter sein, die Rezeptoren wie RTKs, GPCRs, Cytokinrezeptoren und Integrine binden [36]. Der bekannteste und am besten analysierte Ras-vermittelte Signaltransduktionsweg ist der Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) Signalweg (Abb. 1.2, linker Teil, rot/orange). In diesem werden Rezeptortyrosinkinasen, wie der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), von extrazellulären Liganden, wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), stimuliert. Die Bindung von EGF an den EGFR aktiviert die intrinsische Kinaseaktivität auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors. Dies führt zu einer Autophosphorylierung des EGFR, die von einer SH2 Domäne innerhalb eines GRB2-*docking*-Proteins erkannt und gebunden wird. GRB2 rekrutiert den GEF *Son of Sevenless* (SOS). Dies führt zur Aktivierung von SOS, welches das GDP-gebundene und somit inaktive Ras durch Austausch von GDP zu GTP aktiviert [37]. Dies resultiert in einer Konformationsänderungen innerhalb von Ras, sodass eine hochaffine Interaktion mit Effektorproteinen, wie zum Beispiel Raf, ermöglicht wird. Das aktive, GTP-gebundene Ras interagiert mit dem Effektorprotein Raf über eine der beiden *Ras binding domains* (RBD) von Raf und aktiviert dieses [38]. Dadurch ist die Raf-

Kinase in der Lage MEK1/2 zu phosphorylieren. Die Aktivierung von MEKs führt wiederum zur Phosphorylierung von ERK1/2. Die phosphorylierte MAPK ERK1/2 kann nun eine Vielzahl von *downstream*-Zielproteinen aktivieren oder Transkriptionsfaktoren beeinflussen, sodass Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben, Apoptose und Migration beeinflusst werden können [4, 36]. Negative *feedback-loops* innerhalb des Ras/Raf/MEK/ERK Signalwegs kontrollieren die Aktivität und die Dauer des aktiven *Signalings*. Aktives ERK ist in der Lage, SOS, Raf und MEK1 zu inhibieren und wirkt damit regulierend auf die Menge an aktiviertem ERK. Weiterhin beeinflusst ERK die Expression von *Sprouty* Proteinen, welche die Raf-vermittelte Aktivierung von MEK und weiteren Phosphatasen inhibiert [39].

Neben der Aktivierung von MAPK kann GTP-gebundenes Ras auch den PI3K/Akt Signalweg stimulieren (Abb. 1.2, rechter Teil, blau), indem es direkt mit einer RBD-ähnlichen Domäne innerhalb der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) interagiert [40]. Darüber hinaus können Hormone, Wachstumsfaktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix die Signaltransduktion über Rezeptortyrosinkinasen, G-Protein gekoppelte Transmembranrezeptoren und Integrine aktivieren [41]. Nach Stimulation der Rezeptoren wird die PI3K aktiviert, welche die Addition einer Phosphat-Gruppe an das 3'OH-Ende eines Inositolrings innerhalb von PIP<sub>2</sub> katalysiert, sodass PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> umgewandelt wird. PIP<sub>3</sub> ist in der Lage, Akt und PDK1 in unmittelbare Nähe zur Plasmamembran zu rekrutieren, sodass PDK1 Akt an Tyr308 phosphoryliert und aktiviert [41]. Über PIP<sub>3</sub> wird auch mTORC2 aktiviert. Dieser Komplex ist eine weitere Kinase für die Phosphorylierung von Akt an Ser473. Im aktivierten Zustand kann Akt eine Vielzahl an Substraten aktivieren, aber auch inhibieren, was sich letztlich auf Prozesse wie Proliferation, Metabolismus, Migration und Überleben auswirkt [42]. Auch im PI3K/Akt Signalweg sind negative *feedback-loops* vertreten. S6K phosphoryliert nach Aktivierung beispielsweise Rictor, was die Akt Aktivität reduziert [43].



**Abb. 1.2: Der Ras/Raf/MEK/ERK und der PI3K/Akt Signalweg.** Über membranständige Rezeptoren, wie den Rezeptortyrosinkinasen (RTK) oder den G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptoren (GPCR), werden Adapterproteine aktiviert, die Ras bzw. Akt aktivieren. Auf der linken Seite ist der Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg dargestellt (orange/rot), in dem aktives, GTP-gebundenes Ras über eine sukzessive Aktivierung von Raf, MEK und ERK diverse Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben, Apoptose und Migration beeinflusst. Auf der rechten Seite ist schematisch der PI3K/Akt Signalweg gezeigt, der über eine aktivierte PI3-Kinase die Umwandlung von PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> katalysiert. Dies führt zur weiteren Aktivierung von *downstream*-Effektoren, wie PDK1 und mTORC2, die Akt an Tyr308 bzw. Ser473 phosphorylieren. Dadurch werden Akt Substrate beeinflusst, die Prozesse wie Proliferation, Metabolismus, Migration und Überleben regulieren (verändert nach [36, 41–43]) .

Die Signalkaskaden über Ras/Raf/MEK/ERK bzw. über PI3K/Akt sind keine unidirektionalen Aktivierungskaskaden. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass beide Signalwege untereinander kommunizieren und sich gegenseitig stimulieren, aber auch inhibieren. Man spricht von *pathway cross-talk* und unterscheidet zwischen *Cross-Inhibition*, *Cross-Aktivierung* und *Signalweg-Konvergenz*. Zum Beispiel ist ERK nach Aktivierung in der Lage, das Protein GAB1 zu phosphorylieren und somit zu inhibieren, welches für die Rekrutierung von PI3K an die Plasmamembran essentiell ist [44]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Akt nach IGF1 Stimulation die ERK-Aktivierung negativ beeinflusst, indem Akt Raf an spezifischen inhibitorischen Stellen innerhalb des N-Terminus von Raf phosphoryliert (Abb. 1.2) [45]. Allerdings können beide Signalwege auch auf ein spezifisches Zielprotein den gleichen aktivierenden oder inhibierenden Einfluss haben. So wirken aktives ERK und Akt gleichermaßen inhibitorisch auf BAD-Proteine ein und sichern somit das Überleben der Zelle, da BAD-Proteine die Bindung zwischen Bax und Bcl-2/Bcl-xL unterbrechen und somit bei Existenz von BAD

zur Apoptose führen [46]. Dies zeigt, dass die beiden Ras-vermittelten Signaltransduktionskaskaden Ras/Raf/MEK/ERK und PI3K/Akt ein enges Netzwerk ausbilden, welches weitreichend ineinander verzweigt vorliegt und von der Aktivität von Ras gesteuert werden kann.

### 1.1.5 Ras-Signaling an Endomembranen

Neben der Ras-vermittelten Signaltransduktionskaskade an der Plasmamembran, welche über extrazelluläre Stimuli und entsprechende Rezeptoren aktiviert wird, wurde die Ras-vermittelte Signaltransduktionskaskade auch ausgehend von Kompartimenten des Endomembran-Systems nachgewiesen, die im Folgenden beschrieben wird. Als Endomembran-System werden membranäre Strukturen bezeichnet, die am intrazellulären Transport von Proteinen beteiligt sind. Zu diesen gehören das ER, der Golgi, Vesikel, die Plasmamembran und die nukleäre Membran. Die einzelnen Kompartimente sind hierbei als dynamische Einheiten zu verstehen, die Membranabschnitte in vesikuläre oder tubuläre Strukturen abschnüren und auch wieder aufnehmen können. Hierbei transportieren die vesikulären oder tubulären Strukturen eine Vielzahl von Proteinen unter anderem auch Proteine der Rab-GTPasen, welche als wichtige Regulatoren für die spezifische raum-zeitliche Regulation des vesikulären Transportes gelten. In Abhängigkeit davon, welche Rab-Proteine auf den vesikulären oder tubulären Strukturen vorhanden sind, entscheidet sich, welche Lokalisation die endosomale Struktur besitzt. So finden sich an Membranen der *Early*-Endosomen unter anderem Rab5-Proteine, an *Late*-Endosome Rab7-Proteine und an *Recycling*-Endosomen Rab11-Proteine. Die Abschnürung der Endosome wird über Rab-Proteine initiiert und wird über *Coating*-Proteine, wie z.B. Clathrin realisiert. Im Zytoplasma findet das *Uncoating* der *Clathrin-Coated*-Vesikel und der weitere Lebenszyklus als *Early*-Endosome statt. Im Stadium des *Early*-Endosoms entscheidet sich, ob dieses in das Stadium des *Late*-Endosoms oder des *Recycling*-Endosoms übergeht. Dies ist abhängig davon, welche Rab-Proteine sich auf den *Early*-Endosomen befinden. Es ist beschrieben, dass die verschiedenen Status der Endosome auch unterschiedliche Lokalisationen innerhalb der Zelle aufweisen. Abhängig von dieser Lokalisation entscheidet sich auch, welche Signalwege über die endosomalen Strukturen beeinflusst werden können [47]. An den zwei Kompartimenten ER und Golgi des Endomembran-Systems konnten für H-Ras und N-Ras Signaltransduktionen bereits bestätigt und auch gut charakterisiert

werden [48, 49]. Für K-Ras konnten Lu und seine Kollegen zeigen, dass eine Lokalisation an endosomalen Membranen, wie dem *Late*- und dem *Early*-Endosom, vorliegt. Bezüglich der Fähigkeit von K-Ras *Signaling* ausgehend von diesen Kompartimenten zu kaskadieren, existieren aktuell nur wenige Studien [22, 50]. Ein aktuelles Modell, basierend auf Immunfluoreszenzstudien, beschreibt das K-Ras-*Signaling* an *Early*- und *Late*-Endosomen. Es konnte gezeigt werden, dass der stimulierte EGF-Rezeptor K-Ras an der Plasmamembran aktiviert. Es folgt eine Abschnürung der Plasmamembran mit den daran befindlichen EGFR- und K-Ras-Proteinen in einen *Clathrin-coated*-Vesikel. Nach erfolgten *Uncoating* des Vesikels werden Effektor-Proteine von Ras, wie zum Beispiel Raf, an den *Early*-Endosomen rekrutiert. Im anschließenden Stadium des *Late*-Endosoms konnte gezeigt werden, dass K-Ras Raf1 aktiviert. Darüber hinaus konnten die phosphorylierten MEK und ERK-Proteine an den *Late*-Endosomen nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass eine vollständig, Ras-vermittelte Signaltransduktion über Raf1/MEK/ERK an den *Late*-Endosomen abläuft [50].

### 1.1.6 Ras-Nanocluster

In den vorangehenden Kapiteln wurde beschrieben, wie Ras posttranslational modifiziert wird, zur Plasmamembran transportiert wird und welche Signaltransduktionen durch ein aktives Ras-Protein an der Plasmamembran initiiert werden. In diesem Kapitel soll beschrieben werden, wie Ras innerhalb der Plasmamembran organisiert vorliegt, welche Faktoren eine solche Organisation beeinflussen und welchen Effekt eine Organisation von Ras innerhalb der Plasmamembran auf Signaltransduktionskaskaden besitzt.

Studien der Arbeitsgruppe von John Hancock haben gezeigt, dass Ras-Proteine entgegen vorherigen Annahmen nicht ausschließlich als einzelne Proteine innerhalb der Plasmamembran diffundieren, sondern in räumlichen Strukturen, bestehend aus etwa 5 – 6 Ras-Proteinen, organisiert sind, den sogenannten Ras-Nanoclustern [51]. Etwa 44 % der Ras-Proteine liegen in Ras-Nanoclustern mit einem Durchmesser von ca. 16 nm organisiert vor. Die einzelnen Nanocluster sind dynamische Strukturen mit einer Lebensdauer von circa 0.1 – 1 Sekunde, was einen sehr schnellen Aufbau, aber auch einen schnellen Zerfall ermöglicht [52]. Es konnte gezeigt werden, dass die Ras-Proteine abhängig von ihrer posttranslationalen Modifikation sowie ihrer elektrostatischen Eigenschaften in bestimmte Regionen innerhalb der Plasmamembran lokalisiert vor-

liegen, die eine für die jeweilige Ras-Isoform individuelle Plasmamembranlipid-Komposition aufweisen. Beispielsweise liegt K-Ras.GTP ausschließlich in Phosphatidylserin(PtdSer)- und Phosphatidsäure(PA)-reichen Nanoclustern vor. Interessanterweise sind eine PtdSer- und eine PA-Bindestelle auch in Raf-Proteinen detektiert worden, was eine unmittelbare räumliche Nähe von aktivem K-Ras.GTP und Raf im Nanocluster ermöglicht [53]. Weiterhin sind Ras-Proteine nach Isoformen, sowie abhängig vom gebundenen Guaninnukleotid in einzelne, räumlich voneinander getrennten und somit nicht-überlappenden Nanoclustern sortiert [54]. Durch diese räumliche und zeitliche Organisation von Ras-Proteinen und ihren *downstream*-Effektoren wird ein effizientes und sehr schnelles *Signaling* ermöglicht, was sich zum Beispiel auch in der Nachweisbarkeit von phosphoryliertem ERK innerhalb von Minuten nach Stimulation der Zellen mit einem Wachstumsfaktor widerspiegelt [55].

Die Stabilität von Ras-Nanoclustern wird neben dem Aktinzytoskelett [51] über weitere sogenannte Gerüstproteine erhalten. Solche Gerüstproteine können zum Beispiel Nucleolin, Nucleophosmin oder aber Galektine sein, wie Galektin-1 (Gal-1) und Galektin-3 (Gal-3) [56]. In Bezug auf Ras-Nanocluster konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Gal-1 in einer Akkumulation von H-Ras.GTP-Nanoclustern resultiert. In reziproker Art führt eine Aktivierung von H-Ras zu einer Rekrutierung von Gal-1 in H-Ras.GTP-Nanoclustern [57, 58]. Weiterhin haben Experimente von Shalom-Feuerstein gezeigt, dass K-Ras.GTP-Nanoclustern über Gal-3 stabilisiert wird. Auch hier konnte durch Überexpression bzw. durch *knockdown* von Gal-3 eine Akkumulation bzw. eine Reduktion von K-Ras.GTP-Nanoclustern erwirkt werden [59, 60]. Zusammenfassend stellt das Zusammenspiel aus Galektinen, dem Aktinzytoskelett, der Komposition der Lipide in der Plasmamembran und weiteren stabilisierenden Gerüstproteinen die Grundlage für eine räumliche und zeitliche Verteilung von Ras-Proteinen an der Plasmamembran während der Signaltransduktion dar.

## 1.2 Galektine

Galektine sind kleine, lösliche Proteine, die spezifisch mit  $\beta$ -Galaktosid-haltigen Proteine über eine carbohydrate-bindende Domäne (CRD) interagieren können. Dies können intrazelluläre Proteine sein, die am Golgi sowie am ER über eine N- oder O-Glykosylierung an spezifischen Aminosäuren, zumeist an Asparaginen (N-Glykosylierung) oder Serinen/Threoninen (O-Glykosylierung), glykosyliert wurden [61]. Weitaus detaillierter untersucht ist die extrazelluläre Funktion von Galektinen. Extrazellulär lokalisiert

können Galektine Glykokonjugate auf der Zelloberfläche miteinander verbinden, so dass dies eine Transmembran-Signaltransduktionskaskade auslösen kann [62]. Aufgrund dieser beschriebenen Funktionalität sind Galektine an Prozessen wie Zellmigration, Autophagie, Signaltransduktion, Entzündungsreaktionen, Metastasierung und Angiogenese beteiligt und zeichnen sich auch durch die Interaktionsfähigkeit mit diversen weiteren Proteinen über Protein-Protein Interaktion aus [62, 63].

Die Familie der Galektine besteht aus aktuell 15 identifizierten Mitgliedern, welche entweder eine oder zwei CRDs besitzen und in prototypische (Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15), chimäre (Gal-3) und *tandem-repeat* Galektine (Gal-4, -6, -8, -9 und -12) klassifiziert werden. Prototypische Galektine verfügen strukturell über eine CRD, können sich aber zu Homodimeren zusammenlagern. Das chimäre Gal-3 besitzt nach der CRD eine kurze Polypeptidkette, welche reich an Prolinen, Glycinen und Tyrosinen ist und über die es sich zu oligomeren Strukturen verbinden kann. *Tandem-repeat* Galektine zeichnen sich durch zwei CRDs aus, welche über eine Peptidsequenz miteinander verbunden sind (*hinge*-Region), die eine Länge von fünf bis mehr als 50 Aminosäuren aufweisen kann. Die CRDs aller Galektine bestehen strukturell aus einer  $\beta$ -*Sandwich*- bzw. *Jelly-Roll*-Konfiguration, die aus fünf- und sechs-strängigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut ist. Über Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Interaktionen und über van-der-Waals-Kräfte sind Galektine in der Lage, mit Glykanen zu interagieren. Jedes Galektin besitzt hierbei eine Präferenz gegenüber eines bestimmten Glykans. *Tandem-repeat* Galektine, wie Gal-8, sind in der Lage, über ihre N-terminale CRD  $\alpha$ 2-3-sialylierte Glykane und über die C-terminale CRD Gal $\beta$ 1,4GlcNAc (LacNAc) zu binden, können also zwei unterschiedliche Glykane direkt miteinander verknüpfen.

Galektine sind im Nukleus, im Zytoplasma, an Endomembranen und in der extrazellulären Matrix lokalisiert und besitzen keine klassische Signalsequenz für eine Lokalisation am ER, welches ein Startpunkt für einen klassischen sekretorischen Signalweg darstellt. Stattdessen werden sie über nicht-klassische Mechanismen exozytiert [64, 65]. Für Gal-1 konnte ein Prozess namens Ectozytose für die Sekretion ausgemacht werden. Ectozytose beschreibt einen Prozess, bei dem Vesikel an der äußeren Seite der Plasmamembran als Ectosome abgeschnürt werden und die im Vesikel befindlichen Galektine freisetzen [66]. Vollständig verstanden ist die nicht-klassische Sekretion von Galektinen aber weiterhin nicht.



Galektine werden in nahezu allen Geweben und Zellen exprimiert, unterscheiden sich allerdings gewebespezifisch im Muster der Expression. In der hier vorliegenden Arbeit wurden Gal-1, -3 und -8 analysiert. In unserer Arbeitsgruppe wurden in neun der analysierten Pankreaskrebszelllinien nahezu ubiquitär Gal-1, -3 und -8 nachgewiesen, wobei die Stärke der Expression schwankte. Lediglich PaTu8988s wies keine Gal-1 Expression auf. In den 11 analysierten Lungenkarzinomzelllinien zeigte sich hingegen ein sehr heterogenes Expressionsmuster, in dem keinerlei Korrelationen festzustellen sind (Tab. 1) [67, 68].

Überexpressionen bzw. eine verringerte Expression diverser Galektine wird mit malignen Tumoren in Verbindung gebracht, sodass Galektine in der aktuellen Forschung einerseits als prognostische Marker, andererseits als Ziele für diverse Therapieansätze genutzt werden [62, 63, 69].

**Tab. 1: Übersicht der Expression von Galektin-1, -3 und -8 in Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien** (Daten basieren auf [67, 68]; publiziert in: [70])

Pankreaskarzinomzelllinien				Lungenkarzinomzelllinien			
Zelllinie	Gal-1	Gal-3	Gal-8	Zelllinie	Gal-1	Gal-3	Gal-8
PANC-1	+	+	+	HTB-55	+	+	+
AsPC-1	+	+	+	H-2122	-	+	+
MiaPaCa-2	+	+	+	H-23	+	-	+
BxPC-3	+	+	+	A427	+	-	+
Capan-1	+	+	+	Colo699	+	+	+
Capan-2	+	+	+	H1688	-	-	+
PaTu8902	+	+	+	SCLC-21H	+	+	+
PaTu8988t	+	+	+	HCC44	+	+	+
PaTu8988s	-	+	+	A549	+	-	+
				H358	+	+	+
				H1299	+	+	-

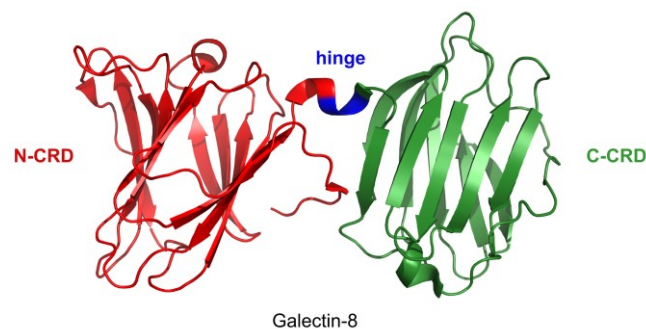
### 1.2.1 Galektin-8

Galektin-8 (Gal-8) gehört zu den *tandem-repeat* Galektinen und verfügt über eine N-terminale, sowie eine C-terminale CRD (N-CRD und C-CRD), welche über eine *hinge*-Region miteinander verbunden vorliegen (Abb. 1.3) [71]. Identifiziert wurde das

*LGALS8*-Gen als *prostate carcinoma tumor antigen-1* (PCTA-1), da es in großen Mengen in humanen und invasiven Prostatakarzinomen nachgewiesen werden konnte [72].

Das *LGALS8*-Gen kann aufgrund von alternativen Spleißprozessen mindestens 10 unterschiedliche Transkripte generieren. Die zwei auf Protein-Ebene bislang nachgewiesenen Isoformen sind als Gal-8 *short* (Gal-8s) und Gal-8 *long* (Gal-8l) definiert und verfügen über eine Größe von 35.8 und 40.4 kDa [68]. Diese unterscheiden sich innerhalb der *hinge*-Region durch ein alternatives Exon 11, welches nur im Gal-8l-Transkript vorhanden ist.

Abhängig von der extrazellulären Mikroumgebung kann Gal-8 die Zelladhäsion beeinflussen. Es wird vermutet, dass Gal-8 an der Aggregation von  $\beta_1$ -Integrin-Untereinheiten beteiligt ist und somit an der *Focal adhesion kinase* (FAK)-Signaltransduktion beteiligt sein kann, wenn es extrazellulär lokalisiert vorliegt [73]. Weiterhin konnte die Aktivität von Gal-8 direkt mit migratorischen und metastasierenden Prozessen in Verbindung gebracht werden [69, 73].



**Abb. 1.3: Struktureller Aufbau von Gal-8 (PDB: 3VKL).** Die N-terminale CRD (rot) ist über eine *hinge*-Region (blau) mit der C-terminalen CRD (grün) verbunden. Die Länge der *hinge*-Region ist nicht maßstabsgetreu, da in Kristallstrukturen die *hinge* Region nicht ausreichend stabilisiert werden kann [71]. Die Abbildung wurde unter Verwendung von UCSF Chimera 1.13.1rc auf Basis der PDB-Struktur 3VKL erstellt [71, 74].

Intrazellulär sind bislang nur wenige Funktionen von Gal-8 bekannt. Kürzlich erschienene Publikationen verweisen auf eine Beteiligung von Gal-8 bei der Detektion von Beschädigungen an Lysosomen in HEK293T- und HeLa-Zellen. Gal-8 reprimiert dabei die mTOR-Aktivität über einen Komplex der von Jia und ihren Kollegen als GALTOR-Komplex bezeichnet wird. Über diesen wird die Autophagie des beschädigten Lysosoms eingeleitet [75]. Weiterhin ist Gal-8 an der antibakteriellen Autophagie beteiligt, indem es NDP52 rekrutiert. Die Versuche von Thurston konnten zeigen, dass Gal-8 innerhalb von einer Stunde nach einer bakteriellen Infektion von *Salmonella typhimurium* in HeLa-Zellen akkumuliert. Durch diese Akkumulation wird die Rekrutierung von

NDP52 eingeleitet. NDP52 ist ein Effektor-Protein der Galektin-8-vermittelten Erkennung von Membran-Beschädigungen der Zelle, welche durch ein Eindringen von infektiösen Pathogenen verursacht wird, sodass im Folgenden die Proliferation des infektiösen Pathogens durch NDP52 verhindert wird [76]. Auf Grundlage dessen wird angenommen, dass Gal-8 intrazellulär ein versatiler Rezeptor für Vesikel-schädigenden Pathogene ist [75, 76].

In unserer Arbeitsgruppe konnte Monika Unger erstmalig Gal-8 als bisher unbekanntes Isoform-spezifischen Ras-Interaktionspartner identifizieren [77]. Die Arbeit von Andreea Porr konnte die Interaktion zwischen beiden Proteinen reproduzieren und zeigte weiterhin, dass Gal-8 sowohl in der zytosolischen als auch in der membranären Fraktion nach einer Präparation von partikulären und löslichen Proteinen vorliegt [68]. Sarah-Jane Barnard wies in ihrer Arbeit nach, dass Gal-8 mit Ras unabhängig von dessen Aktivierungszustand interagiert. Darüber hinaus konnte sie zeigen, dass ein Fehlen der posttranslationalen Farnesylierung von Ras dazu führt, dass Gal-8 nicht mehr im Komplex mit K-Ras ko-präzipitiert werden konnte. Aus dieser Erkenntnis resultierten *in silico* Analysen, die hydrophobe Bindungstaschen für die Farnesylgruppe des K-Ras identifizierten [67]. Auf Ebene der Ras-abhängigen Signaltransduktionswege Raf/MEK/ERK und PI3K-Akt konnte Frau Barnard zeigen, dass eine Inhibition der Expression von Gal-8 über spezifische siRNA zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2 führt. Weiterhin liegt nach einem *knockdown* von Gal-8 auch die Migration von PANC-1-Zellen reduziert vor. Diese Ergebnisse zeigen, dass Gal-8 eine wichtige Rolle für intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden besitzt, die vermutlich aus der Interaktion mit K-Ras resultiert und sich in einer erhöhten Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2 äußert sowie physiologische Prozesse, wie zum Beispiel die Migration, beeinflusst.

### 1.2.2 Galektin-1 und Galektin-3

Im Gegensatz zu Gal-8 sind die Funktionen von Gal-1 und Gal-3 bereits recht gut charakterisiert. Gal-3 konnte im Zytoplasma, im Nukleus, an endosomalen Kompartimenten, in Mitochondrien und an der Plasmamembran lokalisiert werden, während Gal-1 bislang nur im Zytoplasma, an der Plasmamembran und im Nukleus identifiziert wurde. Beide Galektine wurden als Modulatoren diverser Prozesse, wie zum Beispiel der Zelladhäsion, Migration, Zelltransformation, Apoptose, Angiogenese, Tumorstadium, Invasion und Metastasierung charakterisiert [62, 63, 78].

### 1.2.3 Interaktion von Galektinen mit Ras-Proteinen

Wie bereits in Kapitel 1.1.6 beschrieben, wurde Gal-1 auf Basis der Arbeit von Rotblat und seinen Kollegen als neuer Interaktionspartner von Ras-Proteinen identifiziert, welches über eine farnesyl-bindende Tasche verfügt. Computer-gestützte Modelle suggerieren, dass die Farnesylgruppe von Ras-Proteinen in die farnesyl-bindende Tasche von Gal-1 inkorporieren könnte, sodass eine Protein-Protein-Interaktion ermöglicht ist [27]. Diese Experimente bildeten die Grundlage, auch weitere Galektine auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit Ras-Proteinen zu analysieren. Asherey und seine Mitarbeiter haben eine ähnliche hydrophobe und somit potentiell farnesyl-bindende Tasche innerhalb der CRD von Gal-3 identifiziert [79]. Obwohl Kristallstrukturanalysen eines Komplexes aus Galektinen und Ras bislang noch nicht vorliegen, konnten die Interaktionen mittels Immunpräzipitationsanalysen belegt werden [59, 67, 80–82]. Eine direkte Interaktion über eine Inkorporation der Farnesylgruppe von Ras in die hydrophobe Bindungstasche von Gal-1, wie sie Rotblat vermutete, scheint den Ergebnissen von aktuellen Studien von Blaževič und Kollegen nach nicht vorzuliegen [27, 83]. Die Ergebnisse der Studie von Blaževič zeigen, dass aktives H-Ras an der Plasmamembran von Ras-Effektorproteinen gebunden wird. Statt der direkten Interaktion von Gal-1 mit aktivem H-Ras, vermutet Blaževič, dass Gal-1-Homodimere über die RBD mit Ras-Effektorproteinen interagieren und somit in indirekter Art die Stabilität der H-Ras-Nanocluster beeinflusst [83]. Dies lässt vermuten, dass eine indirekte Interaktion zwischen Galektinen und Ras-Proteinen möglich ist. Dennoch ist eine direkte Interaktion zwischen Galektinen und Ras-Proteinen weiterhin denkbar, da diverse Eigenschaften der Ras-Proteine (Farnesylierung und Palmitoylierung) dafür sprechen, dass eine direkte Interaktion mit der farnesyl-bindenden Tasche von Galektinen ermöglicht wird. Dies könnte vor allem in Hinsicht auf eine Chaperon-ähnliche Funktion der Galektine möglich sein, welche vergleichbar mit PDE6 $\delta$  oder RhoGDIs ist. Die Tatsache, dass Galektine an der Nanocluster Formierung beteiligt sind und das *Signaling* von Ras-Proteinen beeinflussen [58, 60], wird aktuell für die Entwicklung von Therapeutika verwendet. Kombinationstherapien aus Gal-1 und Gal-3 Inhibitoren (OTX008 bzw. GSC-100, *modified citrus pectin*) gepaart mit mTORC1 Inhibierung unter Verwendung von Rapamycin scheinen vielversprechende Ansatzpunkte für klinische Studien in Bezug auf die Therapie von Ras-induzierten Tumoren zu sein [84–87].

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe wurde Gal-8 als Interaktionspartner von K-Ras identifiziert, sowie grundlegende Studien zur Charakterisierung der Spezifität der Interaktion durchgeführt.

Die Aufklärung der Interaktionsdomäne beider Proteine ist bereits von Frau Dr. Sarah-Jane Barnard begonnen worden und wurde nun in der hier vorliegenden Arbeit weiter fortgesetzt [67]. Gal-8 gehört zu den *tandem-repeat* Galektinen und besitzt eine N-terminale und eine C-terminale CRD. Durch vergleichende Strukturanalysen der CRDs von Gal-1, Gal-3 und Gal-8 konnten Ähnlichkeiten in der räumlichen Orientierung der Aminosäuren identifiziert werden, welche für die Ausbildung einer hydrophoben Bindungstasche notwendig sind (Kooperation: Prof. Dr. Katja Becker; Strukturmodellierung: Dr. Karin Fritz-Wolf).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktionsdomäne zwischen Gal-8 und K-Ras spezifisch zu charakterisieren. Durch einen schrittweisen Austausch von positiv-geladenen Aminosäuren unmittelbar angrenzend am posttranslational modifizierten Cystein über *in vitro* Mutagenese wurden Ras-Mutanten erzeugt, die über *in vitro*-Interaktionsassays auf die Fähigkeit zur Interaktion mit Gal-8 geprüft wurden. Weiterhin wurden Gal-8-Mutanten erzeugt, die ebenfalls in *in vitro*-Interaktionsassays eingesetzt wurden.

Versuche von Monika Unger und Sarah-Jane Barnard zeigen, dass Gal-8 einen Einfluss auf Ras-vermittelte Signaltransduktionskaskaden, wie den Ras/Raf/MEK/ERK- sowie den PI3K/Akt-Signalwegs besitzt. Daher wurde über eine spezifische siRNA-vermittelte Inhibition von Gal-8 in einer humanen Adenokarzinomzelllinie des exokrinen Pankreas (PANC-1) sowie in einer epitheloiden Adenokarzinomzelllinie der Lunge (Colo699) analysiert, welchen Effekt ein *knockdown* von Gal-8 auf die Phosphorylierung von wichtigen Signaltransduktionsproteinen der beiden genannten Signalwege sowie auf physiologische Prozesse, wie Migration und Proliferation hat.

Da eine Ko-Präzipitation von K-Ras und Gal-8 in Arbeiten unserer Gruppe bereits gezeigt wurden und auch eine Ko-Lokalisation nach Präparation von partikulären und löslichen Proteinen nachgewiesen wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Methode die Lokalisation von Gal-8 und K-Ras in PANC-1-Zellen charakterisiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Tab. 2: Verwendete Chemikalien.

Produkt	Hersteller
2 % Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel B)	Roth, Karlsruhe
30 % Acrylamid (Rotiphorese® Gel A)	Roth, Karlsruhe
BCA Protein Assay Reagent A (Pierce)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
<i>Bovine Serum Albumin, Fraction V (BSA)</i>	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
<i>Fetal Bovine Serum (FBS)</i>	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
LB Agar Kapseln	Q-Biogene, Heidelberg
<i>Membrane Blocking Agent</i>	GE Healthcare, Frankfurt am Main
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

Alle verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von den Firmen Applichem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) oder Merck Millipore (Darmstadt) bezogen.

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tab. 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
Amersham Protran 0.45 µm Nitrocellulose	GE Healthcare, Frankfurt am Main	#106000002
Deckgläser (Ø 15 mm und 20 x 20 mm)	Menzel Gläser, Braun- schweig	#9.161 061 #9.161 020
Microlance 20G Nr.1	Becton Dickinson, Frankfurt am Main	#301300
Microlance 25G Nr.18	Becton Dickinson, Frankfurt am Main	#300400
Millex-GS Sterilfilter (0.22 µm)	Merck Millipore, Darmstadt	#SLGS033SB
Objektträger (76 x 26 mm)	Brand GmbH, Wertheim	#4747 02
PCR Tubes (0.2 ml)	Biozym, Hessisch-Oldendorf	#711000
TC-Platten für Migrations- und Proliferationsassays assays (6-well und 12 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen	#657160 #665180
Whatman® <i>Chromatog- raphy Paper</i>	GE Healthcare, Frankfurt am Main	#3030-931

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
Zellkulturschalen (6-well, 12-well, 60 mm und 10 cm)	Sarstedt, Nürnberg	#83.3920.005, #83.3921, #83.3901 #83.3902

Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden in Standard-Qualität vom aktuellen Lieferanten bezogen.

### 2.1.3 Reagenzien, Marker, Enzyme und molekularbiologische Kits

Tab. 4: Verwendete Reagenzien, Marker, Enzyme und molekularbiologische Kits.

Komponente	Hersteller	Bestellnummer
1 kb DNA ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main	#N3232L
100 bp DNA ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main	#N3231L
<i>Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal</i> (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt am Main	#M0290S
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold	#K1231
Deoxyribonucleotides (dNTPs)	Sigma-Aldrich, Taufkir- chen	#D7295
DNA-midi™ GT Plasmid DNA Extraction Kit (Gravity)	iNtRON Biotechnology, Seongnam, KOR	#17254
DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit	iNtRON Biotechnology, Seongnam, KOR	#17096
NucleoBond® Finalizer	Macherey-Nagel, Düren	#740519.20
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit	Macherey-Nagel, Düren	#740609.50
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold	#26616
ProEasy Baculovirus DNA	LuBioScience, Zürich	#A10S
ProGreen Baculovirus DNA	LuBioScience, Zürich	#A1
Q5 Hot Start High-Fidelity Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main	#M0493S
QuikChange II XL Site- Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Frankfurt am Main	#200521
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main	diverse
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden	#74136
T4 DNA Ligase und Puffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main	#M0202
ZeroBlunt™ PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold	#K270020

## 2.1.4 Geräte

Tab. 5: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
ELx800 Absorbance microplate reader	Biotek, Bad Friedrichshall
Fusion SL4-3500.WL, <i>Chemiluminescence Imaging System</i>	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Leica DMI8 S Mikroskop	Leica, Wetzlar
LICOR Odyssey® CLx	LI-COR Inc., Lincoln, USA
LICOR Odyssey® Sa <i>Infrared Imaging System</i>	LI-COR Inc., Lincoln, USA
Nanodrop 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Olympus IX81, Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
Optima™ MAX-E	Beckman-Coulter, Krefeld
SensoQuest labcycler (PCR)	SensoQuest, Göttingen
UV-Transilluminator GeneFlash	Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK

## 2.1.5 Software

Tab. 6: Verwendete Software.

Software/Version	Hersteller
cellSens Dimension 1.6	LEAD Technologies, Charlotte, USA
Citavi (Version 6.3.0)	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Fusion (Version 15.18)	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gen5 (Version 2.00)	Biotek, Bad Friedrichshall
GraphPad Prism5	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Image Studio (Version 5.2)	LI-COR Inc., Lincoln, USA
Fiji/ImageJ (Version 1.52i)	National Institute of Health, USA, [88, 89]
Inkscape (Version 0.48.5)	Free Software Foundation, Boston, USA
LAS X 3.6.20104.0	Leica, Wetzlar
Microsoft® Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® PowerPoint 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NanoDrop 1000 (Version 3.8.1)	PeqLab, Erlangen
SnapGene (Version 4.2.11)	GSL Biotech LLC, IL, USA
UCSF Chimera 1.13.1rc	UCSF Resource for Biocomputing, [74]



### 2.1.6 Plasmide

Plasmidkarten der wichtigsten hier aufgeführten Plasmide finden sich im Anhang (Kap. 8.1).

**Tab. 7: Verwendete Plasmide.** Kommerziell erworbene, sowie in früheren Arbeiten erzeugte Plasmide sind entsprechend markiert.

Plasmid	Erzeugt von / Hersteller / aus dem Labor von
pCGN/HA-C-CRD	Meinohl (2015), [90]
pCGN/HA-C-CRD- <i>hinge</i>	im Rahmen dieser Arbeit
pCGN/HA-N-CRD	Meinohl (2015), [90]
pCGN/HA-N-CRD- <i>hinge</i>	im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C1/Cdc42	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C1/Rac1	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C1/Rac1b	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C1/RhoC	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C2/RhoA	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C3	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, FRA
pEGFP-C3/HA-K-Ras wt	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C3/HA-H-Ras(G12V)	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C3/HA-H-Ras(G12V,K185P)	im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C3/HA-H-Ras(G12V,S183K)	im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C3/K-Ras(G12V)	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C3/K-Ras(G12V,C185S)	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C3/K-Ras(G12V,K182S)	im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C3/ K-Ras(G12V,K182S,K184P)	im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C3/K-Ras(G12V,K184P)	im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C3/ K-Ras(G12V,KKKKKK175-180DGTQGC)	im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C3/K-Ras(G12V,KKKKKK175- 180DGTQGC,K182S,K184P)	im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C3/ K-Ras(G12V,KKKKKK175-180ESGPGC)	im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C3/K-Ras(G12V,KKKKKK175- 180ESGPGC,K182S,K184P)	im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C3/K-Ras(S17N)	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C3/HA-N-Ras(G12V)	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pEGFP-C3/ HA-N-Ras(G12V,G183K,P185K)	im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C3/HA-N-Ras(G12V,P185K)	im Rahmen dieser Arbeit
pET15b/EGFP-K-Ras(G12V)	im Rahmen dieser Arbeit
pSNAPf/Galectin-8 <i>long</i>	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pVL1393/HA-Galectin-8 <i>long</i>	Prof. Dr. Klaudia Giehl
pVL1393/His-Galectin-8 <i>long</i>	im Rahmen dieser Arbeit
pVL1393/His-K-Ras(G12V)	im Rahmen dieser Arbeit

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) erzeugt und in einer Konzentration von 100 µM in *Aqua ad iniectabilia* als Stammlösung vor der weiteren Verwendung angesetzt. Für die Verwendung in PCRs o. Ä. wurde die Stammlösung 1:10 in *Aqua ad iniectabilia* verdünnt (= 10 µM).

**Tab. 8: Primer, die in dieser Arbeit für *in vitro* Mutagenese verwendet wurden.**

Primer	Sequenz
K-Ras (G12V,K184P)	5' Primer 5'-GAAGTCAAAGACACCATGTGTAATTATGTAAGGATCCACCGGATCTAG-3' 3' Primer 5'-TCAGATCCGGTGGATCCTTACATAATTACACATGGTGTCTTTGACTTC-3'
K-Ras (G12V,K182S)	5' Primer 5'-GAAAAAGAAGTCAAGCACAAAGTGTGTAATTATGTAAGGATCCACCGG-3' 3' Primer 5'-CCGGTGGAACCTTACATAATTACACACTTTGTGCTTGACTTCTTTTTC-3'
K-Ras (G12V,K182S, K184P)	5' Primer 5'-GAAAAAGAAGTCAAGCACACCATGTGTAATTATGTAAGGATCCACCGGATCTAGATAACTG-3' 3' Primer 5'-CAGTTATCTAGATCCGGTGGATCCTTACATAATTACACATGGTGTGCTTGACTTCTTTTTC-3'
H-Ras (G12V,K185P)	5' Primer 5'-CCCGGCTGCATGAGCTGCCCATGTGTGCTCTCC-3' 3' Primer 5'-GGAGAGCACACATGGGCAGCTCATGCAGCCGGG-3'
H-Ras (G12V,S183K)	5' Primer 5'-CCCGGCTGCATGAAGTGCAAGTGTGTGCTCTCC-3' 3' Primer 5'-GGAGAGCACACACTTGCACCTTCATGCAGCCGGG-3'
N-Ras (G12V,G183K, P185K)	5' Primer 5'-GGGACTCAGGGTTGTATGAAGTTGAAGTGTGTGGTGATGTAAGGATCCACCGG-3' 3' Primer 5'-CCGGTGGATCCTTACATCACCACACACTTCAACTTCATACAACCCAGAGTCCC-3'
N-Ras (G12V,P185K)	5' Primer 5'-GACTCAGGGTTGTATGGATTGAAGTGTGTGGTGATGTAAGGATC-3' 3' Primer 5'-GATCCTTACATCACCACACACTTCAATCCCATACAACCCAGAGTC-3'
N-CRD( $\Delta$ BamHI)	5' Primer 5'-CACCATTCTGATCAGCTCGATCCTGGAACCTTGTATTG-3' 3' Primer 5'-CAATCAAAGTTCAGGATCGAGCTGATCAGGAATGGTG-3'

**Tab. 9: Primer, die in dieser Arbeit für PCR verwendet wurden.**

Primer	Sequenz
K-Ras(G12V)PL-H	5' Primer 5'-GGGCTGCAGCATATGACTGAATATAAAC-3' 3' Primer 5'-CCCCCGGATCCTTACATAATTACACACTTTGTCTTTGAGCAGCCGGGGCCACTCTCACCA- TCTT TGC-3'
K-Ras(G12V)PL-N	5' Primer 5'-GGGCTGCAGCATATGACTGAATATAAAC-3' 3' Primer 5'-CCCCCGGATCCTTACATAATTACACACTTTGTCTTTGAACAACCCTGAGTCCCATCACCA- TCTT TGC-3'
K-Ras (G12V,K182S, K184P)PL-H	5' Primer 5'-GGGCTGCAGCATATGACTGAATATAAAC-3' 3' Primer 5'-CCCCCGGATCCTTACATAATTACACATGGTGTGCTTGAGCAGCCGGGGCCACTCTCAC- CATCTT TGC-3'

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
K-Ras (G12V,K182S, K184P)PL-N	5' Primer 5'-GGGCTGCAGCATATGACTGAATATAAAC-3' 3' Primer 5'-CCCCCGGATCCTTACATAATTACACATGGTGTGCTTGAACAACCCTGAGTCCCATCACCA- TCTTTGC-3'
His-K-Ras(G12V)	5' Primer 5'-CCCATCGAATTCCTGCAGATGCATCACCATCACCATCACCATCACGCCATATGACTGAATA- TAAACTTG-3-3' 3' Primer 5'-GGGGATCCTTACATAATTACACACTTTGT-3'
HA-N-CRD	5' Primer 5'-GGGGATCCATGATGTTGTCCTTAAACAACCTACAGAAT-3' 3' Primer 5'-GGGGATCCGCGGCCGCTACGAGCTGAAGCTAAAACCAATTGAGTG-3'
HA-C-CRD	5' Primer 5'-GGGAATTCGGATCCATGAGGCTGCCATTCGCTGCAAGGTTG-3' 3' Primer 5'-GGGGATCCCTACCAGCTCCTTACTTCCAGTAAGTG-3'
HA-N-CRD-hinge	5' Primer 5'-GGGGATCCATGATGTTGTCCTTAAACAACCTACAGAAT-3' 3' Primer 5'-CCCGCGGCCGCTACTTTGACACATAGTTCATAGGTGGTAT-3'
HA-C-CRD-hinge	5' Primer 5'-GGGGATCCATGGACTTACAAAGTACCCAAGCATCT-3' 3' Primer 5'-CCCGCGGCCGCTACCAGCTCCTTACTTCCAGTAAGTGGAT-3'

## 2.1.8 siRNA

Tab. 10: Übersicht über die verwendeten siRNAs.

<b>siRNA</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
ON-TARGETplus LGALS8 siRNA SMARTpool	Horizon Discovery, Cambridge UK	L-010607-00-0005
ON-TARGETplus Non-targeting pool	Horizon Discovery, Cambridge UK	D-001810-10-05

## 2.1.9 Prokaryotische und eukaryotische Zellen

### 2.1.9.1 *Escherichia coli* Stämme

Tab. 11: Übersicht über die verwendeten *E. coli* Stämme

<b><i>E. coli</i> Stamm</b>	<b>Hersteller</b>
OneShot® TOP10F' Compentent Cells	Thermo Fisher Scientific

### 2.1.9.2 Liste der verwendeten eukaryotischen Zelllinien

Tab. 12: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	ATCC-Nr./ DMSZ-Nr.
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie, welche den linken Arm des viralen Genoms des Adenovirus Typ 5 permanent auf Chromosom 19 inkorporiert hat, wodurch eine Immortalisierung der Zellen ermöglicht wurde [91].	CRL-1573
PANC-1	Zelllinie des humanen Adenokarzinoms des exokrinen Pankreas mit epithelialem Charakter [92], die über ein konstitutiv aktives K-Ras-Protein aufgrund einer monoallelischen Punktmutation im Kodon 12 (Glyzin → Asparaginsäure) des K-ras-Gens verfügen [93].	CRL-1469
PANC-1/ EGFP-K-Ras (G12V) Klon 4.1	PANC-1-Zellen, die stabil mit pEGFP-C3/K-Ras4B(G12V) transfiziert wurden und ein Fusionsprotein aus EGFP und K-Ras produzieren. K-Ras besitzt hier eine Punktmutation, sodass die Aminosäure an Position 12 (Glyzin) durch Valin ersetzt vorliegt und K-Ras dauerhaft GTP gebunden vorliegt.	Prof. Dr. Klaudia Giehl, [6]
PANC-1/EGFP-14	PANC-1-Zellen, die stabil mit pEGFP-C3 transfiziert wurden und ein EGFP-Protein produzieren.	Prof. Dr. Klaudia Giehl, [6]
COLO-699	Humane adhärente, epitheloide Adenokarzinomzelllinie der Lunge, die 1986 aus der Pleura Flüssigkeit einer 57-jährigen Frau gewonnen wurde [94].	ACC 196

### 2.1.10 Antikörper

#### 2.1.10.1 Primäre Antikörper

Tab. 13: Verwendete Primärantikörper.

(1) TBS (1 x); (2) 5 % MP/TBS-T; (3) 3 % BSA/TBS-T. x<sup>IF</sup> = für Immunfluoreszenz verwendete Verdünnung des Antikörpers x.

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller	Bestellnummer
AKT1 (2H10)	1:1000 in (2)	mouse	Cell Signaling Technology	#2967
AKT2 (D6G4)	1:1000 in (2)	rabbit	Cell Siganling Technology	#3063
AKT3 (L47B1)	1:1000 in (2)	mouse	Cell Signaling Technology	#8018

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Caveolin	1:2000 in (1)	rabbit	Becton Dickinson	#610059
Galectin-1	1:500 in (1)	goat	R&D Systems	#AF1152
Galectin-3	1:2000 in (1)	goat	R&D Systems	#AF1154
Galectin-8	1:50 <sup>IF</sup>	mouse	R&D Systems	#MAB1305
Galectin-8	1:500 in (1)	mouse	Santa Cruz Biotechnology	#sc-377133
GAPDH	1:5000 in (1)	rabbit	Rockland Immunochemicals Inc.	#600-401-A33
GAPDH (6C5)	1:5000 in (1)	mouse	OriGene Technologies GmbH	#ACR001PS
GFP (7.1/13.1)	1:1000 in (1)	mouse	Roche	#118144600001
GFP (FL)	1:500 in (1)	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	#sc-8334
GFP-HRP	1:3000 in (1)	mouse	Miltenyi Biotec	#130-091-833
HA (C29F4)	1:3000 in (1)	mouse	Cell Signaling Technology	#3724
HA-HRP	1:3000 in (1)	mouse	Miltenyi Biotec	#130-091-972
His	1:1000 in (2)	rabbit	Proteintech	#10001-0-AP
H-Ras	1:1000 in (1)	mouse	Merck	#OP25
K-Ras(F234)	1:500 in (3)	mouse	Santa Cruz Biotechnology	#sc-30
K-Ras2B	1:500 in (2)	rabbit	Proteintech	#16155-1-AP
K-Ras2B	1:50 <sup>IF</sup>	rabbit	Proteintech	#16155-1-AP
N-Ras	1:1000 in (1)	mouse	Merck	#MAB3291
p44/42 MAPK (ERK1/2) (L34F12)	1:1000 in (3)	mouse	Cell Signaling Technology	#4696
pAKT (Ser473)	1:1000 in (3)	rabbit	Cell Signaling Technology	#9271
panAKT (40D4)	1:1000 in (3)	mouse	Cell Signaling Technology	#2920
panRas	1:1000 in (2)	rabbit	Proteintech	#12063-1-AP
panRas(Ab-3)	1:500 in (1)	mouse	Merck	#OP40
phospho-p44/42 MAPK XP® (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	1:1000 in (3)	rabbit	Cell Signaling Technology	#4370
Rab11 (D4F5) XP®	1:100 <sup>IF</sup>	rabbit	Cell Signaling Technology	#5589
Rab5 (C8B1)	1:100 <sup>IF</sup>	rabbit	Cell Signaling Technology	#3547

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Rab7 (D95F2) XP®	1:100 <sup>IF</sup>	rabbit	Cell Signaling Technology	#9367
β-Catenin	1:2000 in (1)	rabbit	Sigma-Aldrich	#C2206

### 2.1.10.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 14: Verwendete Sekundärantikörper angesetzt in TBS (1 x).

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Anti-mouse IgG (H+L) CF™ 680	1:150000	goat	Biotrend	#20065
Anti-mouse IgG (H+L) CF™ 770	1:150000	goat	Biotrend	#20077
Anti-rabbit IgG (H+L) CF™ 680	1:150000	goat	Biotrend	#20067
Anti-rabbit IgG (H+L) CF™ 770	1:150000	goat	Biotrend	#20078
Anti-mouse IgG, HRP-linked	1:5000	horse	New England Biolabs	#7076
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	1:5000	goat	New England Biolabs	#7074

### 2.1.10.3 Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Tab. 15: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz in PBS-CMF (1 x).

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Anti-mouse IgG (H+L), Cy3-linked	1:1000	goat	Dianova	#115-165-003
Anti-mouse IgG (H+L), AlexaFluor® 488-linked	1:1000	goat	Thermo Fisher Scientific	#A-11001
Anti-rabbit IgG (H+L), Cy3-linked	1:1000	goat	Dianova	#111-166-045
Anti-rabbit IgG (H+L), AlexaFluor® 488-linked	1:1000	goat	Thermo Fisher Scientific	#A-11008

### 2.1.11 Rekombinante Proteine

Tab. 16: Verwendete rekombinante und kommerziell erworbene Proteine.

<b>Rekombinantes Protein</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Humanes Galektin-1	R&D Systems	#1152-GA-050
Humanes Galektin-1 CF	R&D Systems	#1152-GA-050/CF
Humanes Galektin-3	R&D Systems	#1154-GA-050
Humanes Galektin-3 CF	R&D Systems	#1154-GA-050/CF
Humanes Galektin-8 <i>short</i>	R&D Systems	#1305-GA-050
Humanes Galektin-8 <i>short</i> CF	R&D Systems	#1305-GA-050/CF
Humanes K-Ras <sup>His</sup> (Aminosäuren 1-163)	Jena Bioscience	#PR-239

## 2.2 Methoden

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Lösungen in ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Herstellung von *Lysogeny Broth* (LB)-Medium nach Miller

*Lysogeny Broth* (LB)-Medium nach Miller wurde unter Verwendung von 25 LB-Medium Kapseln (MP-Biomedicals, Eschwege) zu einem Liter ddH<sub>2</sub>O zugegeben und nach Autoklavierung für die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet.

*Lysogeny Broth*-Agar Platten wurden unter Verwendung von 40 LB-Agar-Kapseln (Q-Biogene, Heidelberg) pro einem Liter ddH<sub>2</sub>O hergestellt, autoklaviert und unter Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums (Kap. 2.2.1.2) in sterile Petrischalen (10 cm) gegossen.

#### LB-Flüssigmedium-Kapseln

- 1 % Trypton (m/V)
- 0.5 % Hefeextrakt (m/V)
- 1.0 % NaCl (m/V)

#### LB-Agar-Medium

- 1 % Trypton (m/V)
- 0.5 % Hefeextrakt (m/V)
- 1.0 % NaCl (m/V)
- 1.5 % Agar (m/V)
- pH 7.5

#### 2.2.1.2 Antibiotika versetztes LB-Medium bzw. LB-Agar-Medium zur Selektion transformierter Bakterien

Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde LB-Medium bzw. LB-Agar-Medium mit Antibiotika versetzt. Ampicillin (Roth, Karlsruhe) und Kanamycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden in einer finalen Konzentration von 100 µg/ml bzw. 50 µg/ml eingesetzt.

#### 2.2.1.3 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Bakterien

*Escherichia coli* (*E. coli*) wurden zur Transformation von Plasmiden verwendet und werden in unserer Arbeitsgruppe zu chemisch kompetenten Bakterien modifiziert. *One*



*Shot*<sup>®</sup> *TOP10F'* *Competent E. coli* (Invitrogen) wurden auf eine LB-Agar Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in 3 ml LB-Medium ohne Antibiotikum-Zusatz überführt und über Nacht bei 37 °C sowie 180 rpm im Orbitalshaker inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 100 ml LB-Medium ohne Antibiotika-Zusatz überführt, sodass die optische Dichte eine OD<sub>600nm</sub> von 0.1 aufwies. Es erfolgte eine Inkubation der Bakteriensuspension bei 37 °C und 180 rpm im Orbitalshaker bis die optische Dichte eine OD<sub>600nm</sub> von 0.6 erreicht hat. Die Bakteriensuspension wurde bei 2000 x g und 4 °C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 25 ml eiskalter, steriler Calciumchlorid-Lösung (100 mM) resuspendiert und auf Eis für 60 min inkubiert. Die Suspension wurde erneut bei 2000 x g und 4 °C für 10 min sedimentiert und das entstandene Bakterienpellet in 5 ml eiskalter, steriler Calciumchlorid-Lösung (100 mM) mit 30 % (V/V) Glycerin resuspendiert. Die somit chemisch kompetenten Bakterien wurden in Aliquots in einem Ethanol-Trockeneisbad schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.1.4 Transformation kompetenter *Escherichia coli* Bakterien

Zur Transformation von kompetenten *E. coli* wurden 200 µl eiskalte Bakteriensuspension mit 100 µl eiskaltem TCM-Puffer (1 x) versetzt und 0.1 - 0.2 µg des zu transformierenden DNA-Plasmids bzw. 10 µl eines Ligationsansatzes (Kap. 2.2.2.4) zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 3 min bei 42 °C. Nach Abkühlung des Transformationsansatzes auf Eis für 1 min wurden 700 µl LB-Medium (RT) zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 300 rpm und 37 °C inkubiert. Bei einer Retransformation eines Plasmides werden 80 µl des Transformationsansatzes auf eine LB-Agar-Platte (versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit Hilfe eines Drigalskispatels ausgestrichen. Wird ein Ligationsansatz transformiert, wird der Ansatz für eine Minute bei 3800 x g sedimentiert, der Überstand verworfen, in 50 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agar-Platte (versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausgestrichen. Die LB-Agar-Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

##### TCM-Puffer (1 x)

10 mM Tris HCl, pH 7.5

10 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM MgCl<sub>2</sub>

### 2.2.1.5 Kultivierung der transformierten *Escherichia coli* in LB-Medium

Eine auf den LB-Agar-Platten gewachsene *E. coli* Kolonie (Kap. 2.2.1.4), wurde in 4 ml LB-Medium (versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum) überführt, bei 180 rpm und 37 °C auf dem Orbitalshaker über Nacht inkubiert und ggf. in einem größeren Volumen LB-Medium weiter kultiviert.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde nach Anleitung des Herstellers mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Kits DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit oder DNA-midi™ GT Plasmid DNA Extraction Kit isoliert (Intron Biotechnology). Ersteres wurde für Bakterienpellets, die aus etwa 1.5 – 3 ml Bakteriensuspension resultieren, nach Protokoll des DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kits genutzt, letzteres für Bakterienpellets aus 150 ml Bakteriensuspension nach Protokoll des DNA-midi™ GT Plasmid DNA Extraction Kits. Hierbei ist zu beachten, dass die Aufreinigung der Plasmid-DNA unter Verwendung des DNA-midi™ GT Plasmid DNA Extraction Kits nach Schritt 11 des „General Protocol“ mit Hilfe des Kits „Plasmid DNA concentration and desalting“ (Macherey-Nagel) fortgesetzt wird. Das „Protocol for DNA concentration and desalination“ (Macherey-Nagel) wurde angewandt, um die präzipitierte Plasmid-DNA aus dem Isopropanol/DNA Gemisch aufzureinigen.

### 2.2.2.2 Spaltung der DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde DNA mit einem Restriktionspuffer (10 x, NEB) versetzt, auf 9 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und 1 - 5 Units der entsprechenden Restriktionsendonuklease zugesetzt (NEB). Der Ansatz wurde bei geeigneter Temperatur (lt. Datenblatt NEB) für 1 h inkubiert.

#### Restriktionsansatz

0.5 - 1 µg	Plasmid DNA
1 µl	Restriktionspuffer (10 x)
0.5 - 1 µl	Restriktionsendonuklease
x µl	ddH <sub>2</sub> O
<hr/>	
Σ	10 µl

### 2.2.2.3 Dephosphorylierung von 5' Phosphatgruppen

Spaltungsreaktionen von bestimmten Restriktionsendonukleasen resultieren in gespaltene DNA, die eine 5' überhängende Phosphatgruppe aufweist. Dies ermöglicht z.B. eine Re-Ligation eines gespaltenen Plasmides. Zur Vermeidung werden die Phosphatgruppen unter Verwendung einer alkalinen Phosphatase (NEB) für 30 Minuten bei 37 °C abgespalten.

#### Dephosphorylierung

1 µg	hydrolysierte DNA
2 µl	CutSmart Buffer (10 x)
1 µl	Alkaline Phosphatase, <i>calf intestinal</i> (CIP) (10 U/µl)
x µl	ddH <sub>2</sub> O
<hr/>	
Σ	20 µl

### 2.2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von einem DNA-Fragment in einen gespaltenen DNA-Vektor wurde eine kommerziell erhältliche T4-DNA Ligase (M0202S, NEB) verwendet. Die Vektor-DNA und das Insert wurden zunächst in gleichen Volumina auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Dadurch wurde ein geeignetes Verhältnis aus Vektor-DNA zu Insert bestimmt, welches im Ligationsansatz verwendet wurde. Die entsprechenden Mengen von Vektor-DNA und Insert wurden mit 1 µl T4 DNA-Ligase Puffer (10 x, NEB) versetzt, mit ddH<sub>2</sub>O auf 9 µl Volumen aufgefüllt und im Anschluss 1 µl T4 DNA-Ligase (NEB) zugegeben und ü. N. bei 16 °C inkubiert.

#### Ligationsansatz

x µl	Vektor-DNA
x µl	Insert
1 µl	T4 DNA-Ligase Buffer (10 x)
0.5 µl	T4 DNA-Ligase (400 U/µl)
x µl	ddH <sub>2</sub> O
<hr/>	
Σ	10 µl

### 2.2.2.5 *In vitro*-Mutagenese

Zur zielgerichteten Mutation einzelner Basenpaare wurde das kommerziell erhältliche QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Frankfurt am Main) verwen-

det. Geeignete Primer (Tab. 8) für die *in vitro*-Mutagenese wurden nach Protokoll „*Primer Design Guideline*“ erstellt, von der Firma *biomers.net* erworben und unter Verwendung des Herstellerprotokolls „*Mutant Strand Synthesis Reaction (Thermal Cycling)*“ verwendet. Es folgte eine Transformation des mutierten Plasmids in kompetente *E. coli* Bakterien (Kap. 2.2.1.4).

### **2.2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion**

Um definierte DNA-Fragmente zu erzeugen wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Hierzu wurden entsprechende Primer designt (Tab. 8 und Tab. 9) und von der Firma *biomers.net* synthetisiert. Die kommerziell erhältliche Q5 Polymerase (NEB) wurde verwendet, um die PCR nach Herstellerprotokoll „*Reaction Setup*“ durchzuführen. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden im Anschluss mittels Agarose Gelelektrophorese analysiert (Kap. 2.2.2.7).

### **2.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten**

Zur Analyse der Größe von DNA-Fragmenten aus einer Restriktion von Plasmid-DNA oder einem PCR-Ansatz wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach Größe des zu analysierenden Fragments wurde eine Agarosekonzentration von 0.7 – 1.5 % (m/V) in TAE-Puffer verwendet. Dieses Gemisch wurde in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht und unter Schwenken solange homogenisiert, bis sich die Agarose vollständig im TAE-Puffer löste. Nach Zugabe von 4 µl Midori Green Advance (Biozym) pro 100 ml Gel wurde das Gemisch in eine Gelelektrophorese Kammer gegossen und ein geeigneter Probenkamm eingesteckt. Nach Polymerisation des Agarosegels konnte die Probe, welche mit DNA-Probenpuffer (10 x) versetzt worden ist, in die entsprechenden Probenkammern im Gel aufgetragen werden. Der Gellauf erfolgt je nach Größe des Gels bei einer Spannung von 80 - 100 V. Die anschließende Visualisierung erfolgt im GeneFlash UV-Transilluminator (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK).

#### **TAE Puffer (1 x)**

40 mM	Tris/HCl pH 8.0
20 mM	Essigsäure
1 mM	EDTA

**Probenpuffer (10 x)**

0.25 % (m/V)	Orange G
50 % (V/V)	Glycerin
1 mM	EDTA

**2.2.2.8 DNA-Aufreinigung**

Die DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen, sowie die DNA-Aufreinigung nach einer PCR erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Protokoll des Herstellers „5.2 DNA extraction from agarose gels“ sowie „5.1 PCR clean-up“.

**2.2.2.9 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Um die Konzentration von DNA zu bestimmen wurde das NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Als Blank-Wert wurde der Puffer verwendet, in welchem die DNA gelöst vorliegt. 1 µl der Probe wurde im Folgenden in der Messung mittels NanoDrop eingesetzt.

**2.2.3 Zellbiologische Methoden****2.2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen****2.2.3.1.1 Kultivierung humaner eukaryotischer Zellen**

Die adhärent wachsenden Zelllinien PANC-1, HEK293 und COLO-699 wurden in DMEM *complete* bei 37 °C und 8 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Zu den stabil mit Plasmiden transfizierten PANC-1-Zellen wurde G-418 in einer Konzentration von 1.0 mg/ml in DMEM *complete* zugesetzt. Lag ein vollständig konfluenter Zellrasen vor, wurden das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen mit CMF-PBS (1 x) gewaschen und 2 ml Trypsin-EDTA für ca. 3 min bei 37 °C zugegeben. Die Zellen wurden in DMEM *complete* aufgenommen, bei 1000 x g für 3 min sedimentiert, in DMEM *complete* aufgenommen und in gewünschter Zellzahl wieder ausgesät. Alternativ konnte mittels der Neubauer-Zählkammer eine exakt definierte Anzahl an Zellen ausgesät werden (Kap. 2.2.3.2).

**DMEM complete**

- 10 % (V/V) Fötale Kälberserum
- 1 % (V/V) *Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids* (100x)
- 1 % (V/V) GlutaMAX™-I (100x)

**CMF-PBS pH 7.4 (1 x)**

- 140 mM NaCl
- 2.7 mM KCl
- 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O
- 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Trypsin-EDTA-Lösung**

- 0.5 g Trypsin
  - 0.2 g EDTA
- in 1 Liter Puck's Kochsalzlösung

**2.2.3.1.2 Kultivierung von eukaryotischen Insektenzellen**

Die Insektenzelllinien *Spodoptera frugiperda* (Sf) 9 (Thermo Fisher Scientific) wurden in Grace's Insect Medium (Sf9, Sigma-Aldrich) bei 27 °C kultiviert. *Trichoplusia ni* High-Five™ (H5, BTI-Tn-5B1-4, ThermoFisher Scientific) wurden zur Kultivierung entweder auf Zellkulturplatten in Ex-Cell 405 SFM Medium (Sigma Aldrich) bei 27 °C oder in Suspension in Ex-Cell 405 SFM<sup>Susp</sup> Medium (Sigma-Aldrich) bei 27 °C und 80 rpm in einem Fernbach-Kolben kultiviert. Alle hier dargestellten Arbeiten mit eukaryotischen Insektenzellen wurden von Stefanie Wirth durchgeführt.

Zum Passagieren der schwach adhärent wachsenden Insektenzellen, wurde das Medium der Zellen entfernt und die Zellen in 8 ml Graces' Insect Medium oder Ex-Cell 405 SFM Medium aufgenommen. In gewünschter Verdünnung wurden die Zellen im Anschluss auf Zellkulturschalen ausplattiert oder unter eine definierte Zellzahl unter Verwendung der Neubauer Zählkammer ausgesät (Kap. 2.2.3.2).

**Grace's Insect Medium (Sf9)**

- 10 % (V/V) Fötale Kälberserum
- 10 µg/ml Gentamicin
- 2 mM L-Glutamin

**Ex-Cell 405 SFM Medium (H5)**

- 50 µg/ml Gentamicin

**Ex-Cell 405 SFM<sup>Susp</sup> Medium (H5)**

- 10 % (V/V) Poloxamer 188
- 2.5 µg/ml Fungizone<sup>®</sup> Amphotericin B
- 50 µg/ml Gentamicin

**2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer**

Mittels der Neubauer-Zählkammer kann die Anzahl an Zellen bestimmt werden. Hierzu wurden Zellen mit Trypsin-EDTA Lösung von Wachstumsplatten gelöst, in DMEM *complete* resuspendiert und sedimentiert. Die Zellen wurden in DMEM *complete* resuspendiert und 10 µl der Suspension unter das Deckglas der Neubauer-Zählkammer transferiert. Mittels Inversmikroskop wurde im Anschluss die Zellzahl pro Zählfeld der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese Anzahl wurde für alle vier Zählfelder bestimmt, durch vier geteilt und mit  $1 \times 10^4$  multipliziert. Die errechnete Zahl entspricht der Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension.

**2.2.3.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit PEI**

Zur Transfektion von HEK293 mit Polyethylenimin (PEI) wurden  $7 \times 10^6$  HEK293-Zellen am Vortag der Transfektion ausgesät (10 cm Zellkulturschale). Am folgenden Tag wurden 500 µl DMEM pur mit 27.5 µl PEI (1 µg/µl) versetzt und 5 µg des zu transfizierenden Plasmides zugegeben. Der Ansatz wurde gut durchmischt und 10 min bei RT inkubiert. Das Medium der HEK293-Zellen wurde entfernt und 3 ml DMEM *complete* zugegeben, bevor das Transfektionsgemisch tropfenweise appliziert wurde. Die Schale wurde kreuzförmig geschwenkt und für 3 h bei 37 °C, 8 % CO<sub>2</sub> und 90 % rel. Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden 6 ml DMEM *complete* zugeben. 24 h nach Transfektion erfolge ein Mediumwechsel.

**2.2.3.4 siRNA Transfektion von PANC-1-Zellen mit DMRIE-C bzw. Lipofectamine 2000**

Zur Transfektion von siRNA in PANC-1-Zellen wurde das Transfektionsreagenz DMRIE-C (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) sowie Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) genutzt.

PANC-1-Zellen wurden mit einer Zellzahl von  $8 \times 10^5$  (6-well) bzw.  $1.4 \times 10^6$  (60 mm) bzw.  $5.5 \times 10^6$  (10 cm) am Vortag der Transfektion ausgesät. Zur Transfektion von

PANC-1-Zellen mit DMRIE-C bzw. Lipofectamine 2000 wurden die Lösungen A und B in OptiMEM hergestellt (Tab. 17 und Tab. 18), 10 min bei RT inkubiert und im Anschluss Lösung A in B überführt. Nach gründlicher Durchmischung, sowie 10 (DMRIE-C) bzw. 25-minütiger (Lipofectamine 2000) Inkubation bei RT wurde das Transfektionsgemisch zu den Zellen gegeben, deren Medium zuvor auf die in Tab. 17 sowie Tab. 18 aufgelisteten Volumina reduziert worden ist. Die Schalen wurden kreuzförmig geschwenkt und für 6 h bei 37 °C, 8 % CO<sub>2</sub> und 90 % rel. Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 6 h erfolgte ein Wechsel des Mediums auf DMEM *complete*.

**Tab. 17: Pipettierschema für siRNA Transfektionen in PANC-1 unter Verwendung von DMRIE-C**

Ansatzgröße	Lösung A	Lösung B	DMEM <i>complete</i> reduziert auf	siRNA Konzentration
6-well	100 µl OptiMEM + 5 µl siRNA (10 µM)	100 µl OptiMEM + 10 µl DMRIE-C	400 µl	80 nM

**Tab. 18: Pipettierschema für siRNA Transfektionen in PANC-1 unter Verwendung von Lipofectamine 2000.**

Ansatzgröße	Lösung A	Lösung B	DMEM <i>complete</i>	siRNA Konzentration
6-well	100 µl OptiMEM + 5 µl siRNA (10 µM)	100 µl OptiMEM + 7.5 µl Lipofectamine 2000	1.3 ml	35 nM
60 mm	230 µl OptiMEM + 12 µl siRNA (10 µM)	230 µl OptiMEM + 20 µl Lipofectamine 2000	2 ml	35 nM
10 cm	600 µl OptiMEM + 25 µl siRNA (10 µM)	600 µl OptiMEM + 40 µl Lipofectamin 2000	6 ml	35 nM

### 2.2.3.5 siRNA Transfektion von Colo699-Zellen mit DharmaFECT 1

Zur transienten Transfektion von Colo699-Zellen wurde das Transfektionsreagenz DharmaFECT 1 (Horizon Discovery, Cambridge, Großbritannien) verwendet.

9 x 10<sup>5</sup> (6-well) bzw. 7 x 10<sup>6</sup> (10 cm) Colo699-Zellen wurden am Vortag der Transfektion ausplattiert. Zur Transfektion wurden die Lösungen A und B (Tab. 19) angesetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Beide Lösungen wurden vereint, gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Das Medium der Zellen wurde auf 1.3 ml bzw. 6 ml reduziert und das



Transfektionsgemisch tropfenweise zugegeben. Die Schalen wurden kreuzförmig geschwenkt und für 6 h bei 37 °C, 8 % CO<sub>2</sub> und 90 % rel. Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Mediumwechsel unter Verwendung von DMEM *complete*.

**Tab. 19: Pipettierschema für siRNA Transfektionen in Colo699 unter Verwendung von DharmaFECT 1.**

Ansatzgröße	Lösung A	Lösung B	DMEM <i>complete</i> – reduziert auf	siRNA Konzentration
6- <i>well</i>	100 µl DMEM + 5 µl siRNA (10 µM)	100 µl DMEM + 7.5 µl DharmaFECT 1	1.3 ml	35 nM
10 cm	600 µl DMEM + 15 µl siRNA (10 µM)	600 µl DMEM + 25 µl DharmaFECT 1	6 ml	25 nM

### 2.2.3.6 Migrationsassay

Zur Analyse des Migrationsverhaltens von PANC-1 und Colo699-Zellen, wurden  $8 \times 10^5$  (PANC-1 pro 6*well*) bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen (Colo699 pro 6*well*) am Vortag der siRNA Transfektion ausplattiert. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen mit siGal-8 oder siControl (Tab. 10) transfiziert (Kap. 2.2.3.4 und 2.2.3.5) und für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden mit 10 µg/ml (PANC-1) bzw. mit 1 µg/ml (Colo699) Mitomycin-C für 2 h behandelt, um die Proliferation der Zellen zu unterbinden. Drei parallele *Scratches* wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze (10 µl) in den Zellrasen gezogen und abgeschabte Zellen durch dreimaliges Spülen mit DMEM ohne Zusätze entfernt. 2 ml DMEM pur wurden zugegeben und das 6*well* im EVOS FL Auto 2 (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) für die nächsten 48 h inkubiert. Dabei wurden Aufnahmen von 6 zufällig ausgewählten Punkten an jedem Scratch eines *well*s in dreistündigen Abständen getätigt. Der Versuch wurde 72 h nach Transfektion beendet, die Aufnahmen gesichert, mit Hilfe der Fiji Software ausgewertet (Kap. 2.2.5.3) und die Zellen in Kloog-Puffer inklusive Protease und Phosphatase Inhibitoren lysiert (Kap. 2.2.4.1).

### 2.2.3.7 Proliferationsassay

Zur Analyse der Proliferation wurden PANC-1-Zellen in 6*well*s ausgesät und mit siControl oder siGal-8 siRNA (Tab. 10) transfiziert (Kap. 2.2.3.4). 24 h nach Transfektion wurden die transfizierten Zellen in einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  in 12*well*s ausgesät und

für weitere 12 - 72 h inkubiert. Aufnahmen von 5 - 6 zufällig gewählten Punkten innerhalb der *wells* wurden in 12 h Intervallen getätigt und anschließend mit Hilfe der Fiji Software ausgewertet (Kap. 2.2.5.4).

#### **2.2.3.8 Transfektion von Sf9-Zellen mit Baculovirus DNA**

Sf9-Insektenzellen ( $1 \times 10^6$  Zellen pro *6well*) wurden eine Stunde vor Transfektion ausgesät und bei 27 °C inkubiert. Eine Lösung aus 2 µg pVL1393-Plasmid-DNA, 5 µl Pro-Green bzw. ProEasy-Baculovirus-DNA (LuBioScience, Zürich, Schweiz) und 100 µl Grace's Insect Medium ohne Zusätze wurde zu einer Lösung aus 10 µl GeneJuice-Transfektionsreagenz (Merck, Darmstadt) und 100 µl Grace's Insect Medium ohne Zusätze gegeben. Die Lösung wurde gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Das Medium wurde aus den *6wells* entfernt und 800 µl Grace's Insect Medium ohne Zusätze zugegeben. Der Transfektionsmix wurde tropfenweise zugegeben und die Zellen für 48 h bei 27 °C inkubiert. Nach 48 Stunden wurde der Baculovirus-haltige Überstand steril abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

#### **2.2.3.9 Amplifikation von Baculoviren**

Zur Amplifikation von Baculoviren wurde der Überstand der mit Baculovirus-DNA transfizierten Sf9-Zellen abgenommen. Nach Sedimentation bei 161 x g für 3 min wurde der Überstand abgenommen und 1.5 ml zu  $6 \times 10^6$  Sf9-Zellen in 8 ml Grace's Insect Medium pro 10 cm Zellkulturschale zugegeben. Die Zellen wurden für 7 – 9 Tage kultiviert, der Mediumüberstand gesammelt, sedimentiert und der Überstand für eine weitere Amplifikation genutzt (Lagerung bei 4 °C). Insgesamt wurden je nach transfiziertem Plasmid 4-5 Amplifikationen durchgeführt, bis eine Infektion von nahezu allen Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop aufgrund des zusätzlich exprimierten EGFP-Proteins oder nach Herstellung von Proteinlysaten und Analyse des entsprechenden Proteins im Western Blot nachweisbar gewesen ist.

#### **2.2.3.10 Behandlung von H5-Insektenzellen mit Baculovirus-haltigem Überstand**

Um eine größere Ausbeute an rekombinantem Protein zu erhalten, wurden H5-Insektenzellen in einer Suspensionskultur verwendet, da diese Zellen im Vergleich zu den Sf9-Zellen deutlich mehr Protein nach Virusinfektion produzieren. H5-Zellen ( $1 \times 10^9$ ) wurden zusammen mit 10 ml einer potenten Viruslösung für 1 h bei 27 °C und 80 rpm

in einem Fernbach-Kolben inkubiert. 150 ml Ex-Cell 405 SFM<sup>Susp</sup> wurden zugegeben und die Zellen bei 27 °C und 80 rpm für 96 h inkubiert.

Zum Ernten der Zellen wurde die Zellsuspension bei 161 x g für 6 min sedimentiert, mit TBS gewaschen und portioniert. Nach erneuter Sedimentation bei 161 x g für 6 min wurden die Zellpellets in beliebigem Puffer aufgenommen oder bei -80 °C gelagert.

#### **TBS (1 x)**

10 mM Tris HCl, pH 7.4  
150 mM NaCl

## **2.2.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten**

Proteinlysate für Proteininteraktionsstudien wurden in Gold-Lyse-Puffer (500 µl / 10 cm Zellkulturschale), Proteinlysate für Phosphorylierungsstudien in Kloog-Puffer (500 µl / 10 cm Zellkulturschale) lysiert. Hierzu wurden die Zellen mit 5 ml TBS gewaschen, im entsprechenden Puffer aufgenommen und durch 5 – 8 Züge durch eine Kanüle (25G) homogenisiert. Zur Sedimentation von Zelldebris wurde das Zelllysat bei 16100 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein Reaktionsgefäß auf Eis zur weiteren Verwendung überführt.

#### **Gold-Lyse-Puffer (1 x)**

20 mM Tris HCl, pH 7.9  
50 mM NaCl  
10 % (V/V) Glyzerin  
1 % (V/V) Triton™ X-100  
0.05 % (m/V) Natriumdesoxycholat  
1 % (V/V) Proteaseinhibitormix

#### **Kloog-Puffer (1 x)**

20 mM Tris HCl, pH 7.6  
200 mM NaCl  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.5 % (V/V) Igepal CA-630 (NP-40)  
0.5 % (m/V) Natriumdesoxycholat  
1 mM DTT  
1 % (V/V) Proteaseinhibitormix

10 mM	Natriumpyrophosphat
25 mM	$\beta$ -Glycerophosphat
2 mM	Natriumorthovanadat

#### **Proteaseinhibitormix (100x)**

1.39 mM	Pefabloc
15 $\mu$ M	Aprotinin
21 $\mu$ M	Leupeptin
50 $\mu$ M	Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)

#### **2.2.4.2 Präparation von partikulären und löslichen Proteinen**

Zur Präparation von partikulären (membranösen, P100) und löslichen (cytosolischen, S100) Proteinen wurde das Proteinlysate bei 100000 x g fraktioniert. Dazu wurden eine konfluente 60 mm Schale mit 5 ml TBS (1 x) gewaschen, 250  $\mu$ l HEPES Puffer auf die Zellen gegeben und für 10 min zum Quellen auf Eis gestellt. Das Zelllysate wurde in Reaktionsgefäße überführt und mit einer Pipettenspitze (1000  $\mu$ l) und durch 5-8 Züge mit einer Kanüle (20G) homogenisiert. Zur Abtrennung von Zelldebris und Zellkernen wurde das Zelllysate für 10 min bei 600 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugationsgefäße überführt und für 1 h bei 100000 x g und 4 °C pelletiert. Die löslichen Proteine der S100 Fraktion, welche sich im Überstand befinden wurden in ein Reaktionsgefäß auf Eis überführt, das Pellet der partikulären Fraktion wurde mit 250  $\mu$ l HEPES Puffer überschichtet und für weitere 15 min bei 100000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50  $\mu$ l Gold-Lyse-Puffer aufgenommen.

#### **HEPES-Puffer (1 x)**

50 mM	HEPES pH 7.6
8.6 % (m/V)	Saccharose
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 % (V/V)	Proteaseinhibitormix

#### **2.2.4.3 Proteinbestimmung mittels des *BCA Protein Assays***

Zur Bestimmung der Proteinlysatkonzentration wurde die kommerziell erhältliche *BCA Protein Assay Reagent A* (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) Lösung verwen-

det. Unter Verwendung einer BSA-Stammlösung mit der definierten Proteinkonzentration von 2 mg/ml wurde eine Standardreihe mit aufsteigender BSA-Konzentration (von 0 µg – 25 µg pro *well*) in eine 96*well* Platte pipettiert (Volumen pro *well*: 20 µl). 5 µl des Proteinlysates wurde mit 45 µl ddH<sub>2</sub>O vermischt und je 20 µl in zwei *wells* der 96*well* Platte für eine Doppelbestimmung der Probe pipettiert. Zu 50 Volumenteilen *BCA Protein Assay Reagent A* wurde ein Volumenteil 4 % (m/V) Kupfer-(II)-Sulfat Lösung zugefügt, vermischt und je 180 µl zu den *wells* der 96*well* Platte gegeben. Die Platte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss im ELx800 Absorbance Microplate Reader analysiert. Über die Standardreihe konnte mittels der gemessenen OD<sub>652nm</sub> der Proteinlysate die Konzentration dieser mathematisch bestimmt werden.

#### **2.2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Unter Verwendung von verschiedenen Verhältnissen aus Acrylamid, Bisacrylamid und Wasser kann eine unterschiedliche Auftrennung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel erfolgen. Werden kleinere Prozentigkeiten (7.5 - 10 %) verwendet, werden größere Proteine (> 40 kDa) aufgetrennt. Wird eine hohe Prozentigkeit genutzt (12.5 – 15 %), werden Proteine unter 40 kDa effizient aufgetrennt. Die entsprechenden Zusammensetzungen des Sammel- und Trenngels für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) sind in Tab. 20 dargestellt. Ein Zeitraum von ≥ 3 h wurde für die Polymerisation des Trenngels eingehalten, während das Sammelgel für etwa 20 min polymerisierte.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde ein Sammelgel anhand von Tab. 20 auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Erzeugung von Probenaschen eingeführt. Nach Polymerisation wurde der Kamm gezogen, das Gel in eine Laufkammer (Sigma-Aldrich) eingespannt und mit SDS-Laufpuffer befüllt.

Die Proteinlysatsproben wurden mit mindestens 20 % (V/V) SDS-Probenpuffer (5x) versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Nach Auftragen der Proben erfolgte bei 80 V für 15 min eine Konzentration der Proben im Sammelgel, bevor die Elektrophorese bei 110 V für ca. 60-90 min (abhängig von der Prozentigkeit des Gels) fortgesetzt wurde.

Tab. 20: Zusammensetzung des Polyacrylamidtrenn- und Sammelgels.

SDS-Gel (4 kleine Gele, 8 x 5 cm)	7.5 %	10 %	12.5 %	13.5 %	15 %	Sammel- gel
30 % (m/V) Acrylamid	10 ml	13 ml	16.25 ml	17 ml	19.5 ml	0.76 ml
2 % (m/V) Bisacrylamid	4 ml	5 ml	6 ml	6.5 ml	8 ml	0.3 ml
3 M Tris/HCl pH 8.8	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6.8	-	-	-	-	-	0.76 ml
10 % (m/V) SDS	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.06 ml
60 % (m/V) Saccharose	-	-	-	-	-	1.5 ml
ddH <sub>2</sub> O	20.5 ml	16.5 ml	12.25 ml	11 ml	7 ml	2.6 ml
TEMED	0.04 ml	0.04 ml	0.04 ml	0.04 ml	0.04 ml	0.008 ml
10 % (m/V) APS	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml	0.08 ml

**SDS Laufpuffer (1 x)**

50 mM	Tris/HCl
500 mM	Glycin
0.1 % (m/V)	SDS

**SDS Probenpuffer (5x)**

200 mM	Tris HCl
5 mM	EDTA
1 M	Saccharose
1 mM	DTT
2 % (m/V)	SDS
0.1 % (m/V)	Bromphenolblau

**2.2.4.5 Coomassie-Blau Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen**

Für eine Färbung von Proteinen, die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt vorliegen, wurde die Coomassie-Blau Färbung genutzt. Nach erfolgter SDS-PAGE wird das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und das Trenngel über Nacht in Coomassie Brilliant Blau Lösung eingelegt. Am folgenden Tag wurde die Lösung entfernt und gegen eine Entfärbelösung ersetzt. Nach etwa 4 - 6 h wurde das Gel mittels eines handelsüblichen Flachbettscanners dokumentiert.

### **Coomassie Brilliant Blau Lösung**

- 0.1 % (m/V) Coomassie® *Brilliant Blue* R-250 (Merck, Darmstadt)
- 20 % (V/V) Methanol
- 10 % (V/V) Essigsäure

### **Entfärbelösung**

- 10 % (V/V) Eisessig
- 12.5 % (V/V) Isopropanol

### **2.2.4.6 Western Blot**

Um aufgetrennte Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran zur Detektion mit spezifischen Antikörpern zu überführen, wurde die Western Blot Technik angewandt. Hierzu wurden zwei in Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere (0.34 mm) auf zwei Schwammtücher gelegt. Auf das Whatman Papier wurde die Amersham Protran Nitrocellulosemembran (0.45 µm, GE Healthcare) gelegt und auf diese das Polyacrylamidgel. Es folgten erneut zwei Schichten Whatman-Papier und zwei abschließende Lagen Schwammtücher. Dieses sogenannte *Sandwich* wurde mit Orientierung der Nitrocellulosemembran in Richtung der positiven Elektrode in die Blot-Kammer eingeführt. Das Blotting der Proteine erfolgte bei 70 V für 45 min (endogene Ras-Proteine und Proteine < 30 kDa), bei 70 V für 1 h (Proteine zwischen 30 und 70 kDa) oder bei 20 V für 12 h (Proteine > 70 kDa).

Im Anschluss wurde die Nitrocellulosemembran in ddH<sub>2</sub>O von den Resten des Transferpuffers befreit und in eine Ponceau-Rot Lösung überführt. Die Membran wurde für zwei Minuten in MilliQ Wasser gewaschen und die Proteinfärbung mittels eines Flachbettscanners protokolliert. Mit Hilfe von TBS (1 x) wurde die Ponceau-Rot Färbung entfernt und die Membran wurde in die gewünschte Blockierlösung für eine Stunde bei RT überführt.

### **Transferpuffer (1 x)**

- 25 mM Tris HCl
- 0.1 % (m/V) SDS
- 1.5 % (m/V) Glycin
- 20 % (V/V) Methanol

### **Ponceau-Rot Lösung**

0.2 % (m/V) Ponceau S

3 % (m/V) Trichloressigsäure

#### **2.2.4.7 Detektion von Proteinen mit spezifischen primären Antikörpern**

Zur Detektion von Proteinen über spezifische primäre Antikörper wurde die in Blockierlösung inkubierte Nitrocellulosemembran mit TBS (1 x) gewaschen und über Nacht in definierter Antikörperlösung (Tab. 13) bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert.

#### **2.2.4.8 Nachweis der primären Antikörper mittels sekundärer Antikörper**

Um primäre Antikörper zu detektieren, wurden sekundäre Antikörper verwendet, die gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichtet sind. In dieser Arbeit wurden zum einen Fluorochrom-gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet, die mittels des LICOR Odyssey CLx Systems analysiert wurden oder zum anderen HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper genutzt, die unter Verwendung einer Mischung aus Luminol und stabiler Peroxidlösung im Fusion SL4-3500.WL nachgewiesen wurden.

Die Primärantikörperlösung wurde entfernt und die Nitrocellulosemembran zweimal mit TBS-T (1 x) und einmal mit TBS (1 x) für jeweils 5 min gewaschen. Im Anschluss wurde die Nitrocellulose mit dem sekundären Antikörper (Tab. 14) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran erneut zweimal mit TBS-T (1 x) und einmal mit TBS (1 x) für jeweils 5 min gewaschen.

Bei Verwendung von Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörpern wurde der Blot auf die Glasplatte des LICOR Odyssey CLx gelegt und mit automatischen Intensitätseinstellungen der Software ImageStudio Version 5.2.5 gescannt.

Wurde hingegen ein HRP-gekoppelter Antikörper verwendet, wurden *SuperSignal West Pico PLUS Luminol/Enhancer* und *SuperSignal West Pico PLUS Stable Peroxide* (Thermo Fisher Scientific) in gleichen Teilen gemischt und die Membran für zwei Minuten in der Lösung inkubiert. Im Anschluss wurde die Lichtemission, die bei Oxidation des Luminols durch die Meerrettichperoxidase entsteht unter Verwendung der Lichtsensitiven Kamera des Fusion SL4-3500.WL nachgewiesen.

#### **TBS-T (1 x)**

10 mM Tris HCl, pH 7.4

150 mM NaCl

1 % (V/V) Tween®-20



### 2.2.4.9 Ras-Aktivitätsassay

Zur Bestimmung der Aktivität von endogenen und ekto exprimierten Ras-Proteinen wurden Ras-Aktivitätsassays nach Stähle et al. [95] von Marisa Heipel in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit Plasmiden und PANC-1-Zellen mit siRNA transfiziert und die Ras-Aktivität ermittelt.

Die Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium inkubiert, anschließend in Ras-RIPA-Puffer lysiert (bei HEK293: Ras-RIPA Puffer ohne Na-Deoxycholat), mit Hilfe von fünf bis acht Hüben einer Kanüle (18G) homogenisiert und Zelldebris bei 16100 x g sedimentiert. Für den Assay wurden 25 µl Glutathion-Sepharose4B *beads* zweimal mit je 200 µl Ras-RIPA-Puffer gewaschen. Die in *E. coli* produzierte GST-Ras-binding-domain (GST-RBD) wurde je nach Quantität der Expression in *E. coli* in einer Menge von 50 - 100 µg zugegeben und für 30 min bei 4 °C *end-over-end* rotierend inkubiert. Die *beads* wurden erneut zweimal mit 300 µl Ras-RIPA Puffer gewaschen, bevor 0.5 – 1 mg des HEK293- bzw. PANC-1-Lysates zugegeben wurde. Nach 1 h bei 4 °C *end-over-end* rotierend wurden die *beads* dreimal mit je 300 µl Ras-RIPA Puffer gewaschen und die *beads* nahezu restlos mit einer Hamiltonspritze trocken gesaugt. 20 µl SDS-Probenpuffer (5x) wurden zugegeben, die Proben bei 95 °C für 8 min aufgekocht und danach auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Western Blot Verfahren weiter analysiert.

#### Ras-RIPA Puffer (1 x)

50 mM	Tris HCl, pH 8.0
150 mM	NaCl
0.5 % (V/V)	Na-Desoxycholat
1 % (V/V)	NP-40
0.1 % (V/V)	SDS
1 %	Proteaseinhibitormix (100x)

### 2.2.4.10 Ko-Immunopräzipitation und *in vitro*-Interaktionsstudien unter Verwendung des *µMacs Isolation Kits*

In der hier vorliegenden Arbeit wurden diverse Ko-Immunopräzipitation- und *in vitro*-Interaktionsstudien unter Verwendung von *µMacs Isolation Kits* (Miltenyi Biotec) durchgeführt.

Zur Präzipitation von EGFP-getaggten- bzw. HA-getaggten-Proteinen wurde das  $\mu$ Macs GFP Isolation Kit bzw. das  $\mu$ Macs HA Isolation Kit verwendet. Nicht-getaggte-Proteine konnten unter Verwendung von  $\mu$ Macs Protein A/G Microbeads und einem entsprechenden Antikörper präzipitiert werden.

Bei allen Ko-Präzipitationen erfolgte die Inkubation aus Proteinlysate,  $\mu$ Macs Microbeads (25  $\mu$ l pro Ansatz) und ggf. des Antikörpers (2  $\mu$ g) für 2 h bei 4 °C und *end-over-end* Rotation.

Wurde eine *in vitro*-Interaktionsstudie durchgeführt, so wurde zunächst das Proteinlysate, welches das zu präzipitierende Protein beinhaltet mit den entsprechenden  $\mu$ Macs Microbeads für 30 min bei 4 °C *end-over-end* rotierend inkubiert. Im Anschluss wurden 2 mg des Proteinlysates, welches den Interaktionspartner des präzipitierten Proteins beinhaltet, zu dem Gemisch zugegeben und für weitere 2 h *end-over-end* rotierend inkubiert.

Für alle Präzipitationsvarianten wurden  $\mu$ Columns (Miltenyi Biotec) mit 200  $\mu$ l Gold-Lyse-Puffer equilibriert und das Proteinlysate/Microbeads Gemisch nach Anleitung des Herstellers auf die Säule gegeben. Zum Waschen der Säule wurde viermal 200  $\mu$ l Waschpuffer 1 und zweimal 100  $\mu$ l Waschpuffer 2 zugegeben.

Zur Elution der präzipitierten Proteine wurde die Säule mit 20  $\mu$ l Elutionspuffer (95 °C) für 5 min inkubiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Weitere 35  $\mu$ l Elutionspuffer (95 °C) wurden zugegeben, der Durchfluss in einem Reaktionsgefäß gesammelt, mit 8  $\mu$ l SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Die Analyse des Präzipitats erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE und des Western Blots.

#### **Waschpuffer 1 (1 x)**

50 mM	Tris HCl, pH 8.0
150 mM	NaCl
1 % (V/V)	Igepal CA-630 (NP-40)
0.5 % (m/V)	Natriumdeoxycholat
0.1 % (V/V)	SDS

#### **Waschpuffer 2 (1 x)**

20 mM	Tris HCl, pH 7.5
-------	------------------

**Elutionspuffer (1 x)**

50 mM	Tris HCl, pH 6.8
50 mM	DTT
1 % (V/V)	SDS
1 mM	EDTA
0.005 % (V/V)	Bromphenolblau
10 % (V/V)	Glyzerin

**2.2.4.11 Aufreinigung von His-getaggten Proteinen unter Verwendung von Nickel-NTA Agarose**

H5-Insektenzellen wurden wie in Kap. 2.2.3.10 beschrieben mit Baculovirus-haltigem Überstand infiziert, um die beiden Proteine His-K-Ras(G12V) und His-Galectin-8 *long* zu exprimieren. Zur Aufreinigung der His-getaggten Proteine wurde ein Pellet aus 50 ml H5-Zellsuspension in 1 ml Kloog<sup>His</sup>-Puffer aufgenommen und mit einer Kanüle (25G) homogenisiert. Im Anschluss wurden unlösliche Proteine und Zellbestandteile bei 16100 x g für 10 min und 4 °C sedimentiert. Pro Ansatz wurden 200 µl Nickel-NTA (Ni-NTA) Agarose Suspension (SERVA, Heidelberg) entnommen, bei 500 x g für 2 min sedimentiert und mit 1 ml Bindungspuffer<sup>His</sup> equilibriert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 500 x g wurde der Überstand des H5-Proteinlysates zugegeben. Die Suspension wurde vorsichtig durchmischt und für 60 min *end-over-end* rotierend bei 4 °C inkubiert. Die Agarosematrix wurde viermal mit je 1 ml Waschpuffer<sup>His</sup> für je 15 min *end-over-end* gewaschen. Imidazol-haltiger Elutionspuffer<sup>His</sup> wurde für die Elution der Proteine von der Agarosematrix verwendet. Hierzu wurde die Agarosematrix dreimal mit Elutionspuffer<sup>His</sup> für je 10 min *end-over-end* rotierend bei RT inkubiert und im Anschluss für 2 min bei 500 x g sedimentiert. Im Überstand ist nun das eluierte Protein vorhanden, dessen Reinheit nach Auftragen auf ein Polyacrylamidgel mittels Coomassie-Blau Färbung überprüft wurde.

**Kloog<sup>His</sup>-Puffer (1 x)**

50 mM	Tris HCl, pH 7.6
200 mM	NaCl
20 mM	MgCl <sub>2</sub>
0.5 % (V/V)	Igepal CA-630 (NP-40)
1 mM	DTT

- 0.5 mM GDP
- 0.5 % (V/V) Natriumdesoxycholat
- 10 mM Imidazol
- 1 % (V/V) Proteaseinhibitormix

**Bindungspuffer<sup>His</sup> (1 x)**

- 50 mM Tris HCl, pH 7.6
- 200 mM NaCl
- 20 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.5 % (V/V) Igepal CA-630 (NP-40)
- 1 mM DTT
- 0.5 mM GDP
- 10 mM Imidazol
- 1 % (V/V) Proteaseinhibitormix

**Waschpuffer<sup>His</sup> (1 x)**

- 50 mM Tris HCl, pH 7.6
- 200 mM NaCl
- 20 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.5 mM GDP
- 20 mM Imidazol
- 1 % (V/V) Proteaseinhibitormix

**Elutionspuffer<sup>His</sup> (1 x)**

- 50 mM Tris HCl, pH 7.6
- 200 mM NaCl
- 20 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.5 mM GDP
- 250 mM Imidazol
- 1 % (V/V) Proteaseinhibitormix

#### 2.2.4.12 Dot-Blot

Mit Hilfe des Dot-Blots kann die Interaktionsfähigkeit von zwei Proteinen analysiert werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde posttranslational modifiziertes His-K-Ras(G12V) bzw. His-Gal-8 *long* in Mengen von 0.2 – 200 bzw. 0.1 – 100 ng auf eine Amersham Protran Nitrocellulosemembran (0.45 µm, GE Healthcare) in einem Gesamtvolumen von je 3 µl pro Dot aufgetropft. Bei Verwendung von His-K-Ras(G12V) im Dot-Blot Versuch wurden Kontrollen in Form von rekombinanten, nicht-posttranslational modifiziertem His-K-Ras (50 und 100 ng; JenaBiosciences, #PR-239), rekombinanten Galectin-8 *short* (1, 10 und 25 ng; R&D, #1305-GA-050/CF) und rabbit-IgG (50 ng; Dako, #X0903) auf die Nitrocellulosemembran aufgetropft. Bei Verwendung von His-Gal-8l im Dot-Blot Versuch wurden folgende Kontrollen verwendet: rekombinantes Galectin-8 *short* (25 und 100 ng; R&D, #1305-GA-050/CF), rekombinantes, nicht-posttranslational modifiziertes His-K-Ras (1, 10 und 50 ng; JenaBiosciences, #PR-239) und rabbit-IgG (50 ng; Dako, #X0903). Diese Vorgänge wurden auf einer zweiten Nitrocellulosemembran wiederholt. Im Anschluss wurde die Membranen für 1 h in 3 % BSA/TBS-T blockiert. 1 µg eines zweiten gereinigten Proteins – rekombinantes Gal-8 (R&D, #1305-GA-050/CF) bzw. HA-K-Ras(G12V) (Prof. Dr. Klaudia Giehl, [77]) – wurde in Kloog-Puffer (1 x) zu der entsprechenden Nitrocellulosemembran zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran zweimal mit TBS-T (1 x) und einmal mit TBS (1 x) für je 5 min gewaschen. Wurde His-K-Ras(G12V) auf die Nitrocellulosemembran aufgetropft wurde auf eine der Nitrocellulosemembranen ein anti-Galectin-8- auf die andere ein anti-Ras-Antikörper appliziert. Wurde His-Gal-8 *long* aufgetropft, so wurde eine der Nitrocellulosemembranen mit anti-HA/anti-Ras- und die andere mit einem anti-Galectin-8 Antikörper für 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach einer Stunde dieser Inkubationszeit wurde dieser Lösung ein HRP-gekoppelter bzw. fluorchrom-gekoppelter sekundärer anti-mouse Antikörper zugegeben. Die Membran wurde erneut zweimal mit TBS-T (1 x) und einmal mit TBS (1 x) für je 5 min gewaschen und im Anschluss mittels LICOR Odyssey CLx bzw. Fusion SL4-3500.WL analysiert.

#### 2.2.4.13 Immunfluoreszenz

Zur intrazellulären Lokalisation von Proteinen wurden PANC-1-Zellen in einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen pro *well* eines 6*well* ausgesät. In jedem *well* befanden sich drei Deckgläser (Ø 13 mm). 24 h nach Aussaat der Zellen, wurde das Medium entfernt, die

Zellen einmal mit CMF-PBS (1 x) gewaschen und zum Fixieren mit 2 % Paraformaldehyd in CMF-PBS für 10 min überschichtet. Die Zellen wurden einmal mit CMF-PBS (1 x) gewaschen und unter Verwendung von 0.05 % Triton-X100 in CMF-PBS für 10 min permeabilisiert. Erneut wurden die Zellen mit CMF-PBS (1 x) gewaschen und im Anschluss mit 3 % BSA in CMF-PBS für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit CMF-PBS (1 x) wurde der primäre Antikörper (Tab. 13) in 0.3 % BSA/CMF-PBS verdünnt und für 1 h in einer feuchten Kammer direkt auf das Deckglas appliziert. Der Antikörper wurde gründlich abgesaugt, die Zellen mit CMF-PBS (1 x) gewaschen und der fluorochrom-gekoppelte sekundäre Antikörper (Tab. 14) in 0.2 % BSA/CMF-PBS verdünnt für 1 h in einer feuchten Kammer auf die Deckgläser gegeben. Nach gründlichem Absaugen des Antikörpers wurden die Deckgläser einmal mit 0.02 % Tween-20 in CMF-PBS (1 x) und zweimal mit CMF-PBS (1 x) gewaschen, bevor diese in ddH<sub>2</sub>O von Salzen befreit wurden und mit Hilfe von Elvanol auf Objektträger eingedekelt wurden.

Die Präparate wurden mit dem Leica DMI8 S Mikroskop (Leica, Wetzlar) analysiert. Hierbei wurde die spezielle Software „*THUNDER Imager 3D Live Cell & 3D Cell Culture*“ in Kombination mit der LAS X 3.6.20104.0 verwendet. Als Kamera wurde die Leica DFC9000GTC (Leica, Wetzlar), als Lichtquelle SPECTRA-X (Lumencor, Beaverton, USA) und als Objektiv das 63x/1.4 HC PL APO Öl-Objektiv (Leica, Wetzlar) genutzt.

#### **Elvanol-Lösung**

- 10 % (m/V) Mowiol 4-88 (Merck)
- 25 % (V/V) Glyzerin
- 50 % (V/V) 0.2 M Tris/HCl, pH 8.5

#### **2.2.5 Datenanalyse und Statistik**

In dieser Arbeit wurde die Bearbeitung von Rohdaten in Microsoft Excel 2016 durchgeführt. Die prozessierten Rohdaten wurden in GraphPad Prism (Version 5.03) importiert und graphisch dargestellt, sowie statistisch mittels zweiseitigem Einstichproben t-test auf Signifikanz überprüft. Hierbei gelten die folgenden Signifikanzstufen: \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

### 2.2.5.1 Densitometrische Bestimmungen

In der hier vorliegenden Arbeit wurden densitometrische Intensitätswerte, die mit Hilfe der LICOR ImageStudio Software erzeugt wurden, unter Verwendung von Microsoft Excel 2016 weiterverarbeitet und auf eine Kontrolle normalisiert.

### 2.2.5.2 Aminosäuresequenz-Analyse

Um die Aminosäuresequenzen verschiedener Proteine untereinander zu vergleichen, wurde das online zugängliche Tool „MultAlin – Multiple sequence alignment by Florence Corpet“ verwendet [96]. Die Aminosäuresequenzen der Proteine K-Ras4B, H-Ras, N-Ras, Rac1, Rac1b, RhoA, RhoC und Cdc42 wurden aus der uniprot.org Datenbank extrahiert (Tab. 21).

Tab. 21: Verwendete Aminosäuresequenzen und deren UniProtKB-Nummer.

Protein	UniProtKB	Protein	UniProtKB
K-Ras4B	P01116	Rac1b	Q59FQ0
H-Ras	P01112	RhoA	P61586
N-Ras	P01111	RhoC	P08134
Rac1	P63000	Cdc42	P60953

### 2.2.5.3 Auswertung von Migrationsassays

Zur Analyse der Migration von PANC-1-Zellen nach siGal-8 Transfektion im Vergleich zu einer *mock* Transfektion wurden die Zellen wie in Kap. 2.2.3.6 dargestellt ausplattiert, transfiziert, mit Mitomycin-C behandelt und drei *Scratches* pro *well* in den Zellrasen gezogen. Pro *well* wurden 6 Aufnahmen in Abständen von 3 h für einen Zeitraum von 51 h mittels des EVOS FL Auto 2 erzeugt (Kap. 2.2.3.6).

Die somit erhaltenen 17 Aufnahmen wurden zunächst mittels einer Batch-Datei (Maximilian Brell, Universität Würzburg, Wirtschaftsinformatik) bezüglich des entsprechenden *wells*, der Position im *Scratch* und dem Zeitpunkt der Aufnahme vorsortiert. Mit Hilfe von Fiji (Version 1.52i, [89]) wurden die sortierten Aufnahmen zu chronologisch geordneten *stacks* verarbeitet. Die Berechnung der Fläche der gesamten Spaltbreite eines jeden *Scratches* erfolgte mittels des *Scratch Assay Analyzer Plugins* von MiToBo (Universität Halle, Release 1.8.14, [97]) in Fiji. Das Plugin ermittelte die Fläche in Pixel<sup>2</sup> für jede einzelne Aufnahme eines *stacks*, welche nicht von Zellen eingenommen ist. Anhand der totalen Abmessung einer jeden Aufnahme ( $b * h = 1328 \text{ px} * 1048 \text{ px}$ )

konnte der Quotient aus Fläche und Höhe bestimmt werden, um somit die mittlere Breite des *Scratches* zu bestimmen. Da 1 px eines Bildes laut Definition von Thermo Fisher Scientific im 10 x Objektiv 0.8708  $\mu\text{m}$  entspricht, konnte eine Migration pro Stunde in  $\mu\text{m}$  in Bezug auf  $t_{0h}$  errechnet werden. Eine gewisse *lag*-Phase in den ersten 0 – 3 Stunden begründete unsere Analysestrategie die mittlere Zellwanderung zwischen 6 und 15 Stunden als Maß zu verwenden um die Migration der Zellen zu berechnen. Nach 15 h ließ die Wirkung von Mitomycin-C offensichtlich deutlich nach, da auch Proliferationseffekte zu beobachten waren. Die mittlere Zellwanderung zwischen 6 und 15 h wurde aus allen Messpunkten eines *wells* kalkuliert. Zum Schluss wurden die erhaltenen Werte auf die jeweiligen *mock*-Kontrollen der einzelnen Zelllinien normalisiert und graphisch dargestellt.

#### 2.2.5.4 Auswertung von Proliferationsassays

Zur Auswertung der Proliferationsassays wurden Aufnahmen des EVOS FL Auto 2 verwendet (Kap. 2.2.3.7). Die Zellzahl in jedem Bildausschnitt wurde zu den Zeitpunkten  $t_{0h}$  und  $t_{48h}$  unter Verwendung von Fiji (Version 1.52i, [89]) manuell bestimmt. Der Quotient aus Zellen zum Zeitpunkt  $t_{48h}$  und  $t_{0h}$  wurde für alle Messpunkte gemittelt. Ein weiterer Quotient aus 48 h und dem berechneten Quotienten der Zellzahlen zum Zeitpunkt  $t_{48h}/t_{0h}$  stellt die Verdopplungszeit dar. Die Verdopplungszeit wurde unter allen Versuchsansätzen gemittelt und graphisch dargestellt.

#### 2.2.5.5 Auswertung von Immunfluoreszenz-Aufnahmen

Um die Signalstärken zweier Fluoreszenz-Kanäle über einen bestimmten linearen Abschnitt innerhalb einer Immunfluoreszenz-Aufnahme zu quantifizieren wurde die Option „*Plot Profile*“ der Fiji Software (Version 1.52i) verwendet. Ein *merge*-Bild, eine Aufnahme des Cy-3-Kanals und eine des GFP-Kanals wurden in Fiji geöffnet und mittels des Tools „*Sync Windows*“ miteinander so synchronisiert, dass in allen drei Bildern eine exakt gleiche Aktion ausgeführt werden kann. Somit konnte eine exakt gleiche „*Straight line*“ in allen drei Bildern an der exakt gleichen Position mit einer Länge von 286 px ( $\cong 30 \mu\text{m}$ ) gezogen werden. Mittels der Funktion „*Plot Profile*“ wurde die Intensität der Grauwerte über den 30  $\mu\text{m}$  langen Abschnitt quantifiziert und die erhaltenen Daten in einem XY-Liniendiagramm in GraphPad Prism (Version 5.03) visualisiert. Die Zusammenstellung und Beschriftung der Bilder erfolgten mit der Inkscape-Software (Version 0.48.5).



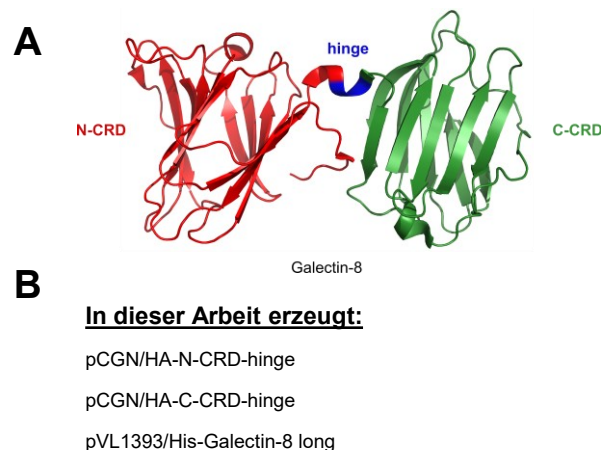
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Interaktionsstudien von Ras und Gal-8

#### 3.1.1 Erzeugung von Gal-8-Mutanten

Gal-8 besteht aus drei strukturellen Domänen, die N- und die C-terminale CRD sowie die *hinge*-Region (Abb. 3.1A). Diese Domänen wurden verwendet, um Gal-8-Mutanten zu erzeugen, sodass die Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras charakterisiert werden kann. Die HA-getaggtten Gal-8-Mutanten HA-N-CRD- und HA-C-CRD wurden bereits in vorherigen Arbeiten erzeugt und liegen im pCGN-Vektor kloniert vor [90].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die cDNA der Gal-8-Mutanten HA-N-CRD-*hinge* und HA-C-CRD-*hinge* in den pCGN-Vektor, sowie die cDNA von Gal-8 *long* in den pVL1393-Vektor kloniert (Abb. 3.1B). Die erzeugten Plasmide und Sequenzen sind im Anhang als Plasmidkarten zu finden (Kap. 8.1.1 - 8.1.3).



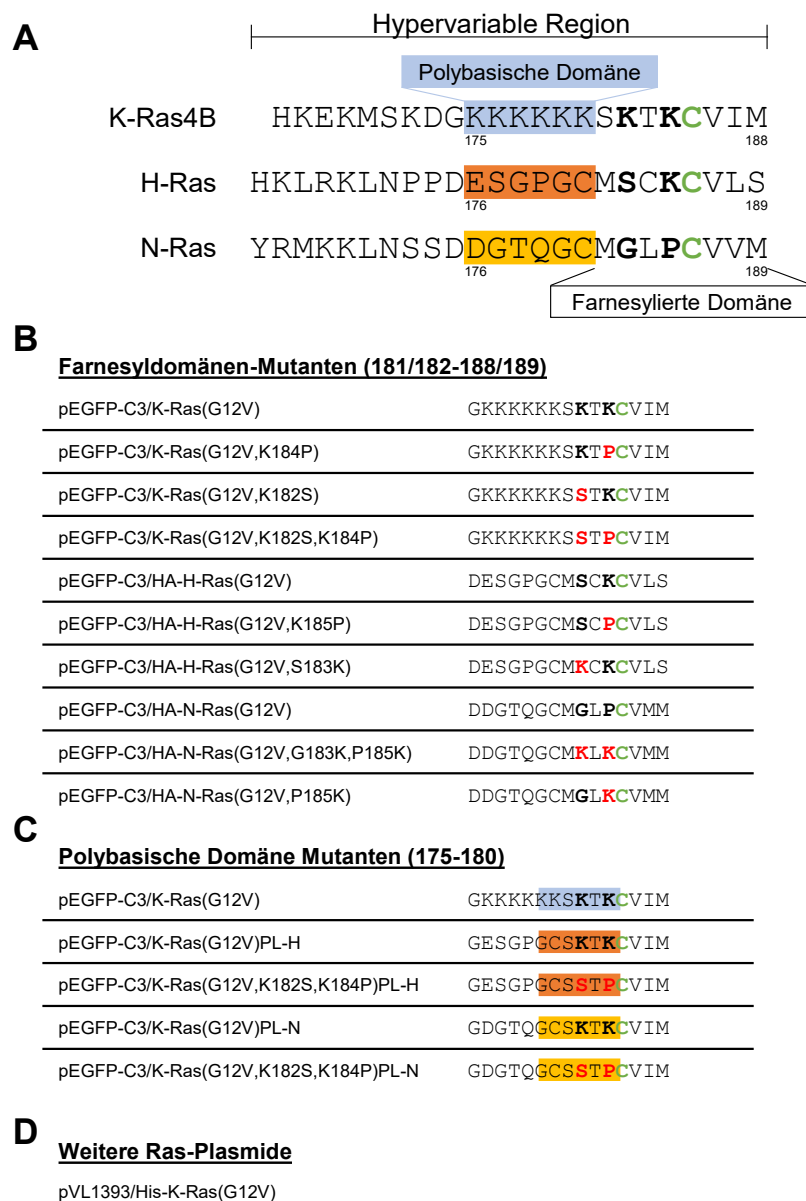
**Abb. 3.1: Struktureller Aufbau von Gal-8 und Übersicht über die verwendeten Gal-8-Mutanten.** (A) Gal-8 besteht aus einer N-terminalen (N-CRD) und einer C-terminalen CRD (C-CRD), die mit einer *hinge*-Region untereinander verbunden sind (PDB: 3VKL, [71]). (B) Darstellung der im Rahmen der Klonierungen in dieser Arbeit erzeugten Gal-8 Mutanten.

#### 3.1.2 Erzeugung von Ras-Mutanten

Zur Identifikation der Interaktionsdomäne zwischen Ras und Galectin-8 wurden diverse EGFP-getaggtte Ras-Mutanten im Rahmen dieser Arbeit erzeugt. Diese Plasmide wurden für die Transfektion in HEK293-Zellen verwendet, sodass die ektop exprimierten Proteine in *in vitro*-Interaktionsassays eingesetzt werden konnten.

Die Plasmide pEGFP-C3/K-Ras(G12V), pEGFP-C3/HA-H-Ras(G12V) und pEGFP-C3/HA-N-Ras(G12V) (Kap. 8.1.4 - 8.1.6) wurden über *in vitro*-Mutagenese oder mittels PCR unter Verwendung spezifischer Primer (Tab. 8 und Tab. 9; Kap. 2.2.2.5 und

2.2.2.6) mutiert, sodass die in Abb. 3.2 gelisteten Plasmide erzeugt wurden. Hierbei sei erwähnt, dass für alle Plasmide, die ausgehend von den Plasmiden pEGFP-C3/HA-H-Ras(G12V) und pEGFP-C3/HA-N-Ras(G12V) erzeugt wurden, im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf die Angabe des zusätzlich vorhandenen HA-Tags verzichtet wird, um eine einheitliche Darstellung von Ergebnissen zu ermöglichen. Die exprimierten Proteine dieser Plasmide resultieren in EGFP-HA-getagten H-Ras sowie N-Ras Mutanten. Auch bei der Erwähnung dieser Proteine bzw. bei der Beschriftung dieser Proteine in den folgenden Ergebnisabbildung wurde auf die Angabe des zusätzlich vorhandenen HA-Tags verzichtet.

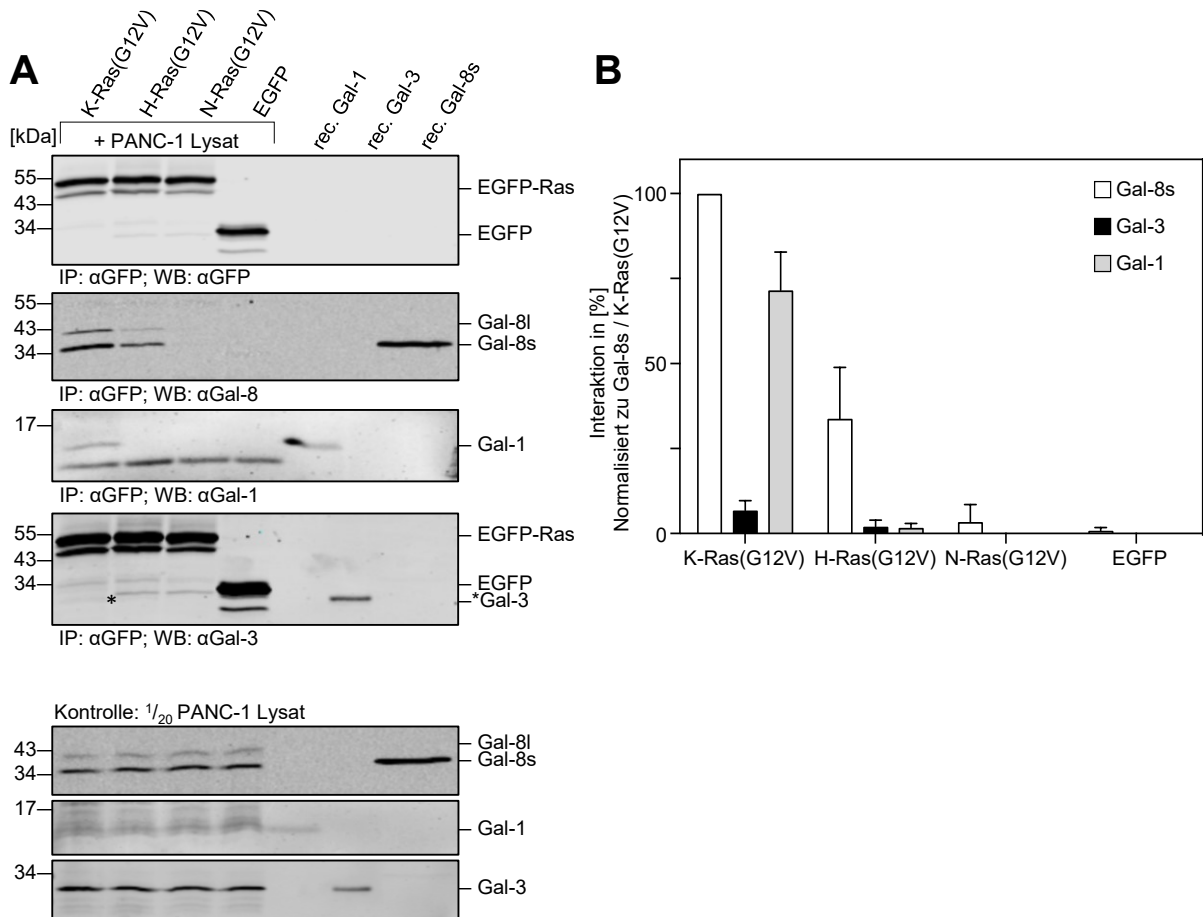


**Abb. 3.2: Darstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Ras-Mutanten. (A)** Die hypervariable Domäne von Ras ist in eine polybasische und eine farnesylierte Domäne unterteilt. **(B)** Darstellung der Farnesyldomänen-Mutanten sowie **(C)** der polybasischen Domänen Mutanten. Mutationen sind in rot dargestellt, während die Lysine in unmittelbarer Nähe zum farnesylierten Cystein fett dargestellt sind. Die zur polybasischen Domäne von K-Ras4B korrespondierenden Aminosäuren sind farbig hinterlegt. **(D)** Auflistung des im Rahmen dieser Arbeit erzeugten pVL1393/His-K-Ras(G12V) Plasmides.

Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das Plasmid pET15b/EGFP-K-Ras(G12V) erzeugt, welches nach Transformation in *E. coli* und Kultivierung in LB-Medium als Quelle für nicht posttranslational modifiziertes EGFP-K-Ras(G12V) diente. Weiterhin wurde die cDNA codierend für His-K-Ras(G12V) über PCR unter Verwendung von spezifischen Primern (Tab. 9) erzeugt und in den Vektor pVL1393 inseriert. Aufgrund der Vielzahl der verwendeten Plasmide und der Ähnlichkeit der einzelnen Mutationen, sind die verwendeten Gal-8- und Ras-Mutanten mit der jeweils spezifischen Besonderheit innerhalb der Aminosäuresequenz in Abb. 3.2 dargestellt. In dieser sind weiterhin die über *in vitro* Mutagenese oder PCR eingeführten Mutationen farbig hervorgehoben (Abb. 3.2, rot). Das farnesylierte Cystein ist in grün dargestellt. Die positiv-geladenen Lysine in unmittelbarer Nähe des farnesylierten Cysteins sind fett markiert, die polybasische Domäne in den entsprechenden Mutanten farbig hinterlegt.

### **3.1.3 *In vitro*-Interaktion von EGFP-Ras und endogenen Galektinen aus PANC-1-Proteinlysaten**

In den hier dargestellten Versuchen wurde die *in vitro*-Interaktion zwischen ektop exprimiertem EGFP-Ras und endogenem Gal-8 aus PANC-1-Zellen unter Verwendung von anti-GFP  $\mu$ Macs *beads* analysiert. Hierzu wurden Plasmide kodierend für EGFP-K-Ras(G12V), EGFP-H-Ras(G12V), EGFP-N-Ras(G12V) und EGFP in HEK293 transfiziert und für 48 Stunden exprimiert. Gleiche Mengen an EGFP-getaggetem K-Ras(G12V), H-Ras(G12V), N-Ras(G12V) und EGFP wurden über  $\mu$ Macs anti-GFP *beads* präzipitiert. 2 mg PANC-1-Lysat wurde als Quelle endogener Galektine für 2 h der *in vitro*-Interaktion zugegeben. Die Präzipitate wurden über  $\mu$ Columns aufgereinigt und mittels Western Blot die Interaktion zwischen Ras-Proteinen und Galektinen analysiert.



**Abb. 3.3: *In vitro*-Interaktion von EGFP-Ras und endogenen Galektinen.** (A) EGFP-Ras wurde nach Transfektion von entsprechenden Plasmiden für 48 Stunden in HEK293-Zellen exprimiert und die Zellen in Gold-Lyse-Puffer lysiert. Mittels anti-GFP  $\mu$ Macs *beads* wurden die EGFP-markierten Proteine präzipitiert und im Anschluss ein PANC-1-Lysat als Quelle für endogene Galektine für 2 Stunden der *in vitro*-Interaktion zugegeben.  $\mu$ Columns wurden zur Aufreinigung des Präzipitationsgemisches gemäß Kap. 2.2.4.10 verwendet. Die Analyse der Präzipitate erfolgte im Western Blot. Auf der linken Seite der Blots sind die *in vitro*-Interaktionsassays zwischen EGFP-Ras-Proteinen und endogenen Galektinen dargestellt, die über anti-GFP, und spezifische anti-Galektin-Antikörper nachgewiesen wurden. Alle EGFP-Ras-Proteine wurden in ähnlichen Mengen präzipitiert. Unten dargestellt sind die Entwicklungen der Blots, die als Kontrolle für die eingesetzte Menge an endogenen Galektinen dienen. Auf der rechten Seite sind in allen dargestellten Blots rekombinante Galektine dargestellt (Gal-1: 40 ng; Gal-3: 10 ng; Gal-8s: 30 ng). (B) Densitometrische Analyse der Interaktion zwischen EGFP-Ras und den Galektinen. Das densitometrische Verhältnis aus EGFP-Ras zu präzipitiertem Galektin wurde unter Verwendung der bekannten, aufgetragenen Mengen an rekombinanten Galektinen (Gal-1: 40 ng; Gal-3: 10 ng; Gal-8s: 30 ng) quantifiziert und auf das Verhältnis von Gal-8 *short* zu EGFP-K-Ras(G12V) normalisiert. Das Balkendiagramm zeigt die Resultate von mehr als 2 unabhängig durchgeführten Experimenten ( $\pm$  SD;  $n \geq 2$ ).

Die oberen vier Blots von Abb. 3.3A zeigen die spezifischen Nachweise auf EGFP-Ras, Galektin-8, -3 und -1 nach Präzipitation über anti-GFP  $\mu$ Macs *beads* dar. In den unteren drei Blots sind zur Kontrolle Galektin-8, -3 und -1 in den eingesetzten PANC-1-Lysaten nachgewiesen (1/20 der in der *in vitro*-Interaktion eingesetzten Lysatmenge). Zur Kalkulation von Verhältnissen aus ko-präzipitiertem Galektin und Ras-Protein wurden rekombinante Proteine bekannter Menge (Gal-1: 40 ng; Gal-3: 10 ng; Gal-8s:

30 ng) aufgetragen. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrischen Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens zwei unabhängigen Experimenten (Abb. 3.3B). Hierbei wurde der Quotient aus ko-präzipitiertem Galektin und präzipitierten EGFP-Ras gebildet und auf die Interaktion zwischen Gal-8s zu EGFP-K-Ras(G12V) normalisiert, sodass die Interaktion zwischen Gal-8s und EGFP-K-Ras(G12V) 100 % Interaktionsstärke entspricht. Verglichen dazu interagierte Gal-3 nur zu  $6.79 \% \pm 2.92 \%$ , Gal-1 zu  $71.56 \% \pm 11.29 \%$  mit EGFP-K-Ras(G12V). Ebenfalls in Relation zur 100 %-igen Interaktion zwischen EGFP-K-Ras(G12V) und Gal-8s konnten die Interaktionsstärken zwischen EGFP-H-Ras(G12V) und den Galektinen determiniert werden. EGFP-H-Ras(G12V) interagierte zu  $33.78 \% \pm 15.14 \%$  mit Gal-8s, zu  $2.06 \% \pm 1.90 \%$  mit Gal-3 und zu  $1.69 \% \pm 1.27 \%$  zu Gal-1 konnte nachgewiesen werden. Während für Gal-3 und Gal-1 keine Interaktion mit EGFP-N-Ras(G12V) nachgewiesen werden konnte, zeigte Gal-8s mit  $3.44 \pm 5.12 \%$  eine geringe Fähigkeit zur Interaktion. Aufgrund der schwachen Nachweisbarkeit von Gal-8l wurde von einer Quantifizierung der Interaktion zwischen Gal-8l und EGFP-Ras abgesehen.

Gal-8s interagiert somit prädominant mit EGFP-K-Ras(G12V), in geringerem Ausmaß mit EGFP-H-Ras(G12V) und nicht mit EGFP-N-Ras(G12V). Verglichen mit der Interaktion zwischen endogenen Gal-8s und EGFP-K-Ras(G12V) interagiert endogenes Gal-1 in deutlich geringeren Mengen mit EGFP-K-Ras(G12V). Eine sehr schwache Interaktion zwischen Gal-3 und EGFP-K-Ras(G12V) konnte ebenfalls detektiert werden. Die Gal-3 Nachweisbande ist hierbei speziell markiert (\*), da weitere Banden auf ähnlicher Höhe, die nicht Gal-3 darstellen, zu finden sind. Des Weiteren interagierten Gal-3 und Gal-1 in kaum nachweisbaren Mengen mit EGFP-H-Ras(G12V) und nicht mit EGFP-N-Ras(G12V). Verglichen mit Gal-8s interagierte Gal-8l mit EGFP-K-Ras(G12V) und EGFP-H-Ras(G12V), aber nicht mit EGFP-N-Ras(G12V).

### **3.1.4 Ko-Immunopräzipitation von endogenem K-Ras und Gal-8 in PANC-1-Zellen**

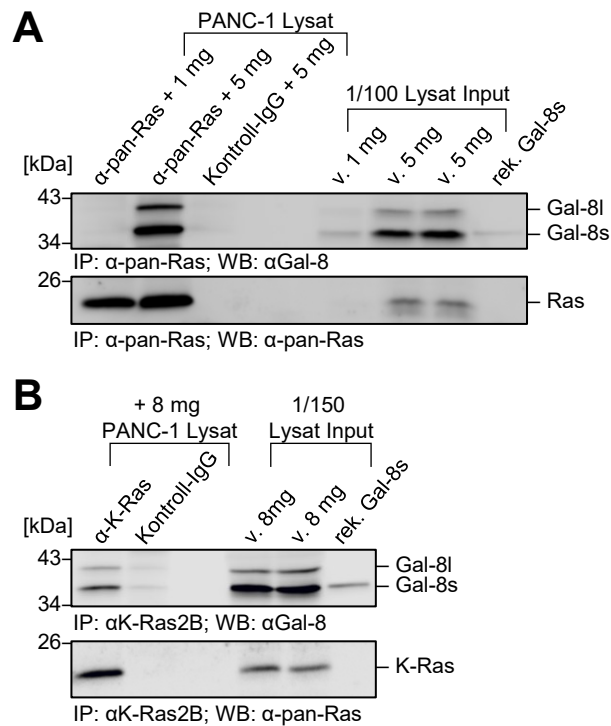
Nachdem in Kapitel 3.1.3 die *in vitro*-Interaktion zwischen K-Ras und endogenem Gal-8 nachgewiesen wurde, wurde im Folgenden der endogene Komplex aus K-Ras und Gal-8 über spezifische anti-Ras-Antikörper unter Verwendung von PANC-1-Lysaten präzipitiert und ko-präzipitiertes Gal-8 nachgewiesen.

Für die Präzipitation von endogenem Ras wurde der anti-pan-Ras Antikörper bzw. für die Präzipitation von endogenem K-Ras der anti-K-Ras2B Antikörper verwendet.

$\mu$ Macs Protein G bzw. A *beads* sowie 1 mg bzw. 5 mg (Abb. 3.4A) oder 8 mg (Abb. 3.4B) PANC-1-Lysat wurden zugegeben und wie in Kap. 2.2.4.10 inkubiert. Im Anschluss wurde das Präzipitat aufgereinigt. Auf der jeweils linken Seite der unteren dargestellten Blots ist die Präzipitation von Ras/K-Ras über den anti-pan-Ras- (Abb. 3.4A) bzw. über den anti-K-Ras2B-Antikörper (Abb. 3.4B) dargestellt. Die oberen Blots zeigen das ko-präzipitierte Gal-8 *short* und *long*. Auf der rechten Seite der Blots sind die entsprechenden Proteine in einem Aliquot des eingesetzten PANC-1-Lysat nachgewiesen.

Unter Verwendung von 5 mg PANC-1-Lysat konnte ein Ko-Präzipitat zwischen Gal-8 und Ras nachgewiesen werden (Abb. 3.4A, oberer Blot). Bei Zugabe von 1 mg PANC-1-Lysat konnte ko-präzipitiertes Gal-8 nur schwer detektiert werden. Die eingesetzte Menge von 1 mg PANC-1-Lysat reicht hierbei offensichtlich nicht aus, um eine Ko-Präzipitation nachzuweisen. Dies wird auch deutlich, wenn der rechte Teil der Abbildung betrachtet wird, in der Gal-8 bei Verwendung von 1 mg nur schwer nachweisbar ist, während Gal-8 bei Verwendung von 5 mg deutlich zu detektieren ist.

Nach Präzipitation von endogenem K-Ras über den anti-K-Ras2B Antikörper (Abb. 3.4B, unterer Blot) konnte Gal-8 als Ko-Präzipitat nachgewiesen werden (Abb. 3.4B, oberer Blot). In der Kontrolle ist eine leichte unspezifische Bindung von Gal-8 an die  $\mu$ Macs Protein A *beads* identifizierbar. Dies bedeutet, dass Gal-8 unspezifisch an die Matrix der  $\mu$ Macs Protein A *beads* bindet. Diese unspezifische Bindung ist verglichen mit der Menge an ko-präzipitiertem Gal-8 deutlich geringer.



**Abb. 3.4: Ko-Immunopräzipitation von Ras-Proteinen und Gal-8 aus PANC-1-Lysaten.** PANC-1-Lysat wurde zusammen mit Antikörpern, die spezifisch **(A)** Ras bzw. **(B)** K-Ras präzipitieren, sowie  $\mu$ Macs Protein G bzw. A *beads* für zwei Stunden inkubiert. Die Präzipitate wurden über  $\mu$ Columns aufgereinigt und mittels Western Blot analysiert. Der jeweils untere Blot der Teilabbildungen zeigt auf der linken Seite das präzipitierte Ras- bzw. K-Ras-Protein. Die oberen Blots zeigen den Nachweis von ko-präzipitiertes Gal-8. Auf der rechten Seite aller Blots sind die Färbungen von Ras bzw. K-Ras und Gal-8 der in den Ko-IPs eingesetzten PANC-1-Lysate dargestellt. In der letzten Spur der dargestellten Blots wurde rekombinantes Gal-8s nachgewiesen.

### 3.1.5 Nachweis der Interaktion von K-Ras und Gal-8 mittels Dot-Blot

Die Dot-Blot-Methode kann zum Nachweis der direkten Interaktion zwischen zwei Proteinen verwendet werden [98]. Mit Hilfe dieser Methode wird ein gereinigtes Protein, z.B. Ras, auf einer Nitrocellulosemembran aufgetropft, mit einer Blockierlösung geblockt und im Anschluss mit einer Pufferlösung, welche z.B. gereinigtes Gal-8 enthält, inkubiert. Findet eine direkte Interaktion der beiden aufgereinigten Proteine statt, so kann das in Interaktion stehende Protein mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

Da zur Durchführung der Methode reine Proteine benötigt werden, wurden die His-getaggten K-Ras(G12V) und Gal-8 *long* Proteine in H5-Insektenzellen nach Transfektion/Infektion der Zellen exprimiert (Kap. 2.2.3.8 und 2.2.3.10) und anschließend über Ni-NTA Agarose gereinigt (Kap. 2.2.4.11).

### 3.1.5.1 Nachweis und Konzentrationsbestimmung von His-K-Ras(G12V) und His-Gal-8 *long*

Im Rahmen ihrer Dissertation verwendete Monika Unger bereits gereinigte HA-K-Ras(G12V) Proteine [77], deren Konzentration mit Hilfe eines Standards auf 100 ng/ $\mu$ l bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt).

Zur Expression von His-K-Ras(G12V) bzw. His-Gal-8 *long* wurden H5-Insektenzellen mit den entsprechenden Baculoviren infiziert (Kap. 2.2.3.10, 3.1.1 und 3.1.2). Die infizierten H5-Insektenzellen wurden nach 72 h lysiert. His-K-Ras(G12V) und His-Gal-8 *long* wurden über Ni-NTA Agarose gereinigt (Kap. 2.2.4.11). Die gereinigten Proteine (Eluat 1-3), das Proteinlysate, der Überstand nach Inkubation mit der Ni-NTA Agarose und der Durchfluss des ersten Waschschrittes wurden über SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und über eine Coomassie-Blau bzw. mittels spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert (Abb. 3.5).

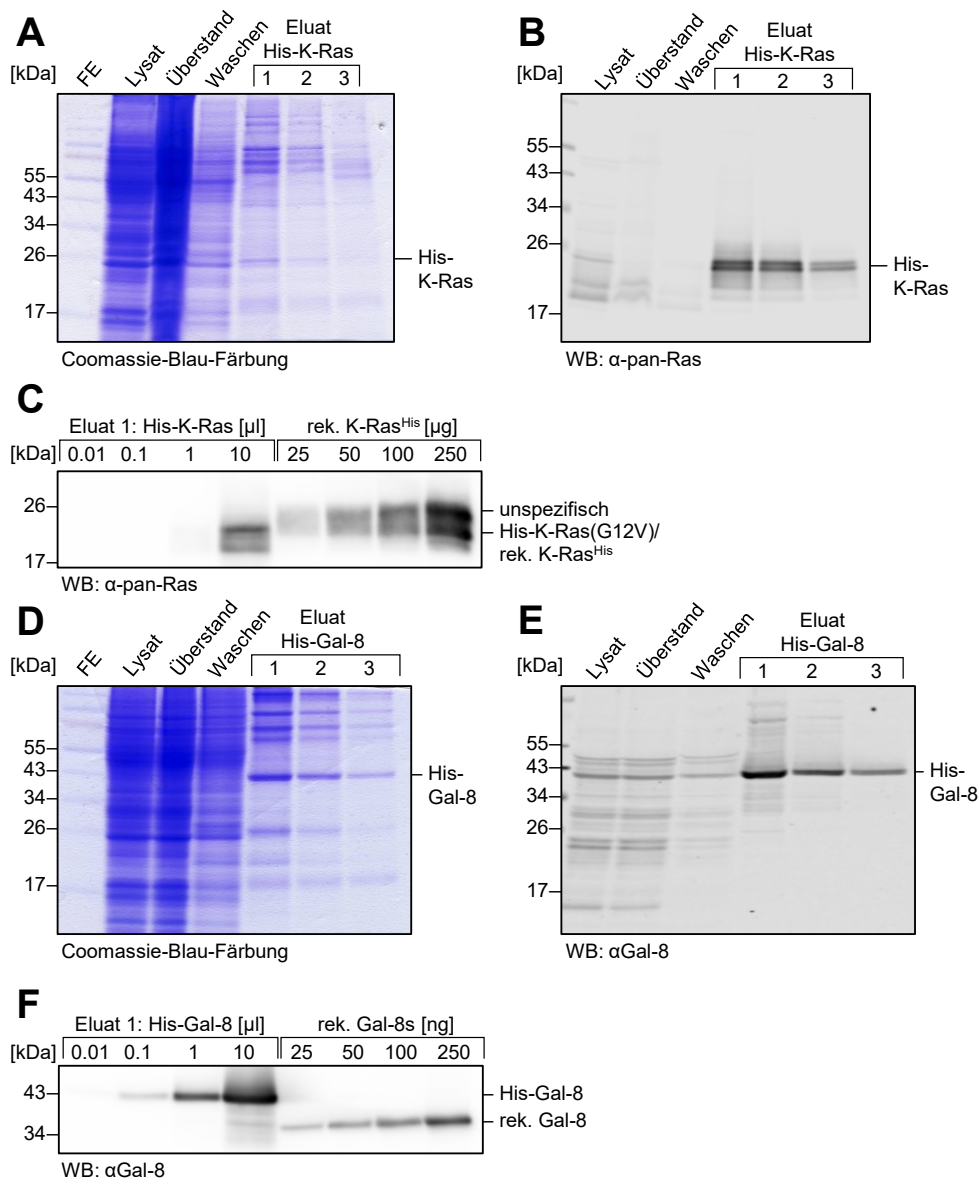
Die Abbildungen 3.5A und D zeigen die Coomassie-Blau Färbungen nach Aufreinigung von His-K-Ras(G12V) (Abb. 3.5A) bzw. His-Gal-8 *long* (Abb. 3.5D). Die Abbildungen 3.5B und E stellen die spezifischen Antikörpernachweise von His-K-Ras(G12V) (Abb. 3.5B) bzw. His-Gal-8 *long* (Abb. 3.5E) dar. Die drei Eluate von His-K-Ras(G12V) zeigen auf Höhe von etwa 22 – 24 kDa eine Doppelbande, welche über den pan-Ras-Antikörper als Ras identifiziert wurde. Dies zeigt, dass im Eluat His-K-Ras(G12V) aufgereinigt vorhanden ist. Die Doppelbanden lassen sich durch die posttranslationale Modifikation des Ras-Proteins erklären, die das Laufverhalten von Ras-Proteinen bestimmt. Oberhalb von 55 kDa finden sich in der Coomassie-Blau Färbung in den drei Spuren, in denen das Eluat aufgetragen wurde, weitere Proteine, welche durch die Aufreinigungsschritte nicht vollständig entfernt werden konnten und möglicherweise unspezifisch an die Ni-NTA Agarose gebunden haben.

In den drei Eluaten von His-Gal-8 *long* zeigen auf Höhe von ca. 42 kDa eine Bande, die in der Coomassie-Blau (Abb. 3.5D) und auch in der Antikörper-Färbung (Abb. 3.5E) zu erkennen ist. Diese Bande ist in Abb. 3.5E bereits im Lysat, im Überstand und auch nach Waschen der Proben zu erkennen. Es finden sich analog zur Reinigung von His-K-Ras(G12V) weitere Proteine ober- und unterhalb der Gal-8 *long* Bande in der Coomassie-Blau Färbung. Dies bedeutet, dass Proteine vermutlich unspezifisch an die Ni-NTA Agarose gebunden haben und nun noch im Eluat vorliegen.

Um nun abschätzen zu können, wie viel His-K-Ras(G12V) bzw. His-Gal-8 *long* sich in Eluat 1 der Ni-NTA Agarose Aufreinigung befindet, wurden aufsteigende Volumina des



Eluat 1 von His-K-Ras(G12V) (Abb. 3.5C) bzw. His-Gal-8 *long* (Abb. 3.5F) auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Weiterhin wurde als Mengenstandard eine bekannte Menge an kommerziell erworbenem rekombinanten K-Ras<sup>His</sup> bzw. Gal-8 *short* aufgetragen. Über eine densitometrische Analyse wurde die Konzentration von 20 ng/μl His-K-Ras(G12V) in Eluat 1 bzw. von 200 ng/μl Gal-8 *long* in Eluat 1 berechnet.



**Abb. 3.5: Nachweis und Konzentrationsbestimmung der gereinigten His-K-Ras(G12V)- und His-Gal-8 *long*-Proteinen.** H5-Insektenzellen wurden zur Expression von His-K-Ras(G12V) bzw. His-Gal-8 *long* mit den entsprechenden Baculoviren infiziert und für 72 Stunden kultiviert. Die H5-Insektenzellen wurden lysiert und die His-markierten Proteine wurden über Ni-NTA Agarose aufgereinigt. Die Eluate, das Proteinlysate, der Überstand nach Inkubation der Ni-NTA Agarose mit dem Lysat und der Durchfluss nach Waschen der Agarose wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Gele wurden entweder mit einer Coomassie-Blau-Lösung gefärbt (**A und D**) oder His-K-Ras(G12V) und His-Gal-8 *long* mit spezifischen Antikörpern gegen Ras und Gal-8 nachgewiesen (**B und E**). Eine aufsteigende Reihe an Volumina des Eluats 1 jedes His-Proteins wurde zusammen mit rekombinanten Proteinen bekannter Mengen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels spezifischer Antikörper His-K-Ras(G12V) (**C**) und His-Gal-8 *long* (**F**) im Western Blot nachgewiesen. Mittels Densitometrie konnte ungefähre Menge an His-Protein pro Mikroliter Eluat berechnet werden (**C und F**).

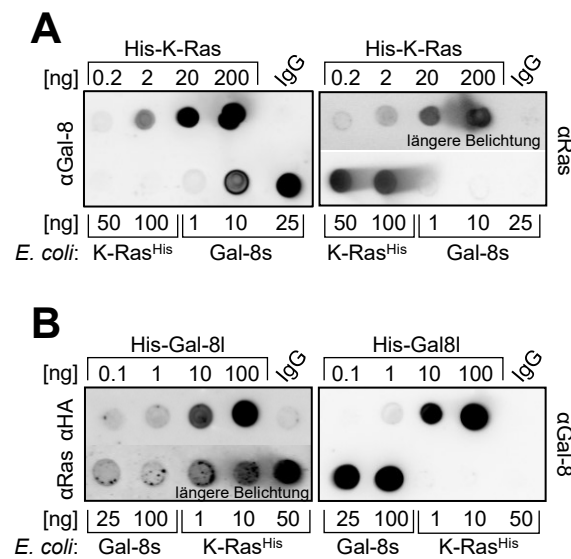
### 3.1.5.2 Dot-Blot

Um die direkte Interaktion zwischen K-Ras und Gal-8 nachzuweisen, wurde die Dot-Blot-Methode gemäß der methodischen Erklärung in Kap. 2.2.4.12 angewandt.

In Abbildung 3.6A sind die Blotentwicklungen der beiden Nitrocellulosemembranen dargestellt, auf denen His-K-Ras(G12V) inklusive der in Kap. 2.2.4.12 dargestellten Kontrollen aufgetropft wurden. Auf der linken Seite ist der Nachweis auf Gal-8 sichtbar, rechts ist der Nachweis auf Ras abgebildet. Proportional zur Menge des aufgetropftem His-K-Ras(G12V) interagiert Gal-8 mit His-K-Ras(G12V). Vergleicht man densitometrisch die Intensität der Gal-8 Nachweise zwischen den aufgetropften Gal-8 *short* Kontrolle (Abb. 3.6A, links untere Reihe) und den in Interaktion mit His-K-Ras(G12V) stehenden Gal-8 *long* Mengen, so kann abgeschätzt werden, dass etwa 25 ng Gal-8 an 20 ng His-K-Ras(G12V) gebunden vorliegen. Bereits ab 2 ng immobilisierten His-K-Ras(G12V) ist eine Bindung von Gal-8 *long* nachweisbar. Aufgrund der schwachen Nachweisbarkeit von His-K-Ras(G12V) über den anti-pan-Ras-Antikörper auf der rechten Seite von Abbildung 3.6A wurde für den Nachweis der aufsteigenden Mengen an His-K-Ras(G12V) eine längere Belichtungszeit gewählt, als für die in der unteren Reihe dargestellten Kontrollen von K-Ras<sup>His</sup>. Daher wurde die Abbildung in der Mitte getrennt und die Blotentwicklung in unterschiedlichen Belichtungszeiten dargestellt.

Parallel dazu sind in Abb. 3.6B die beiden Entwicklungen der Blots abgebildet, auf denen His-Gal-8 *long* inklusive der in Kap. 2.2.4.12 dargestellten Kontrollen aufgetropft wurden. Auf der linken Seite ist der Nachweis auf HA-K-Ras(G12V) über einen anti-HA-Antikörper und auf der rechten Seite auf Ras-Proteine über den anti-pan-Ras-Antikörper abgebildet. Da die verwendeten Proteinmengen gering sind und eine längere Belichtungszeit bei Entwicklung mittels HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern erfordern, wurde zum Nachweis von HA-K-Ras(G12V) statt des anti-pan-Ras-Antikörpers auf der linken Seite von Abbildung 3.6B der anti-HA-Antikörper verwendet. Auf der rechten Seite ist der Nachweis auf Gal-8 *long* über den anti-Gal-8-Antikörper dargestellt. Entsprechend zu Abb. 3.6A ist auch hier – reziprok zum dargestellten Versuch in Abb. 3.6A – eine proportionale Interaktion von His-Gal-8 *long* und HA-K-Ras(G12V) zu identifizieren. Da unterschiedliche Belichtungszeiten für den Nachweis von HA-K-Ras(G12V) vorliegen, kann hier keine Aussage getroffen werden, wie viel HA-K-Ras(G12V) in Interaktion mit His-Gal-8 *long* vorliegt. Bereits ab 1 ng His-Gal-8 *long* kann eine Interaktion mit HA-K-Ras(G12V) über den anti-HA-Antikörper nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schlussfolgern, dass K-Ras-Proteine bereits in sehr geringen Mengen mit Gal-8 *long* direkt interagieren können, ohne ein Adapterprotein zu benötigen.



**Abb. 3.6: Dot-Blot zur Analyse der direkten Interaktion zwischen K-Ras und Gal-8.** Auf jeweils zwei Nitrocellulosemembranen wurden His-K-Ras(G12V) und His-Gal-8 *long* in den angegebenen Mengen aufgetropft. Rekombinantes K-Ras<sup>His</sup>, sowie Gal-8 *short* in definierten Mengen diente als Mengenvergleichskontrolle der aufgetropften Proteine (untere Reihe). Die Membranen wurden mit BSA abgesättigt und über Nacht mit 1 µg rekombinanten **(A)** Gal-8 *short* bzw. **(B)** HA-K-Ras(G12V) inkubiert. Der Nachweis der immobilisierten und der daran gebundenen Proteine erfolgte mit Hilfe des anti-Gal-8- und anti-pan-Ras-Antikörpers **(A)** bzw. der anti-HA/anti-pan-Ras- und anti-Gal-8-Antikörper **(B)**. Die hier abgebildeten Dot-Blots zeigen die repräsentativen Ergebnisse von zwei durchgeführten Experimenten.

### 3.1.6 *In vitro*-Interaktion von EGFP-Ras und Gal-8-Mutanten

Gal-8 besteht aus einer N- und einer C-terminalen CRD, die über eine *hinge*-Region miteinander verbunden sind. Bereits in meiner Master-Thesis konnte ich zeigen, dass die Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras(G12V) über die N-terminale CRD von Gal-8 vermittelt wird [90]. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte überprüft werden, ob die *hinge*-Region einen zusätzlichen verstärkenden oder abschwächenden Effekt auf die Interaktion zwischen den beiden Proteinen besitzt. Hierzu wurden in dieser Arbeit mittels PCR HA-markierte-Mutanten (N-CRD-*hinge* [NH] und C-CRD-*hinge* [CH]) zusätzlich zu den aus der Master-Thesis vorhandenen Mutanten (HA-N-CRD [N] und HA-C-CRD [C]) generiert (Abb. 3.1).

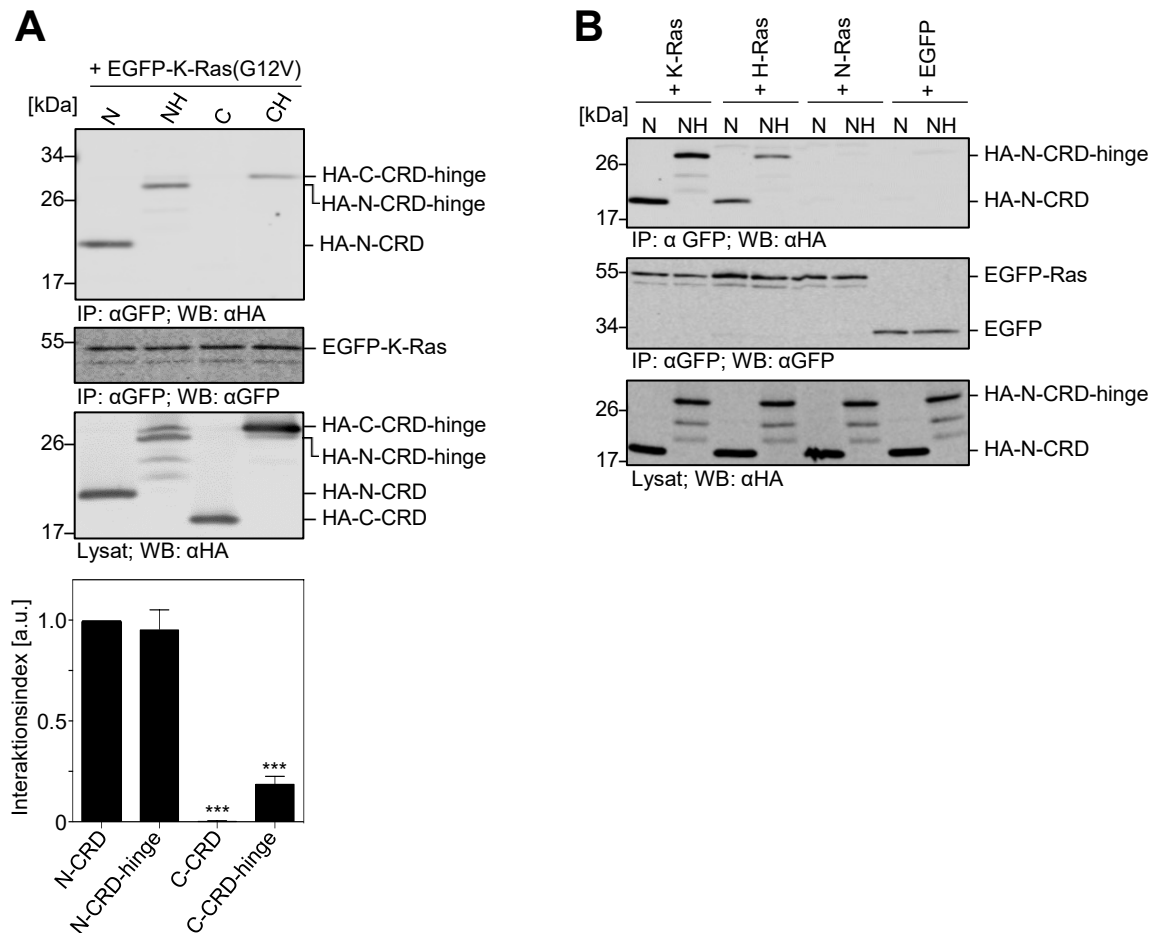
HEK293-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden für die Gal-8-Mutanten sowie für EGFP-K-Ras(G12V) transfiziert und 48 h später lysiert. Die HA-markierten Gal-8-Mutanten wurden auf die Interaktionsfähigkeit mit ektop exprimiertem EGFP-K-

Ras(G12V) überprüft, indem die einzelnen HEK293-Lysate in einer *in vitro*-Interaktion kombiniert wurden. Hierbei wurde EGFP-K-Ras(G12V) über anti-GFP  $\mu$ Mac's Microbeads präzipitiert und mit einem Gal-8-haltigem Lysat inkubiert (Kap. 2.2.4.10).

Im oberen Blot der Abb. 3.7A sind die ko-präzipitierten HA-CRDs dargestellt, während der untere den HA-CRD-Input zeigt. Im mittleren Blot ist präzipitiertes EGFP-K-Ras(G12V) zu sehen. Für die densitometrischen Analysen wurden die Quotienten aus ko-präzipitiertem HA-Protein und Input des HA-Proteins gebildet und zu EGFP-K-Ras(G12V) in Relation gesetzt. Diese Werte wurden auf die Werte der Interaktion zwischen HA-N-CRD und EGFP-K-Ras(G12V) normalisiert und sind als Interaktionsindex abgebildet in einem Balkendiagramm als Mittelwert  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten dargestellt (zweiseitiger Einstichproben t-test; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ). Verglichen mit der Interaktion zwischen HA-N-CRD und EGFP-K-Ras(G12V) liegt der Interaktionsindex der HA-N-CRD-*hinge* und EGFP-K-Ras(G12V) bei  $0.95 \pm 0.17$ . Der Interaktionsindex von HA-C-CRD bei  $0.004 \pm 0.002$ , von HA-C-CRD-*hinge* bei  $0.19 \pm 0.038$ .

Sowohl die HA-N-CRD, als auch die HA-N-CRD-*hinge* interagieren in etwa gleicher Stärke mit EGFP-K-Ras(G12V). Eine leichte Interaktion der HA-C-CRD-*hinge* mit EGFP-K-Ras(G12V) konnte nachgewiesen werden, während die HA-C-CRD nicht mit EGFP-K-Ras(G12V) interagiert

Abb. 3.7B zeigt die Interaktion zwischen Ras-Isoformen und der N-CRD (N) bzw. N-CRD-*hinge* (NH). Während der mittlere Blot präzipitiertes Ras über spezifische Antikörper nachweist, zeigt der obere Blot die interagierende N-CRD bzw. N-CRD-*hinge* durch Nachweis mit einem HA-Antikörper. Ebenfalls mit diesem Antikörper wurde der HA-CRD Input nachgewiesen. Vergleichbar mit den dargestellten Ergebnissen in Abb. 3.3 ist eine Präferenz in der Interaktion der N-CRD bzw. der N-CRD-*hinge* mit EGFP-K-Ras(G12V) zu erkennen. In deutlich geringerem Maße interagieren die CRD-Mutanten mit EGFP-H-Ras(G12V). Keine Interaktion ist mit EGFP-N-Ras(G12V), sowie der EGFP-Kontrolle nachweisbar. Die hier abgebildeten Blots sind repräsentativ für einen von zwei durchgeführten Versuchen.



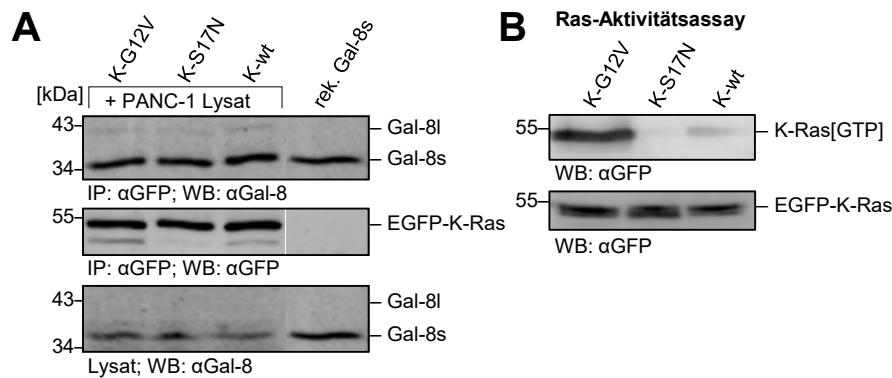
**Abb. 3.7: *In vitro*-Interaktion von EGFP-Ras und Gal-8-Mutanten.** Plasmide, die für die einzelnen HA-markierten Gal-8-Mutanten bzw. die Ras-Isoformen kodieren, wurden in HEK293 transfiziert und die Zellen nach 48 Stunden in Gold-Lyse-Puffer lysiert. **(A)** Im mittleren Blot ist das präzipitierte EGFP-K-Ras(G12V) dargestellt. Der obere Blot zeigt die ko-präzipitierten HA-markierten Gal-8-Mutanten: HA-N-CRD [N], HA-N-CRD-hinge [NH], HA-C-CRD [C] und HA-C-CRD-hinge [CH]. Der untere Blot zeigt ein Aliquot der Lysate mit den eingesetzten HA-markierten Gal-8-Mutanten (HA-CRD-Input), die in der *in vitro*-Interaktion eingesetzt wurden und unter Verwendung eines spezifischen anti-HA-Antikörpers nachgewiesen wurden. Über densitometrische Bestimmungen wurden die Intensitäten der HA-markierten ko-präzipitierten sowie im Lysat vorhandenen Gal-8 Mutanten und die Intensität von EGFP-K-Ras(G12V) ermittelt. Der Quotient der ermittelten Intensität aus ko-präzipitierter HA-CRD und HA-CRD-Input wurde gebildet. Dieser wurde in Relation zu EGFP-K-Ras(G12V) gesetzt und auf die Interaktion zwischen der HA-N-CRD und EGFP-K-Ras(G12V) normiert (Mittelwert  $\pm$  SD; zweiseitiger Einstichproben t-test; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ;  $n = 3$ ). **(B)** Im mittleren Blot ist präzipitiertes EGFP-K-Ras(G12V), EGFP-H-Ras(G12V), EGFP-N-Ras(G12V) und EGFP über einen anti-GFP-Antikörper nachgewiesen. Der obere Blot zeigt die ko-präzipitierte HA-N-CRD-hinge [NH] und die HA-N-CRD [N], während der untere Blot den Lysat-Input der HA-markierten Gal-8-Mutanten abbildet. Ein repräsentativer Versuch von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen ist dargestellt.

### 3.1.7 Abhängigkeit der Interaktion zwischen K-Ras und Gal-8 vom gebundenen Guaninnukleotid

Für Gal-1 und Gal-3 konnten Präferenzen der Interaktion mit GTP- statt GDP-gebundenem Ras festgestellt werden. Auch Gal-8 könnte eine solche Präferenz aufweisen. Es wurden daher Ras-Mutanten verwendet, die konstitutiv aktiv GTP-gebunden

(K-Ras(G12V)-Mutante [K-G12V]), dominant-negativ und somit GDP-gebunden (K-Ras(S17N)-Mutante [K-S17N]) und als wildtypisches K-Ras vorliegen (K-Ras(wt) [K-wt]). Plasmide wurden in HEK293-Zellen transfiziert und die Zellen nach 48 Stunden lysiert. Die einzelnen EGFP-markierten Ras-Mutanten enthaltenden Lysate wurden immunpräzipitiert und mit 2 mg PANC-1-Lysat als Quelle von endogenem Gal-8 inkubiert. Abb. 3.8 zeigt die Nachweise des interagierenden Gal-8, präzipitierten EGFP-K-Ras und im Lysat vorliegenden Gal-8. Präzipitiertes EGFP-K-Ras liegt in allen drei Spuren in vergleichbaren Mengen vor (mittlerer Blot). Ko-präzipitiert konnte Gal-8 an allen drei EGFP-K-Ras-Varianten in vergleichbaren Mengen detektiert werden (oberer Blot). Im unteren Blot ist der Nachweis auf Gal-8 in einem Aliquot des eingesetzten PANC-1-Lysates abgebildet. Unabhängig von der präzipitierten EGFP-Ras-Mutante und somit unabhängig vom Guaninnukleotid-Zustand findet die Interaktion zwischen Gal-8 und Ras in vergleichbarer Stärke statt.

Zusätzlich dazu wurde ein Ras-Aktivitätsassay durchgeführt (Abb. 3.8B). Über diesen kann nachgewiesen werden, ob ein Ras-Protein im GTP-gebundenen Zustand vorliegt (Kap. 2.2.4.9). Für den Ras-Aktivitätsassay wurden die oben beschriebenen GTP- und GDP-gebundenen sowie die wildtypische EGFP-Ras-Mutanten verwendet, die in HEK293 exprimiert und in Ras-RIPA-Puffer lysiert vorliegen. Es findet ein *pull-down* von GTP-gebundenem Ras über ein RBD-Protein statt, sodass dieses im Western Blot über einen spezifischen GFP-Antikörper nachgewiesen werden kann. In Abbildung 3.8B ist dieser Nachweis des GTP-gebundenen EGFP-Ras-Proteins dargestellt. Es zeigt sich, dass der Nachweis auf das konstitutiv aktive, GTP-gebundene EGFP-K-Ras(G12V) die stärkste Bande aufweist, während der Nachweis auf das dominant negative EGFP-K-Ras(S17N) keine Bande zeigt. Der Nachweis von EGFP-K-Ras(wt) zeigt eine leichte Bande auf Höhe von EGFP-K-Ras. Dies spricht dafür, dass EGFP-K-Ras(wt) partiell GTP-gebunden vorliegt. Verglichen mit EGFP-K-Ras(G12V) aber in deutlich geringerem Ausmaß.



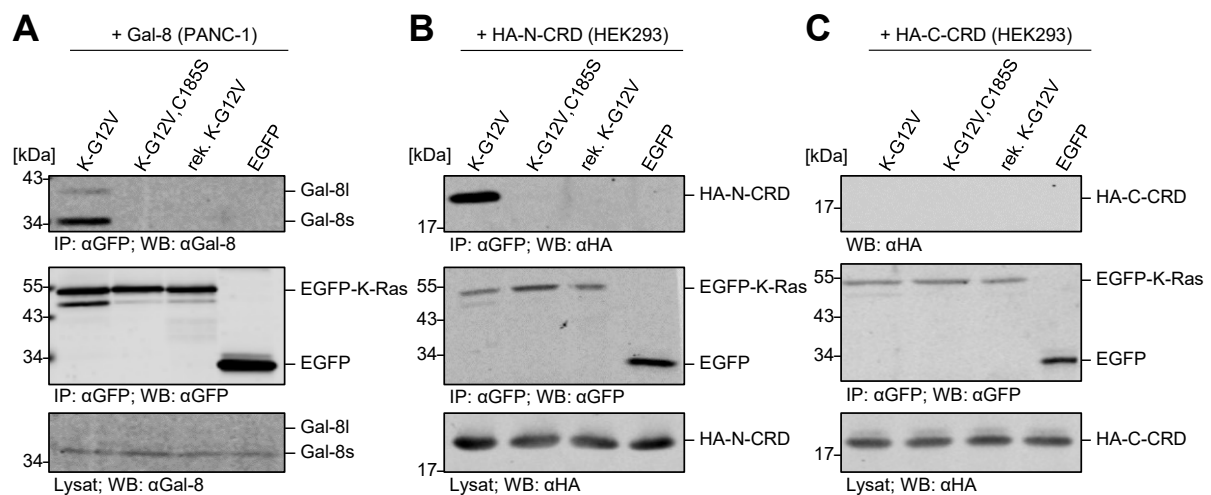
**Abb. 3.8: Abhängigkeit der K-Ras/Gal-8 Interaktion von der Guaninnukleotid-Bindung.** Die konstitutiv aktive Ras-Mutante EGFP-K-Ras(G12V) [K-G12V], die dominant negative und somit GDP-gebundene EGFP-K-Ras(S17N) Mutante [K-S17N] und EGFP-K-Ras(wt) [K-wt] wurden nach Transfektion entsprechender Plasmide in HEK293 für 48 Stunden exprimiert. EGFP-markierte Ras-Mutanten wurden über  $\mu$ Macs anti-GFP *beads* präzipitiert und mit 2 mg PANC-1-Lysat inkubiert. **(A)** Der obere Blot zeigt das ko-präzipitierte Gal-8, der mittlere Blot das präzipitierte EGFP-K-Ras und der untere Blot den Gehalt an Gal-8 im eingesetzten Proteinlysate. Gal-8 interagiert mit allen drei EGFP-K-Ras-Proteinen in gleichem Maße, unabhängig vom gebundenen Guaninnukleotid. Die dargestellten Blots stehen repräsentativ für insgesamt fünf unabhängige Experimente. **(B)** Der obere Blot stellt den Nachweis auf EGFP-K-Ras unter Verwendung eines anti-GFP-Antikörpers nach einem durchgeführten Ras-Aktivitätsassay dar. K-Ras.GTP konnte in großen Mengen im EGFP-K-Ras(G12V)-Lysat und in deutlich geringeren Mengen im EGFP-K-Ras(wt)-Lysat detektiert werden. Im EGFP-K-Ras(S17N)-Lysat ist kein EGFP-K-Ras nachweisbar. Der untere Blot zeigt den Nachweis auf EGFP-K-Ras unter Verwendung eines Aliquots des eingesetzten Proteinlysates für den Ras-Aktivitätsassay. Die dargestellten Blots stehen repräsentativ für insgesamt zwei unabhängige Experimente.

### 3.1.8 Abhängigkeit der K-Ras/Gal-8 Interaktion von der posttranslationalen Prenylierung von K-Ras

Die Hypothese, dass die Interaktion zwischen K-Ras und Gal-8 über eine Inkorporation der Farnesyl-Gruppe am terminalen Cystein von Ras in eine hydrophobe Tasche von Gal-8 stattfinden könnte, wurde in diesem Versuch untersucht. Hierzu wurde eine Mutante von EGFP-K-Ras(G12V) verwendet, dessen terminales Cystein gegen ein Serin mutiert wurde [K-G12V,C185S]. Zusätzlich wurde ein in *E. coli* exprimiertes EGFP-K-Ras(G12V) genutzt [rek. K-G12V]. Dieses wird in *E. coli* nicht posttranslational farnesyliert.

Die Proteine wurden in HEK293 bzw. *E. coli* exprimiert und die *in vitro*-Interaktion wie bereits ausführlich beschrieben mit 2 mg PANC-1-Lysat als Quelle von endogenem Gal-8 (Abb. 3.9A), 0.5 mg HA-N-CRD (Abb. 3.9B) oder 0.5 mg HA-C-CRD (Abb. 3.9C) durchgeführt. Der jeweils mittlere Blot in Abb. 3.9 zeigt die präzipitierten EGFP-Ras- und EGFP-Proteine. Im jeweils oberen Blot sind interagierendes Gal-8, HA-N-CRD oder HA-C-CRD dargestellt, während der untere Blot den Gehalt der jeweiligen Proteine im Lysat darstellt.

*Full-length* Gal-8 und die N-CRD interagieren ausschließlich mit der posttranslational farnesylierten Variante von EGFP-K-Ras(G12V) (Abb. 3.9A und B, Spur 1). Die HA-C-CRD interagiert mit keiner der EGFP-K-Ras(G12V)-Varianten (Abb. 3.9C). Die Interaktion ist somit abhängig von der Farnesylierung von EGFP-K-Ras(G12V). Weiterhin konnte erneut gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras über die N-CRD und nicht über die C-CRD vermittelt wird (Abb. 3.9B und C).



**Abb. 3.9: Abhängigkeit der K-Ras/Gal-8 Interaktion von der posttranslationalen Prenylierung von Ras.** Posttranslational farnesyliertes EGFP-K-Ras(G12V) [K-G12V], sowie das farnesyl-defiziente EGFP-K-Ras(G12V,C185S) [K-G12V,C185S] wurden in HEK293 nach Transfektion entsprechender Plasmide exprimiert. Rekombinantes, nicht farnesyliertes EGFP-K-Ras(G12V) wurde in *E. coli* exprimiert [rek. K-G12V]. Die EGFP-K-Ras-Proteine wurden mittels μMacs anti-GFP *beads* in gleichen Mengen präzipitiert und mit PANC-1-Lysat oder HA-N-CRD enthaltende HEK293-Lysate für 2 Stunden inkubiert. Nach Aufreinigung wurden die Präzipitate mittels Western Blot analysiert. Die oberen Blots der Abbildung zeigen in Interaktion stehendes **(A)** Gal-8, **(B)** HA-N-CRD bzw. **(C)** HA-C-CRD, während die unteren Blots die Proteinmenge im zugehörigen Lysat darstellt.

### 3.1.9 Interaktion von Ras-Lysin-Mutanten mit Galektinen

Vergleichende Strukturanalysen, die von Dr. Karin Fritz-Wolf durchgeführt wurden (AG Prof. Dr. Katja Becker) zeigen, dass Gal-8 zwei hydrophobe Bindungstaschen besitzt über die eine Interaktion mit K-Ras durch Inkorporation des Farnesylrestes vermittelt werden könnte. Eine dieser hydrophoben Bindungstaschen weist negativ-geladene Aminosäuren auf, welche mit den positiv-geladenen Lysinen der hypervariablen Region von K-Ras elektrostatisch die Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras stabilisieren könnten. Auf Grundlage dieser Vermutung wurden diverse Ras-Lysin-Mutanten (Abb. 3.2B) erstellt: (a) K-Ras-Lysin-Mutanten, dessen letzten beiden Lysine an Position 182 bzw. 184 mit den korrespondierenden Aminosäuren von H-Ras bzw. N-Ras an diesen



Positionen ersetzt wurden und (b) H- und N-Ras-Mutanten, deren Aminosäuren an Position 183 und 185 sukzessive gegen Lysine mutiert wurden, sodass der Aufbau der Farnesyldomänen im Anschluss der von K-Ras ähnelt. Die Interaktion dieser Ras-Lysin-Mutanten mit Gal-8 und mit Gal-1 wurden im Folgenden analysiert.

### 3.1.9.1 Interaktion von Ras-Lysin-Mutanten mit Gal-8

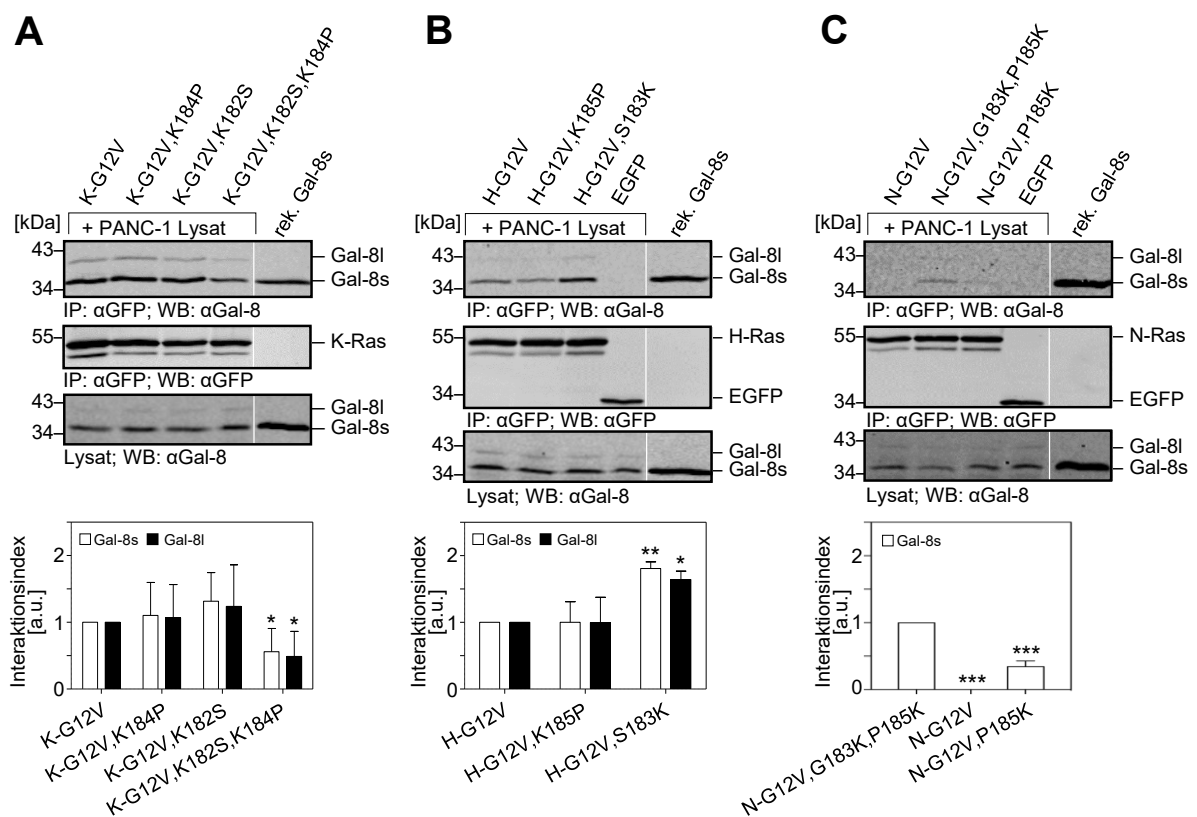
Die Ras-Lysin-Mutanten wurden in HEK293 exprimiert und unter Zugabe von 2 mg PANC-1-Lysat in einer *in vitro*-Interaktion eingesetzt.

In den mittleren Blots der Abb. 3.10 sind die gleichmäßig präzipitierten Ras-Mutanten abgebildet. In den oberen Blots ist ko-präzipitiertes Gal-8 dargestellt, die unteren Blots zeigen den Nachweis von Gal-8 im eingesetzten PANC-1-Proteinlysate. Abhängig von der eingesetzten Ras-Lysin-Mutante liegt die Interaktion mit Gal-8 verstärkt bzw. verringert vor. Mittels densitometrischer Analyse wurden die Mengen an ko-präzipitiertem Gal-8 *short* und *long* quantifiziert und als Quotient mit dem densitometrischen Werten von präzipitiertem EGFP-Ras verrechnet. Dieser wurde nach Normalisierungen auf die Interaktion zwischen Gal-8 und EGFP-K-Ras(G12V), EGFP-H-Ras(G12V) oder EGFP-N-Ras(G12V,G183K,P185K) als Interaktionsindex [a.u.] definiert, mit dem Zahlenwert von 1 gleichgesetzt und als Mittelwert  $\pm$  SD aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt. Zur Vereinfachung der komplexen Mutanten-Bezeichnungen, sind die Ras-Isoformen als K, H und N abgekürzt. Nach dem Bindestrich folgen die in der Aminosäuresequenz vorliegenden Mutationen.

Gal-8 *short* und *long* interagieren in vergleichbaren Mengen mit EGFP-markiertem K-Ras(G12V), K-Ras(G12V,K184P) und K-Ras(G12V,K182S). Nach Austausch beider Lysine in der Farnesyldomäne von K-Ras(G12V), ist die Interaktion zwischen K-Ras(G12V,K182S,K184P) und Gal-8 um etwa 50 % reduziert (Abb. 3.10A). Die Mutation von H-Ras an Position 183 führt zum Vorliegen von zwei Lysinen innerhalb der Farnesyldomäne von H-Ras. Der Interaktionsindex von Gal-8 *short* und *long* mit H-Ras(G12V,S183K) ist in diesem Falle um den Faktor  $1.8 \pm 0.058$  (Gal-8s) bzw.  $1.64 \pm 0.072$  (Gal-8l) gestiegen (Abb. 3.10B). Eine Interaktion von Gal-8 mit EGFP-N-Ras(G12V) ist nicht quantifizierbar. Allerdings kann nach Insertion von zwei Lysinen an Position 183 und 185 der Farnesyldomäne von N-Ras eine leichte Interaktion mit Gal-8 nachgewiesen werden. Bereits die Mutation N-Ras(G12V,P185K) führt zu einer sehr schwachen Interaktion von Gal-8 *short* mit N-Ras (Abb. 3.10C). Aufgrund der all-

gemein geringeren Expression von Gal-8 *long* in PANC-1-Lysaten wurde auf eine densitometrische Analyse von Gal-8 *long* in Interaktion mit N-Ras verzichtet. Die hier abgebildeten Blots stehen repräsentativ für fünf (K-Ras-Mutanten), drei (H-Ras-Mutanten) bzw. vier (N-Ras-Mutanten) durchgeführte Experimente.

Der Versuch zeigt, dass die Interaktion von Ras mit Gal-8 abhängig von den in der Farnesyldomäne von Ras vorhandenen positiv-geladenen Lysininen ist. Werden Lysine der Farnesyldomäne von H-Ras bzw. N-Ras zugefügt ist die Interaktion mit Gal-8 stärker bzw. findet überhaupt statt. Werden hingegen Lysine entfernt, so ist eine Reduktion der Interaktion zwischen Gal-8 und Ras erkennbar. Die zu Beginn dieses Kapitels aufgestellte Hypothese, dass negativ-geladene Aminosäuren in unmittelbarer Nähe der hydrophoben Bindungstasche von Gal-8 mit den positiv-geladenen Lysininen der Farnesyldomäne von Ras die Interaktion positiv beeinflussen können, hat sich bestätigt.

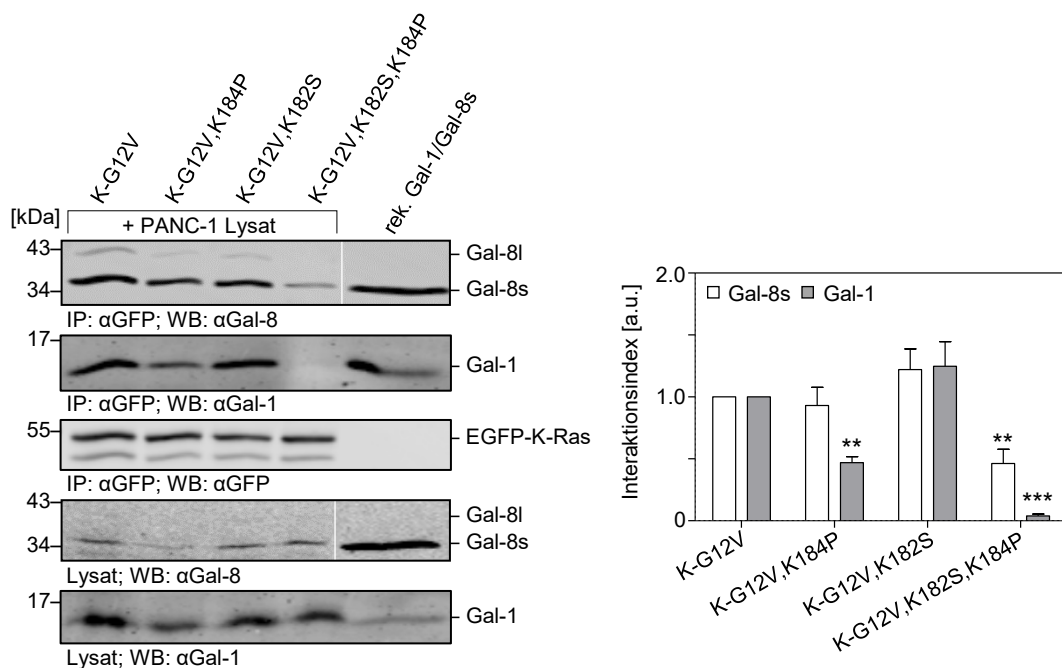


**Abb. 3.10: Interaktion von Ras und Gal-8 in Abhängigkeit von der Farnesyldomäne von Ras.** Die oberen Blots zeigen ko-präzipitiertes Gal-8 *short* und *long* nach erfolgter *in vitro*-Interaktion, während die unteren Blots den Gehalt an Gal-8 im verwendeten Proteinlysate darstellen. Die mittleren Blots zeigen den Nachweis auf präzipitiertes EGFP-Ras. Der Quotient aus den densitometrisch quantifizierten Intensitäten von Gal-8 *short* bzw. *long* in Relation zur Intensität von präzipitiertem EGFP-Ras wurde kalkuliert, auf die Interaktion zwischen Gal-8 und EGFP-K-Ras(G12V) (**A**), EGFP-H-Ras(G12V) (**B**) und EGFP-N-Ras(G12V,P183K,P185K) (**C**) normalisiert, als Interaktionsindex definiert und unter den jeweiligen Blots dargestellt. In allen drei Teilabbildungen ist ein repräsentativer Blot von drei bis fünf durchgeführten Experimenten dargestellt. Die statistische Analyse der densitometrischen Bestimmungen erfolgte mittels zweiseitigem Einstichproben t-test (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; Mittelwert  $\pm$  SD;  $n = 3-5$ ).

### 3.1.9.2 Interaktion von Ras-Lysin-Mutanten mit Gal-1

Vergleichbar zur Versuchsdurchführung in Kapitel 3.1.8 sind in diesem Kapitel die Ergebnisse der Interaktion der in HEK293 exprimierten K-Ras-Lysin-Mutanten mit endogenem Gal-1 aus PANC-1-Lysaten dargestellt. Das Resultat dieses Versuches unterscheidet sich in zwei Punkten zu der Interaktion von Gal-8 mit den K-Ras-Lysin-Mutanten. Während die Interaktion von Gal-1 mit EGFP-K-Ras(G12V) und EGFP-K-Ras(G12V,K182S) eine ähnliche Stärke aufweist, ist die Interaktion mit EGFP-K-Ras(G12V,K184P) um etwa 50 % schwächer. Der Interaktionsindex liegt hier bei einem Faktor von 0.5 verglichen zur Interaktion von Gal-1 mit EGFP-K-Ras(G12V). Weiterhin zeigt die K-Ras-Lysin-Mutante EGFP-K-Ras(G12V,K182S,K184P) keine Interaktion mit Gal-1.

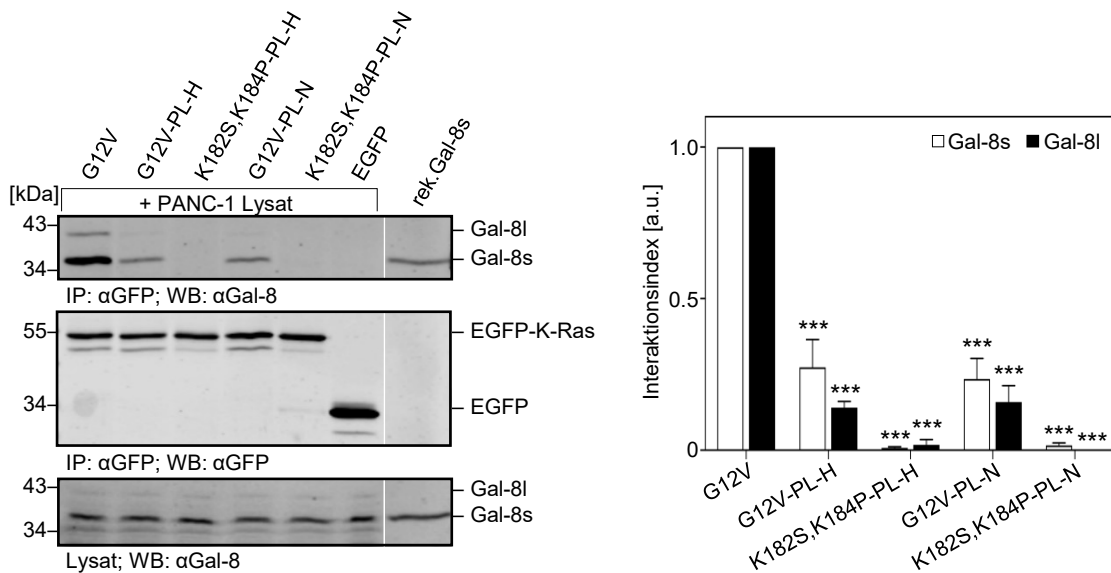
Dies bedeutet, dass Gal-1 möglicherweise einen anderen Interaktionsmechanismus oder eine anders aufgebaute hydrophobe Tasche besitzt als Gal-8. Die positiv-geladenen Lysine scheinen hier eine noch wichtigere Rolle zu spielen, als bei der Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras.



**Abb. 3.11: Interaktion von Ras-Lysin-Mutanten mit Gal-1.** Die zwei unteren Blots zeigen im PANC-1-Lysat vorhandene Mengen an endogenem Gal-8 bzw. Gal-1. Die oberen zwei Blots stellen ko-präzipitiertes Gal-8 bzw. Gal-1 dar. Der mittlere Blot zeigt den Nachweis der vier präzipitierten K-Ras-Mutanten. In der rechten Spur ist das rekombinante Gal-1 bzw. Gal-8s aufgetragen. Densitometrisch wurden die Intensitäten von Gal-8s, Gal-1 und den EGFP-Ras-Mutanten ermittelt. Der Quotient aus Gal-8s bzw. Gal-1 zur jeweiligen EGFP-Ras-Mutante wurde berechnet, auf die Interaktion zwischen Gal-8s bzw. Gal-1 und EGFP-K-Ras(G12V) normalisiert und im Balkendiagramm als Interaktionsindex (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=5$ ) dargestellt. Die statistische Analyse der densitometrischen Bestimmungen erfolgte mittels zweiseitigem Einstichproben t-test (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; Mittelwert  $\pm$  SD;  $n = 3-5$ ).

### 3.1.10 Interaktion von Mutanten der polybasischen Domäne von K-Ras mit Gal-8

Neben den zwei Lysininen in unmittelbarer Nähe zum farnesylierten Cystein der Ras-Proteine, findet sich *upstream* in der Aminosäuresequenz von K-Ras eine sechs Lysine umfassende, sogenannte polybasische Domäne. Da auch diese Lysine einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras haben könnten, wurde die polybasische Domäne des K-Ras durch die entsprechende Aminosäuresequenz von H-Ras (PL-H) oder N-Ras (PL-N) ersetzt. Zusätzlich dazu, wurden die beiden Lysine an Position 182 und 184 in der Aminosäuresequenz von K-Ras durch ein Serin bzw. Prolin ersetzt. Zur Vereinfachung der Bezeichnung der Mutanten sind nur noch die einzelnen Punktmutationen von EGFP-K-Ras in der Abbildung als Beschriftung angeführt.



**Abb. 3.12: Mutanten der polybasischen Domäne von K-Ras in Interaktion mit Gal-8.** Der obere Blot zeigt ko-präzipitiertes Gal-8 *short* und *long*, während der untere Blot Gal-8 im eingesetzten Proteinylysate nachweist. Der mittlere Blot zeigt die präzipitierten EGFP-K-Ras-Mutanten nach Detektion über einen anti-GFP Antikörper. Der Quotient aus den densitometrischen Bandenintensitäten der EGFP-K-Ras-Mutanten und Gal-8 *short* und *long* wurde berechnet, auf die Interaktion von EGFP-K-Ras(G12V) zu Gal-8 *short* bzw. *long* normalisiert und als Interaktionsindex [a.u.] im Balkendiagramm graphisch abgebildet. Die statistische Analyse erfolgte über einen zweiseitigen Einstichproben t-test (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ ; Mittelwert  $\pm$  SD;  $n = 3$ ).

Die EGFP-K-Ras-Mutanten wurden in HEK293-Zellen exprimiert, die Zellen lysiert, EGFP-K-Ras präzipitiert und ko-präzipitiertes Gal-8 aus PANC-1-Zellysaten mittels Western Blot nachgewiesen. Der obere Blot in Abb. 3.12 zeigt ko-präzipitiertes Gal-8 *short* und *long*, während der untere Blot die Menge an Gal-8 im eingesetzten Proteinylysate nachweist. Der mittlere Blot zeigt den Nachweis der präzipitierten K-Ras-Mutanten. Densitometrische Bestimmungen der Bandenintensität der präzipitierten EGFP-

K-Ras-Mutanten sowie des ko-präzipitierten Gal-8 *short* und *long* wurden durchgeführt. Der Quotient aus beiden wurde auf die Interaktion von EGFP-K-Ras(G12V) zu Gal-8 *short* bzw. *long* normalisiert und als Interaktionsindex [a.u.] graphisch dargestellt.

Die Analysen zeigen, dass die Interaktion zwischen EGFP-K-Ras(G12V) und Gal-8 *short* bzw. *long* am stärksten detektiert werden konnte. Ist die polybasische Domäne von K-Ras gegen die korrespondierende Aminosäuresequenz von H-Ras (PL-H) oder von N-Ras (PL-N) ausgetauscht, sinkt die Interaktion von Gal-8 *short* und *long* auf unter 30 %. Die zusätzliche Mutation der zwei verbleibenden Lysine führt zu einem kompletten Verlust in der Interaktion mit Gal-8 für die beiden untersuchten K-Ras-Mutanten. Nach Austausch der polybasischen Domäne von K-Ras zu der korrespondierenden Aminosäuresequenz von H- und N-Ras wurde die Anzahl an positiv-geladenen Lysinen in der polybasischen Domäne reduziert. Dies führt dazu, dass die Interaktion der EGFP-K-Ras(G12V)-PL-H bzw. PL-N Mutanten und Gal-8 deutlich reduziert vorliegt, aber dennoch im Vergleich zur Interaktion mit EGFP-K-Ras(G12V) zu etwa 30 % detektiert werden kann. Dies begründet sich durch die beiden verbliebenen, positiv-geladenen Lysine K182 und K184. Liegen diese ebenfalls gegen korrespondierende Aminosäuren von H- und N-Ras ausgetauscht vor, so ist die Interaktion zwischen den Ras-Mutanten und Gal-8 vollständig inhibiert. Dies zeigt die enorme Bedeutung der positiv-geladenen Lysine für die Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras.

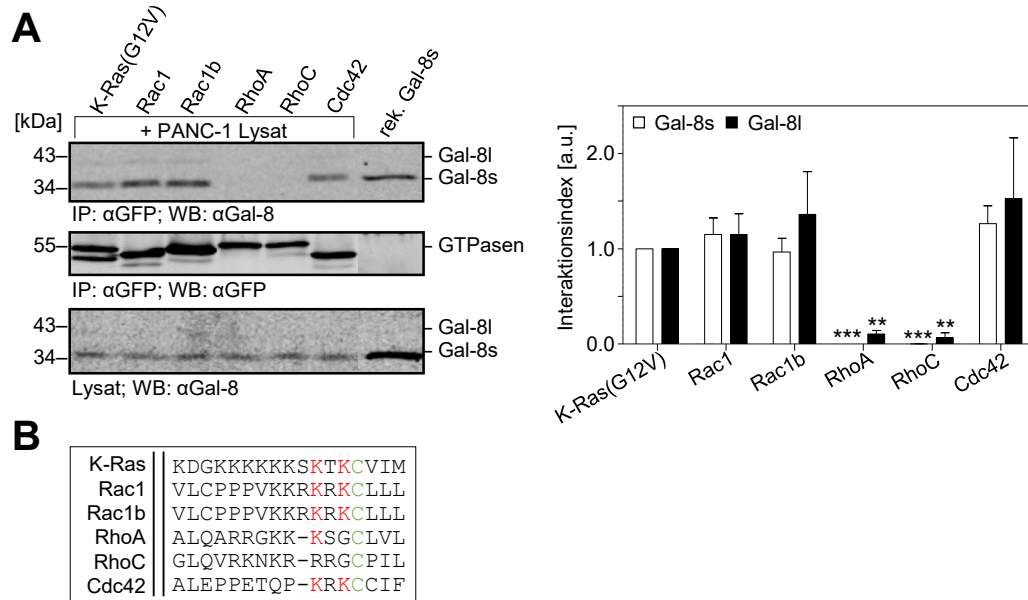
### 3.1.11 Interaktion von Gal-8 mit Rho-GTPasen

Neben Ras-Proteinen werden weitere Proteine, die zur Ras-Superfamilie gehören posttranslational prenyliert. Rac1, Rac1b, RhoA, RhoC und Cdc42 werden dabei am Cystein des CAAX-Motivs geranylgeranyliert, während K-Ras farnesyliert wird [99]. Die Geranylgeranylierung ist der Farnesylierung ähnlich und unterscheidet sich lediglich in der Länge der Kohlenstoffkette. Während die Geranylgeranylierung 20-Kohlenstoffe besitzt verfügt die Farnesylierung über 15 Kohlenstoffe. Somit könnte durch Inkorporation der Geranylgeranylgruppe der Rho-GTPasen in die hydrophobe Tasche von Gal-8 ebenfalls eine Interaktion möglich sein.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden EGFP-markierte Rho-GTPasen in HEK293 exprimiert und im Anschluss unter Verwendung von PANC-1-Lysat in *in vitro*-Interaktionsstudien eingesetzt.

Abb. 3.13A zeigt im oberen Blot ko-präzipitiertes Gal-8, während der untere Blot den Gehalt an Gal-8 im PANC-1-Lysat darstellt. Der mittlere Blot zeigt den Nachweis der präzipitierten GTPasen über einen anti-GFP Antikörper nach. Zur Quantifizierung wurden densitometrische Analyse durchgeführt, die bereits in Kap. 3.1.10 beschrieben sind. Abb. 3.13B zeigt die vergleichende Aminosäuresequenz-Analyse der letzten 17 Aminosäuren der in diesem Versuch verwendeten GTPasen. Posttranslational prenylierte Cysteine sind grün gefärbt.

Die Ergebnisse zeigen, dass Gal-8 mit EGFP-K-Ras(G12V), -Rac1, -Rac1b und -Cdc42 interagiert. Der densitometrisch kalkulierte Interaktionsindex zeigt in etwa gleiche Bindungspräferenzen von Gal-8 mit diesen GTPasen, verglichen zur Interaktion von Gal-8 mit EGFP-K-Ras(G12V). Der Interaktionsindex von Gal-8s bzw. Gal-8l mit RhoA bzw. RhoC sinkt auf Werte von unter  $0.1043 \pm 0.07$ . In vorangehenden Versuchen wurden die beiden Lysine 182 und 184 in der C-terminalen Aminosäuresequenz von K-Ras als essentiell für die Interaktion mit Gal-8 beschrieben. Rho-GTPasen, bei denen eine Interaktion mit Gal-8 nachgewiesen worden ist, weisen an den korrespondierenden Aminosäuresequenzen ebenfalls Lysine auf. In den Aminosäuresequenzen von RhoA und RhoC fehlen diese (Abb. 3.13B).



**Abb. 3.13: Interaktion von Gal-8 mit weiteren GTPasen. (A)** EGFP-markierte GTPasen wurden in HEK293-Zellen transient exprimiert, die Zellen lysiert und gleiche Mengen an EGFP-GTPasen über  $\mu$ Macs anti-GFP *beads* präzipitiert. PANC-1-Lysat wurde als Quelle von endogenem Gal-8 hinzugefügt. Das Präzipitat wurde im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert. Der obere Blot zeigt ko-präzipitiertes Gal-8, der untere im PANC-1-Lysat befindliches Gal-8. Der mittlere Blot zeigt die präzipitierten EGFP-GTPasen. Die Daten der densitometrischen Analyse sind rechts dargestellt. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die statistische Analyse erfolgte über einen zweiseitigen Einstichproben t-test (\*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; Mittelwert  $\pm$  SD;  $n = 3$ ). **(B)** Vergleichende Aminosäuresequenz-Analysen von K-Ras und Rho-GTPasen. In grün ist das posttranslational prenylierte Cystein abgebildet. In rot sind die Lysine in unmittelbarer Nähe zum prenylierten Cystein hervorgehoben.

### 3.1.12 Zusammenfassung der Ergebnisse der Interaktionsstudien von Ras und Gal-8

Die im Kapitel 3.1 beschriebenen Interaktionsstudien zwischen Ras und Gal-8 haben eine direkte Interaktion zwischen endogenem K-Ras und Gal-8 über verschiedene *in vitro*-Interaktionsassays und Ko-Präzipitationsstudien nachgewiesen. In geringerem Maße konnte auch eine Interaktion von H-Ras mit Gal-8 nachgewiesen werden, während N-Ras nicht in der Lage ist, mit Gal-8 zu interagieren.

Die Interaktion der beiden Proteine ist direkt abhängig von der posttranslationalen Farnesylierung von K-Ras am terminalen Cystein des CAAX-Motivs. Das gebundene Guaninnukleotid von K-Ras spielt für eine Interaktion, anders als es für Gal-1 und Gal-3 gezeigt wurde, keine Rolle.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die N-CRD die Interaktion von Gal-8 mit Ras vermittelt und dass die *hinge*-Region hierbei keinen zusätzlichen Effekt auf die Interaktion zeigt. Allerdings konnte eine leichte Bindung der C-CRD-*hinge* an K-Ras gezeigt werden, obwohl die C-CRD keine Interaktion mit K-Ras zeigt.

In den zuletzt dargestellten *in vitro*-Interaktionsassays konnten insgesamt acht Lysine innerhalb der Farnesyldomäne und der polybasischen Domäne von Ras bestimmt werden, die essentiell für die Interaktion von K-Ras mit Gal-8 sind. Fehlen die Lysine aus der polybasischen Domäne oder die zwei Lysine in unmittelbarer Nähe des posttranslational farnesylierten Cysteins, so ist die Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras stark vermindert.

Zuletzt konnten GTPasen mit vergleichbarem C-Terminus zu K-Ras mittels *in vitro*-Interaktionsassays detektiert werden, die mit Gal-8 interagieren.

## 3.2 Einfluss von Gal-8 auf den Ras/Raf/MEK/ERK und PI3K/Akt-Signalweg in PANC-1- und Colo699-Zellen

Auf Grundlage der in unserer Arbeitsgruppe erzielten Daten, konnte ein Einfluss von Gal-8 auf den PI3K-Akt-Signalweg bereits beschrieben werden [67, 77]. In Verbindung mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit, dass eine direkte Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras besteht, wurde der Effekt eines Gal-8-*knockdowns* auf die zwei am besten charakterisiertesten und von Ras beeinflussten Signalwege – dem Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg sowie dem PI3K-Akt Signalweg – analysiert.

Hierzu wurden PANC-1- bzw. Colo699-Zellen mit spezifischen Gal-8 siRNAs bzw. Kontroll-siRNAs transfiziert und im Anschluss lysiert. Unter Verwendung von spezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von ERK und Akt analysiert und die erhaltenen Signale wurden zur Auswertung densitometrisch quantifiziert.

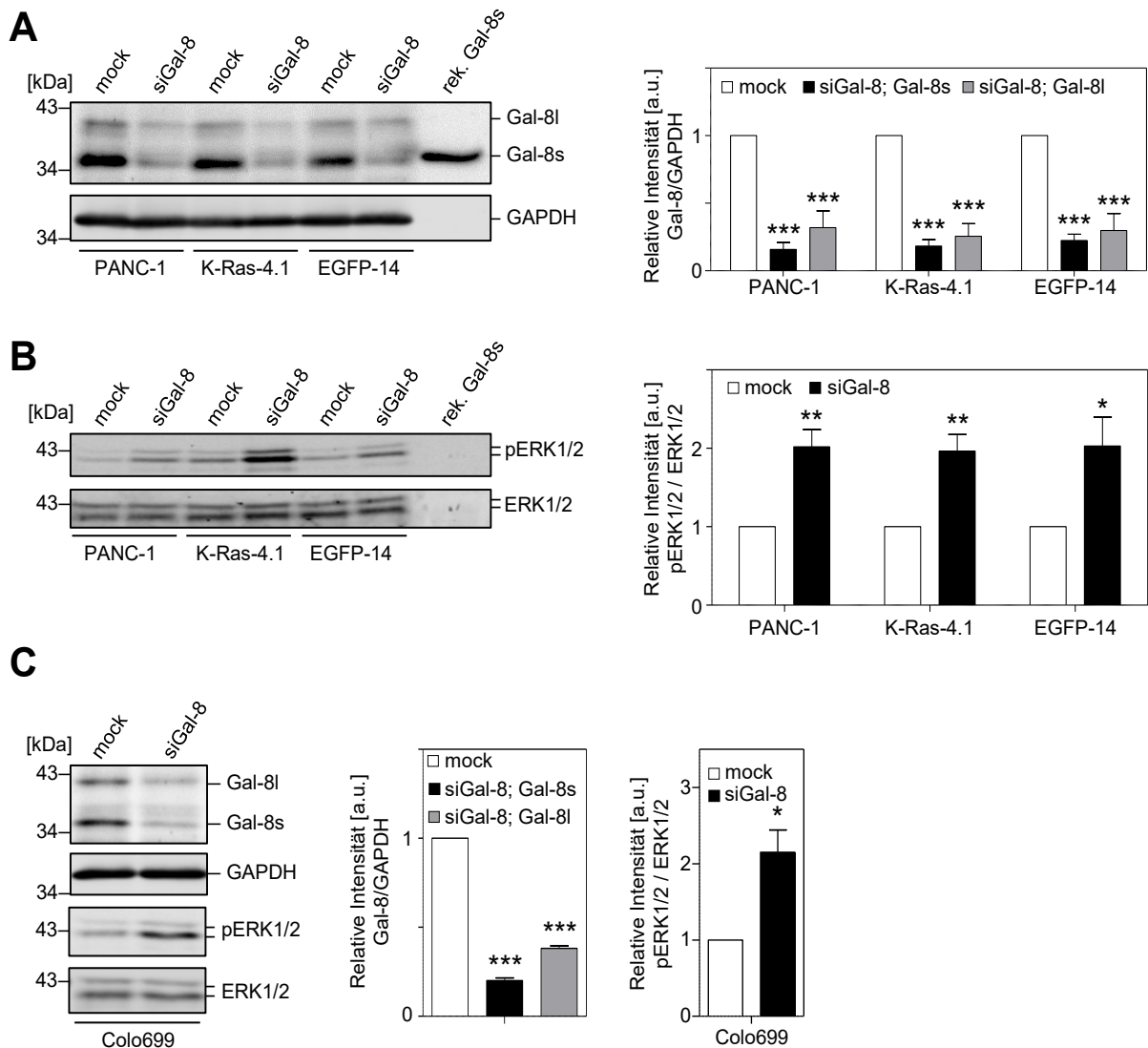
### 3.2.1 Die Depletion von Gal-8 führt zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2

PANC-1-Zellen und PANC-1-Zellen, die stabil EGFP-K-Ras(G12V) (K-Ras-4.1) bzw. EGFP (EGFP-14) überexprimieren, sowie Colo699-Zellen, wurden mit einem Pool aus 4 siRNAs gegen Gal-8 bzw. mit Kontroll-siRNAs transfiziert und die Phosphorylierung von ERK1/2 unter Verwendung spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen.

In Abb. 3.14A ist der *knockdown* von Gal-8 in den PANC-1-, K-Ras-4.1- und EGFP-14-Zellen mittels eines Gal-8 Antikörper nachgewiesen. Die Effizienz des *knockdowns* liegt nach densitometrischer Analyse der Bandenintensität bei mehr als 75 % für die beiden Gal-8 Isoformen *short* und *long* in allen drei Zelllinien. Ein Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 an Threonin202 und Tyrosin204, ist nach Gal-8-*knockdown* zu verzeichnen. Die Phosphorylierung von ERK1/2 steigt hier auf Faktoren  $2.0 \pm 0.22$  (PANC-1),  $1.8 \pm 0.23$  (K-Ras4.1), und  $2.0 \pm 0.37$  (EGFP-14) (Abb. 3.14B). Auffällig ist, dass die basale Phosphorylierung von ERK in den K-Ras-4.1-Zellen im Vergleich zu den PANC-1- und EGFP-14-Zellen erhöht vorliegt, während die Expression von ERK1/2 zwischen den Zelllinien vergleichbar ist. Die in Abbildung 3.14A und B dargestellten Western Blots stehen repräsentativ für mehr als sechs durchgeführte Versuche. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM.



Abb. 3.14C zeigt den *knockdown* von Gal-8 in Colo699-Zellen und den dazugehörigen Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 nach Gal-8-*knockdown*. Die densitometrische Analyse zeigt einen Gal-8-*knockdown* auf einen Faktor von  $0.2 \pm 0.03$  für Gal-8s und auf  $0.382 \pm 0.023$  für Gal-8l. Der Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung liegt bei Faktor  $2.15 \pm 0.29$  und ist damit vergleichbar zum Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung in PANC-1 nach Gal-8-Depletion.



**Abb. 3.14: Einfluss der Gal-8 Depletion auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in PANC-1- und Colo699-Zellen. (A)** Der obere Blot zeigt den Nachweis auf Gal-8 in PANC-1, K-Ras-4.1 und EGFP-14 Zellen unter Verwendung eines siGal-8-Pools (siGal-8) oder Kontroll-siRNAs (mock). Der untere Blot zeigt den Nachweis auf GAPDH als Ladungskontrolle. Auf der rechten Seite ist die densitometrische Analyse abgebildet (Mittelwerte  $\pm$  SEM; zweiseitiger Einstichproben t-test; \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ;  $n = 6$ ). **(B)** Der obere Blot der Abbildung zeigt den Nachweis auf pERK1/2, der untere auf ERK1/2 mittels spezifischer Antikörper. Auf der rechten Seite ist die zugehörige densitometrische Auswertung dargestellt (Mittelwerte  $\pm$  SEM; zweiseitiger Einstichproben t-test; \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ;  $n \geq 6$ ). **(C)** Der obere Blot zeigt den Nachweis auf Gal-8 in Colo699-Zellen unter Verwendung eines siGal-8-Pools (siGal-8) oder Kontroll-siRNAs (mock). Die darauffolgenden Blots zeigen die Nachweise auf GAPDH, pERK1/2 und ERK1/2. Auf der rechten Seite sind die densitometrischen Auswertungen der Gal-8 Depletion und des Verhältnisses aus pERK1/2 zu ERK1/2 dargestellt (Mittelwerte  $\pm$  SEM; zweiseitiger Einstichproben t-test; \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ;  $n = 4$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass nach einem *knockdown* von Gal-8 in den getesteten Zelllinien die Phosphorylierung von ERK1/2 an Threonin202 und Tyrosin204 erhöht vorliegt, während kein Einfluss des *knockdowns* auf die Expression von ERK1/2 nachgewiesen wurde.

### **3.2.2 Die Depletion von Gal-8 beeinflusst die Proteinmenge von EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1-Zellen**

Im Zuge der siRNA-vermittelten *knockdown*-Experimente von Gal-8 konnte eine erhöhte Proteinmenge von EGFP-K-Ras(G12V) in stabil transfizierten PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V)-Zellen (K-Ras-4.1) detektiert werden. Dieser Einfluss ist in den folgenden drei Kapiteln dargestellt und beschreibt tiefergehend die Lokalisation von EGFP-K-Ras(G12V) sowie die Beteiligung des Proteasoms auf die erhöhte Proteinmenge von EGFP-K-Ras(G12V) nach *Gal-8-knockdown*.

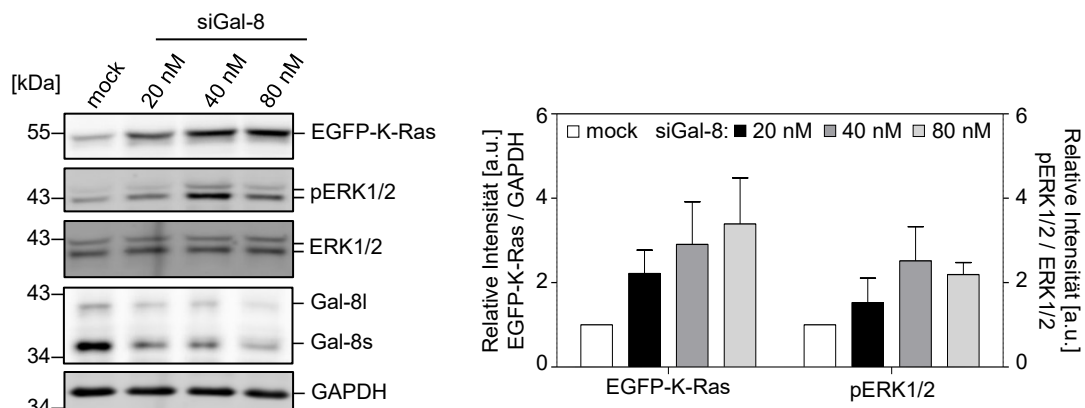
#### **3.2.2.1 Beeinflussung der Expression von EGFP-K-Ras(G12V) nach Depletion von Gal-8 in PANC-1-Zellen**

PANC-1-, K-Ras-4.1- und EGFP-14-Zellen wurden mit Gal-8 bzw. mit Kontroll-siRNA transfiziert. In diesen Versuchen wurden die siRNAs in unterschiedlichen Konzentrationen (20, 40 und 80 nM) verwendet und die Lysate mittels Western Blot auf den Proteingehalt von EGFP-K-Ras(G12V) und Gal-8 untersucht. Parallel dazu wurde die Expression und die Phosphorylierung von ERK1/2 analysiert. Die densitometrische Analyse erfolgte wie in Kapitel 3.2 beschrieben und zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM als Balkendiagramm (n = 3).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Western Blot Analysen zeigen einen Anstieg von EGFP-K-Ras(G12V) bei gleichzeitiger siRNA-vermittelter Reduktion von Gal-8 (Abb. 3.15). Parallel zum Anstieg von EGFP-K-Ras(G12V) ist eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 nachweisbar. Der Proteingehalt von EGFP-K-Ras(G12V) steigt auf bis zu  $3.39 \pm 1.09$  bei Verwendung von 80 nM siGal-8 verglichen zur Kontrolle an. Gleichzeitig ist eine Erhöhung von pERK1/2 bis auf einen Faktor von  $2.52 \pm 0.8$  bei Einsatz von 40 nM siRNA verglichen zur Kontrolle erkennbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Reduktion des Proteingehalts von Gal-8 zu einem Anstieg von EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1-Zellen abhängig von der Konzentration der siRNA führt. Parallel zum Anstieg der EGFP-K-Ras(G12V)-Expression steigt auch

die Phosphorylierung von ERK1/2 an, während der Proteingehalt von ERK1/2 unverändert vorliegt.



**Abb. 3.15: Beeinflussung der Expression von EGFP-K-Ras(G12V) nach Gal-8-Depletion in PANC-1-Zellen.** EGFP-K-Ras(G12V) überexprimierenden PANC-1-Zellen (K-Ras-4.1) wurden mit ansteigenden Konzentrationen an Gal-8 siRNA oder Kontroll-siRNA (mock) transfiziert und 72 Stunden später in Kloog-Puffer lysiert. Die Expression von EGFP-K-Ras(G12V), pERK1/2, ERK1/2, Gal-8 und GAPDH als Ladungskontrolle wurde über spezifische Antikörper nachgewiesen. Die densitometrische Analyse der Verhältnisse aus EGFP-K-Ras(G12V) zu GAPDH und von pERK1/2 / ERK1/2 sind auf der rechten Seite dargestellt. Die Blots stehen repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente, deren Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  SEM im Balkendiagramm zusammengefasst wurden ( $n = 3$ ).

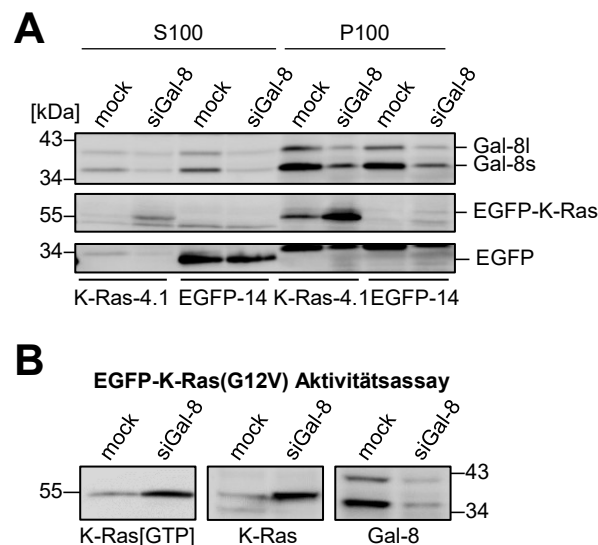
### 3.2.2.2 Subzelluläre Lokalisation und Aktivität von EGFP-K-Ras(G12V) nach Depletion von Gal-8 in PANC-1-Zellen

Um zu überprüfen, ob der erhöhte EGFP-K-Ras(G12V)-Gehalt nach einer Depletion von Gal-8 mit einer erhöhten Menge an membrangebundenem EGFP-K-Ras(G12V) korreliert oder ob die erhöhte Proteinmenge von EGFP-K-Ras(G12V) im Zytosol vorliegt, wurde eine Präparation von partikulären und löslichen Proteinen gemäß Kap. 2.2.4.2 durchgeführt. Des Weiteren soll mit den Versuchen geklärt werden, ob neben dem erhöhten Proteingehalt an EGFP-K-Ras(G12V) auch eine erhöhte K-Ras-Aktivität in den stabil transfizierten PANC-1-Zellen nachgewiesen werden kann.

Zu Beantwortung der ersten Frage wurden stabil EGFP-K-Ras(G12V)- bzw. EGFP-exprimierende PANC-1-Zellen (K-Ras-4.1 bzw. EGFP-14) mit Gal-8 siRNA bzw. einer Kontroll-siRNA (mock) transfiziert und eine Präparation der partikulären (P100) sowie der löslichen Fraktion (S100) bei 100000 x g durchgeführt (Kap. 2.2.4.2). In Abb. 3.16 sind die Ergebnisse der subzellulären Lokalisation dargestellt. Eine Reduktion der Gal-8-Proteinmenge ist nach *knockdown* von Gal-8 sowohl in den K-Ras-4.1-, als auch in den EGFP-14-Zellen in der löslichen und in der partikulären Fraktion nachweisbar.

In den 25 µg der P100-Fraktion ist mehr Gal-8 identifizierbar als in den 50 µg der S100-Fraktion. Erneut ist eine inverse Beziehung zwischen der Reduktion im Gehalt an Gal-8 und einem gleichzeitigem Anstieg von EGFP-K-Ras(G12V) zu verzeichnen. In der membranären P100-Fraktion ist der Gehalt an EGFP-K-Ras(G12V) und Gal-8 größer als in der S100-Fraktion. Nach *knockdown* von Gal-8 steigt vor allem die Menge an EGFP-K-Ras(G12V) in der membranären Fraktion an, während nur ein geringfügiger Anstieg in der zytosolischen S100-Fraktion vorliegt. Der Gehalt an EGFP-Protein nach Gal-8-*knockdown* ändert sich hierbei nicht. Weiterhin ist EGFP nicht in der P100-Fraktion nachweisbar.

Dies bedeutet, dass der in Kap. 3.2.2.1 identifizierte Anstieg von EGFP-K-Ras(G12V) nach einem *knockdown* von Gal-8 vor allem in der membranären Fraktion der Zellen nachweisbar ist. Dies wirft die Frage auf, ob die erhöhte Menge an EGFP-K-Ras(G12V) auch aktiv, an der Signaltransduktion beteiligt vorliegt. Diesbezüglich wurden die Ergebnisse eines Ras-Aktivitätsassays nach einem *knockdown* von Gal-8 in PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V)-4.1 (K-Ras-4.1) mit den Ergebnissen einer mock-transfizierten Kontrolle verglichen. Mit Hilfe des Ras-Aktivitätsassays wurde aktives EGFP-K-Ras(G12V) präzipitiert und kann über einen anti-GFP-Antikörper nachgewiesen werden. Abb. 3.16B zeigt diesen Nachweis auf aktives, GTP-geladenes EGFP-K-Ras(G12V) nach Transfektion einer Kontroll-siRNA und einer siGal-8 siRNA (Abb. 3.16B, links). Die nächsten beiden Blots zeigen den Proteingehalt an EGFP-K-Ras(G12V) (mittlerer Blot) und an Gal-8 (rechter Blot) im Lysat, welches für den Ras-Aktivitätsassay verwendet wurde. Der erhöhte Proteingehalt an EGFP-K-Ras(G12V) nach einem *knockdown* von Gal-8 korreliert hier mit der gesteigerten EGFP-K-Ras(G12V) Aktivität, welche durch den Ras-Aktivitätsassay nachgewiesen wurde. Das bedeutet, dass die erhöht vorliegende Menge an EGFP-K-Ras(G12V) zum einen in der membranären Fraktion nachweisbar ist und zum anderen dort im aktiven, GTP-gebundenen Zustand vorliegt und daher an der Signaltransduktion beteiligt ist.



**Abb. 3.16: Subzelluläre Lokalisation und Aktivität von EGFP-K-Ras(G12V) nach Gal-8-Depletion in PANC-1-Zellen.** Stabil EGFP-K-Ras(G12V)- bzw. EGFP-exprimierende PANC-1-Zellen wurden mit einer siRNA gegen Gal-8 bzw. einer Kontroll-siRNA (mock) transfiziert, nach 72 Stunden lysiert und eine Präparation von partikulären (P100) und löslichen (S100) Proteinen bei Zentrifugation mit 100000 x g durchgeführt. 50 µg der S100- und 25 µg der P100-Fraktion wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, geblottet und mit Hilfe spezifischer Antikörper Gal-8, EGFP-K-Ras(G12V) und EGFP nachgewiesen. Ein repräsentatives Experiment von insgesamt vier durchgeführten Versuchen ist abgebildet. **(B)** Die EGFP-K-Ras(G12V)-Aktivität in PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V)-Zellen wurde nach Transfektion mit einer Kontroll-siRNA und der Gal-8 siRNA mit Hilfe eines Ras-Aktivitätsassays bestimmt. Der Gehalt an GTP-gebundenem EGFP-K-Ras(G12V) wurde über einen GFP-Antikörper nachgewiesen (linker Blot). In der Mitte ist der totale Gehalt an EGFP-K-Ras(G12V) dargestellt, rechts der Proteingehalt an Gal-8, nachgewiesen über einen spezifischen Gal-8 Antikörper. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von insgesamt vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

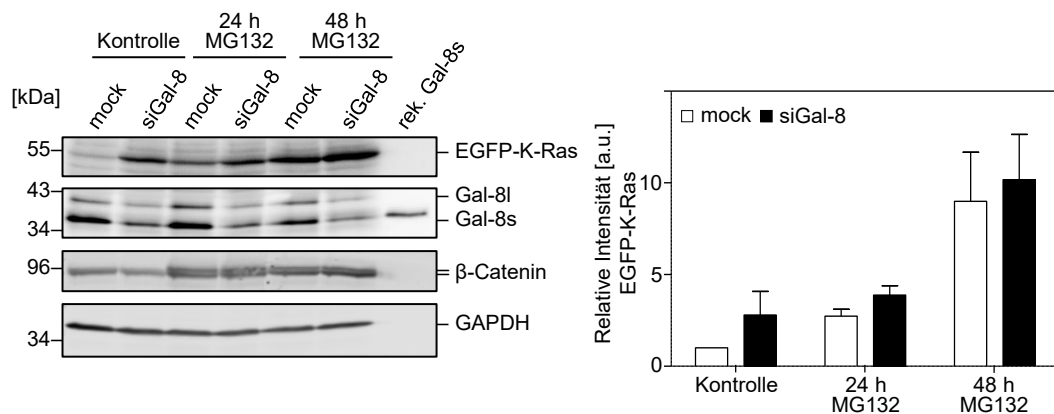
### 3.2.2.3 Einfluss einer Gal-8-Depletion auf den proteasomalen Abbau von EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1-Zellen

Der Proteingehalt an EGFP-K-Ras(G12V) steigt mit abnehmendem Proteingehalt an Gal-8 an (Kap. 3.2.2.1). Um zu klären, ob die erhöhte Proteinmenge von EGFP-K-Ras(G12V) auf eine Inhibition der Proteindegradation rückzuführen ist, wurde der Proteasominhibitor MG132 in Kombination mit einem *knockdown* von Gal-8 verwendet. Hierzu wurden PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V)-Zellen mit einer Kontroll-siRNA (mock) bzw. mit einer Gal-8 siRNA transfiziert. Die Zellen wurden nach 72 h lysiert. Ein Teil der Zellen wurde zuvor für 24 bzw. 48 h mit dem Proteasominhibitor MG132 (5 µM) zusätzlich zur Transfektion mit der Kontroll-siRNA bzw. der Gal-8 siRNA behandelt. Abbildung 3.17 ist in Kontrolle, 24 und 48 h MG132 Behandlung unterteilt und zeigt die Nachweise auf EGFP-K-Ras(G12V), Gal-8, β-Catenin und GAPDH nach Gal-8-*knockdown* und nach mock-Transfektion der Zellen. In der dargestellten Kontrolle steigt der Gehalt von EGFP-K-Ras(G12V) nach Gal-8-*knockdown* auf  $2.79 \pm 1.29$  verglichen zur mock-Kontrolle an. Wird der Proteasominhibitor MG132 für 24 h verwendet, so liegt

die relative densitometrische Intensität von EGFP-K-Ras(G12V) der mock-Kontrolle bei  $2.73 \pm 0.38$ , also vergleichbar mit der Kontrolle nach siGal-8-*knockdown* ohne MG132. Ein *knockdown* von Gal-8 in Kombination mit einer 24-stündigen MG132-Behandlung steigert die relative Intensität von EGFP-K-Ras(G12V) auf einen Wert von  $3.89 \pm 0.50$ . Bei 48-stündiger Behandlung der PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V)-Zellen mit MG132, steigen die relativen Intensitätswerte von EGFP-K-Ras(G12V) auf  $8.99 \pm 2.67$  für die mock-Kontrolle und auf  $10.17 \pm 2.47$  nach Gal-8-*knockdown* an.

Sowohl bei Verwendung des MG132-Inhibitors für 24, als auch für 48 h konnte eine Doppelbande im Nachweis auf  $\beta$ -Catenin identifiziert werden. Dies ist als Positivkontrolle zu verstehen, da  $\beta$ -Catenin in der Zelle diversen Modifikationen ausgesetzt ist, die zur Degradation führen [100]. Liegt das Proteasom inhibiert vor, kann das modifizierte  $\beta$ -Catenin zusätzlich zu  $\beta$ -Catenin in Form einer Doppelbande nachgewiesen werden.

Der Versuch zeigt, dass unter Verwendung des Proteasom-Inhibitors MG132 eine ähnlich starke, zeitabhängige Akkumulation von EGFP-K-Ras(G12V) in den PANC-1-Zellen verglichen mit einer Gal-8-Depletion in diesen Zellen eintritt. Auf Basis dieser Versuche ist es denkbar, dass Gal-8 auch an der Proteasom-vermittelten K-Ras Degradation beteiligt ist. Dies müsste durch weitere Analysen und Versuche detailliert untersucht werden.



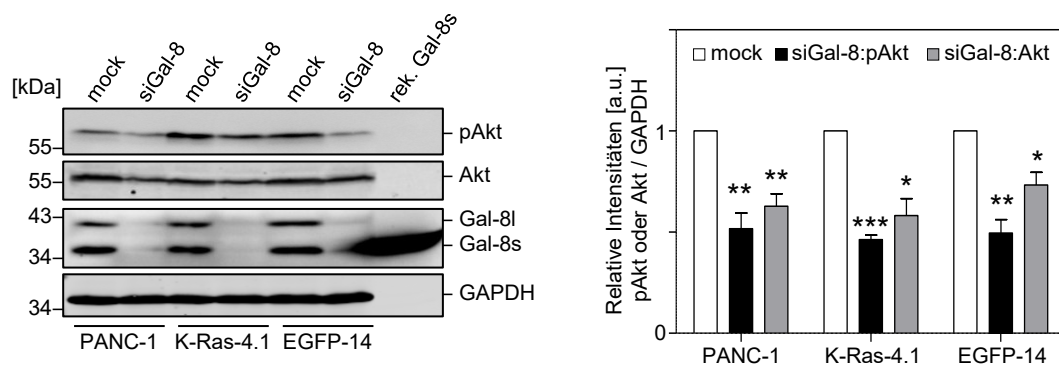
**Abb. 3.17: Depletion von Gal-8 in Kombination mit der Inhibition des Proteasoms führt zu einem Anstieg von EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1-Zellen.** Panc-1/EGFP-K-Ras(G12V) wurden transient mit siGal-8 oder einer Kontroll-siRNA transfiziert. Alle Zellen wurden 72 h nach Transfektion in Kloog-Puffer lysiert, allerdings wurde ein Teil der Zellen zuvor 24 bzw. 48 h mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (5  $\mu$ M) behandelt. 50  $\mu$ g der Proteinlysate wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, geblottet und mittels spezifischer Antikörper die Proteine EGFP-K-Ras(G12V), Gal-8,  $\beta$ -Catenin als Positivkontrolle der Funktionalität des Proteasominhibitors und GAPDH als Beladungskontrolle nachgewiesen. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen Intensität von EGFP-K-Ras(G12V) normalisiert zur mock-Kontrolle ohne MG132-Behandlung aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

### 3.2.3 Die Depletion von Gal-8 inhibiert die Expression und die Phosphorylierung von Akt

Der zweite, sehr gut charakterisierte Signalweg, der unter anderem von Ras aktiviert werden kann, ist der PI3K/Akt-Signalweg. Um den Einfluss einer Depletion von Gal-8 auf die Expression und die Phosphorylierung von Akt zu untersuchen, wurden PANC-1-Zellen, sowie stabil transfizierte PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) und PANC-1/EGFP-14 Zellklone mit siGal-8 siRNA transfiziert.

Abb. 3.18 zeigt den Nachweis auf pAkt, Akt, Gal-8 und GAPDH nach Gal-8-*knockdown* bzw. nach einer Kontroll-siRNA Transfektion. In allen Zelllinien konnte eine Reduktion von Gal-8 nach Gal-8-*knockdown* nachgewiesen werden. Parallel hierzu liegt die Phosphorylierung von Akt, sowie die Menge von Akt reduziert vor. Die relative Intensität der Phosphorylierung von Akt im Verhältnis zu GAPDH sinkt auf  $0.52 \pm 0.08$  (PANC-1),  $0.46 \pm 0.02$  (K-Ras-4.1) und  $0.50 \pm 0.07$  (EGFP-14) nach *knockdown* von Gal-8 verglichen mit der jeweiligen mock-Kontrolle. Gleichzeitig liegt auch der Proteingehalt von Akt nach Gal-8-*knockdown* verglichen mit der mock-Kontrolle reduziert vor (PANC-1:  $0.63 \pm 0.06$ ; K-Ras-4.1:  $0.58 \pm 0.08$ ; EGFP-14:  $0.73 \pm 0.06$ ). Die dargestellten Blots stehen repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente, die auch Basis für die densitometrischen Analysen waren.

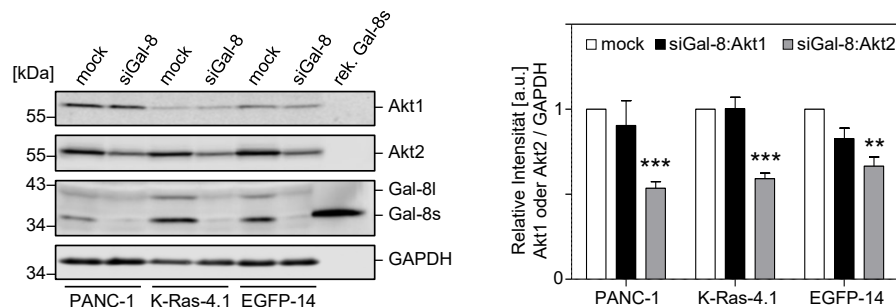
Die Ergebnisse zeigen, dass ein Gal-8-*knockdown* in den analysierten PANC-1-Zelllinien zu einer Reduktion der Expression und damit auch der Phosphorylierung von Akt führt.



**Abb. 3.18: Die Depletion von Gal-8 inhibiert die Expression und die Phosphorylierung von Akt.** PANC-1, sowie die beiden PANC-1-Zellklone K-Ras-4.1 und EGFP-14 wurden transient mit einer Kontroll-siRNA (mock) bzw. mit einer Gal-8 siRNA transfiziert, für 72 h kultiviert, in Kloog-Puffer lysiert und 50 µg der Proteinlysate auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Durchführung des Western Blots wurden spezifische Antikörper zum Nachweis der Phosphorylierung von Akt an Ser473, sowie zum Nachweis von Akt, Gal-8 und GAPDH als Ladungskontrolle verwendet. Die densitometrische Quantifizierung wurde mittels ImageStudio Software realisiert und die Verhältnisse von pAkt zu GAPDH bzw. von Akt zu GAPDH kalkuliert und gegen die mock-Kontrolle der jeweiligen Zelllinie normalisiert. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier unabhängig durchgeführten Experimenten (zweiseitiger Einstichproben t-test; \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ;  $n = 4$ ).

### 3.2.4 Der *knockdown* von Gal-8 inhibiert die Proteinexpression von Akt2

In einer nächsten Versuchsreihe wurden die Proteinexpression von Akt1, Akt2, Gal-8 und GAPDH der drei Zellklone nach einem Gal-8-*knockdown* bzw. nach mock-Transfektion über spezifische Antikörper analysiert. Abbildung 3.19 zeigt die jeweiligen Nachweise für die drei Zelllinien. Nach einem Gal-8-*knockdown* liegt die Expression von Akt2 reduziert vor, während kein Einfluss auf die Expression von Akt1 nachweisbar ist. Dies zeigt auch das Balkendiagramm, welches die Mittelwerte  $\pm$  SEM der densitometrischen Analyse der Expression von Akt1 bzw. Akt2 in Relation zu GAPDH normalisiert auf die Kontrolle der jeweiligen Zelllinie darstellt. Nach einem *knockdown* von Gal-8 ist festzustellen, dass die Proteinexpression von Akt2 in allen drei analysierten Zelllinien reduziert vorliegt (PANC-1:  $0.54 \pm 0.04$ ; K-Ras-4.1:  $0.59 \pm 0.03$ ; EGFP-14:  $0.67 \pm 0.05$ ). Vergleicht man die Proteinexpression der Akt-Isoformen unter den verwendeten Zelllinien, so sind die Akt2-Proteinexpressionen vergleichbar. Die Proteinexpression von Akt1 liegt in den PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V)-4.1-Zellen und in den PANC-1/EGFP-14-Zellen im Vergleich zu den parentalen PANC-1-Zellen reduziert vor. Dabei ist die Expression von Akt1 in den K-Ras-4.1 Zellklonen geringer als in den EGFP-14 Klonen.



**Abb. 3.19: Die Depletion von Gal-8 inhibiert Akt2.** Gal-8 wurde in den drei analysierten Zelllinien über spezifische siRNA ausgeknockt, die Zellen für 72 Stunden kultiviert und in Kloog-Puffer lysiert. 50  $\mu$ g der Proteinlysate wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, geblottet und über Akt-Isoform-spezifische Antikörper die Proteinexpression von Akt1 und Akt2, sowie von Gal-8 und GAPDH detektiert. Die Abbildung zeigt, dass Akt2 in allen drei analysierten Zelllinien nach einem *knockdown* von Gal-8 in der nachweisbaren Proteinmenge deutlich reduziert vorliegt. Dies ist nicht der Fall bei Betrachtung der Proteinexpression von Akt1. Vergleicht man die Proteinexpressionen von Akt1 und Akt2 in den mock-Kontrollen unter den einzelnen getesteten Zelllinien, so zeigt sich, dass Akt1 in den K-Ras-4.1-Zellen stark und in den EGFP-14-Zellen leicht reduziert verglichen zu der Proteinexpression in den PANC-1-Zellen vorliegen. Die Proteinexpression von Akt2 ist in den PANC-1-, K-Ras-4.1- und EGFP-14-Zellen vergleichbar. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung von drei (Akt1) bzw. sechs (Akt2) unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; zweiseitiger Einstichproben t-test; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).



### 3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Gal-8 auf den Ras/Raf/MEK/ERK- und den PI3K-Akt-Signalweg

In Kapitel 3.2 wurde der Einfluss von Gal-8 auf den Ras/Raf/MEK/ERK- und den PI3K-Akt-Signalweg in PANC-1 und auf den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg in Colo699-Zellen analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nach einem *knockdown* von Gal-8 die Phosphorylierung von ERK1/2 zunimmt, während die Phosphorylierung von Akt reduziert vorliegt. Parallel dazu sinkt auch die Expression von Akt. Diese Reduktion konnte unter den analysierten Akt-Isoformen auf die Akt-Isoform Akt2 nach Gal-8-*knockdown* zurückgeführt werden, während die Menge von Akt1 nach Gal-8-*knockdown* unverändert vorlag.

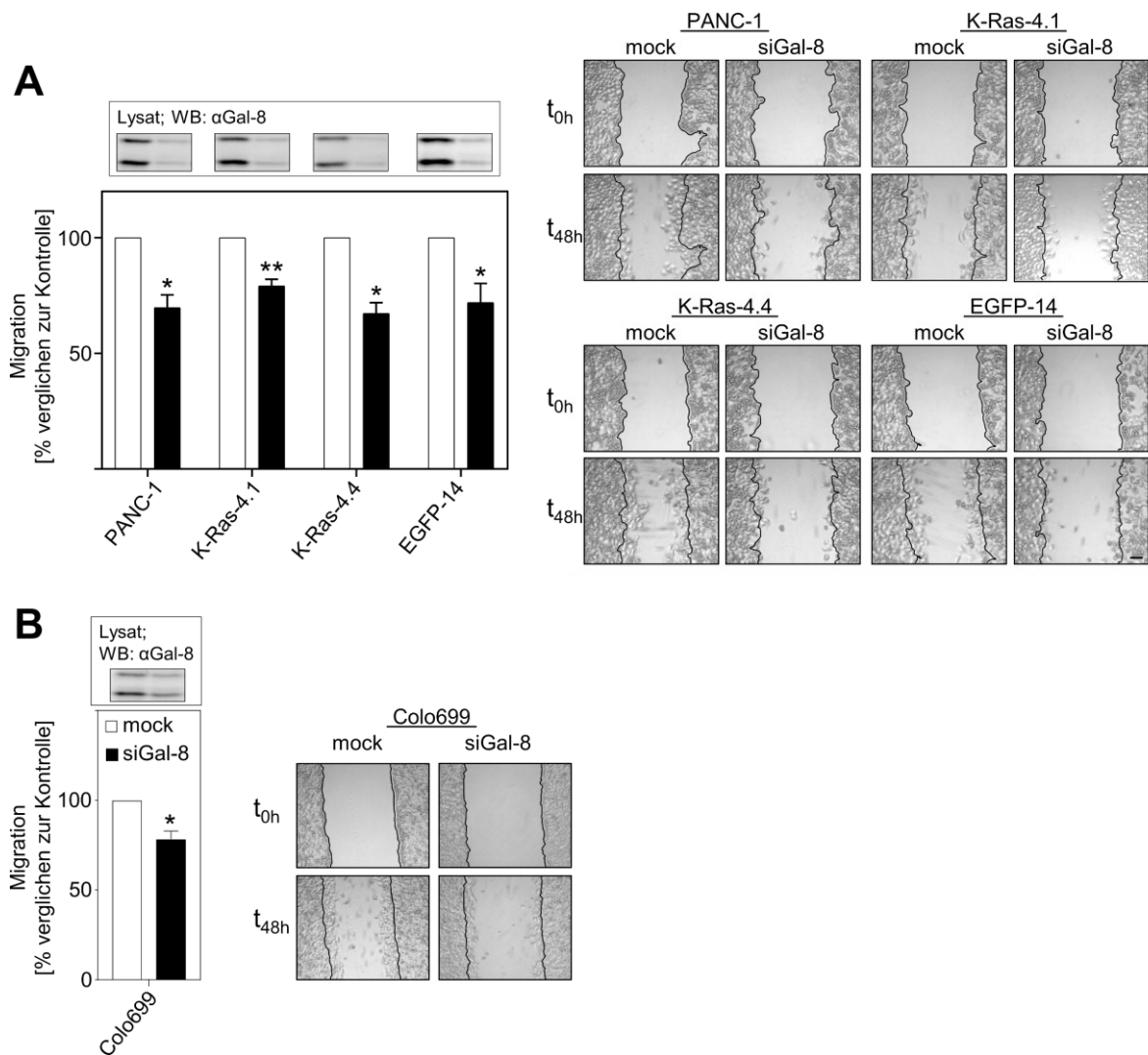
Weiterhin konnte ein Anstieg von EGFP-K-Ras(G12V) nach einem Gal-8-*knockdown* nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Beteiligung von Gal-8 am proteasomalen Abbau von EGFP-K-Ras(G12V) wahrscheinlich ist, da unter Verwendung von MG132 und gleichzeitigem *knockdown* von Gal-8 die Proteinmenge von EGFP-K-Ras(G12V) weiter ansteigt. Die Ergebnisse zeigten, dass der Abbau von EGFP-K-Ras(G12V) unter Beteiligung von Gal-8 vom Proteasom vermittelt wird, da bei Vorliegen von Gal-8 und gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit dem MG132 Proteasom-inhibitor der Gehalt an EGFP-K-Ras(G12V) verglichen zur mock-Kontrolle ohne MG132 gesteigert vorliegt. Dies bedeutet, dass Gal-8 den Abbau über das Proteasom nach dessen Inhibition nicht mehr vermitteln kann und daher der Gehalt an EGFP-K-Ras(G12V) steigt. Auch konnte gezeigt werden, dass die erhöht vorliegende Menge an exprimiertem EGFP-K-Ras(G12V) in der membranären Fraktion nachweisbar ist und dort GTP-gebunden vorliegt.

### 3.3 Einfluss von Gal-8 auf die Migration und Proliferation von PANC-1- und Colo699-Zellen

#### 3.3.1 Effekt der Depletion von Gal-8 auf die Migration von PANC-1 und Colo699-Zellen

PANC-1, Colo699 und die stabil transfizierten Zellklone PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V)-4.1, PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V)-4.4 und PANC-1/EGFP-14 wurden transient mit einer Kontroll-siRNA, sowie mit Gal-8 siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für zwei Stunden mit Mitomycin-C (PANC-1: 10 µg/ml; Colo699: 1 µg/ml) behandelt, um proliferative Effekte durch Inhibition der DNA-Synthese auszuschließen. Im Anschluss wurden drei parallel verlaufende *Scratches* in den konfluenten Zellrasen gezogen. Sechs zufällig gewählte Punkte innerhalb des *Scratches* wurden alle drei Stunden für die nächsten 48 h mittels automatisierter Aufnahmetechnik fotografiert. Die Migration der Zellen wurde berechnet und normalisiert auf die Kontrolle der Zelllinie, die auf einen Wert von 100 % Migration gesetzt wurde. Die Balkendiagramme zeigen somit die Migration der Zellen in Prozent verglichen zur Kontrolle.

Abb. 3.20A zeigt die Auswertung der Migrationsassays für die PANC-1-Zellen bzw. Zellklone. Das Balkendiagramm stellt die Ergebnisse der Migrationsassays als Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Migrationsassays dar (PANC-1:  $69.88 \pm 5.4$ ; K-Ras-4.1:  $79.29 \pm 2.73$ ; K-Ras-4.4:  $67.31 \pm 4.7$ ; EGFP-14:  $72.01 \pm 8.3$ ). Oberhalb dieser Auswertung ist der *knockdown* von Gal-8 eines repräsentativen Assays dargestellt. Auf der rechten Seite sind beispielhaft für die genutzten Zelllinien die *Scratches* zum Zeitpunkt  $t = 0h$  und nach Ende des Migrationsassays zum Zeitpunkt  $t = 48h$  dargestellt. In allen hier abgebildeten Zelllinien ist eine Reduktion der Fähigkeit zur Migration nach einem *knockdown* von Gal-8 festzustellen. In Abb. 3.20B sind die Resultate der Migrationsassays unter Verwendung von Colo699-Zellen dargestellt. Auch hier zeigt die Auswertung eine Reduktion der Fähigkeit zur Migration in Colo699-Zellen nach *knockdown* von Gal-8 (Colo699:  $0.79 \pm 0.04$ ). Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass eine Depletion von Gal-8 die Migration von PANC-1- sowie von Colo699-Zellen inhibiert. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass Gal-8 unter physiologischen Bedingungen die Migration von PANC-1- und Colo699-Zellen positiv beeinflusst.

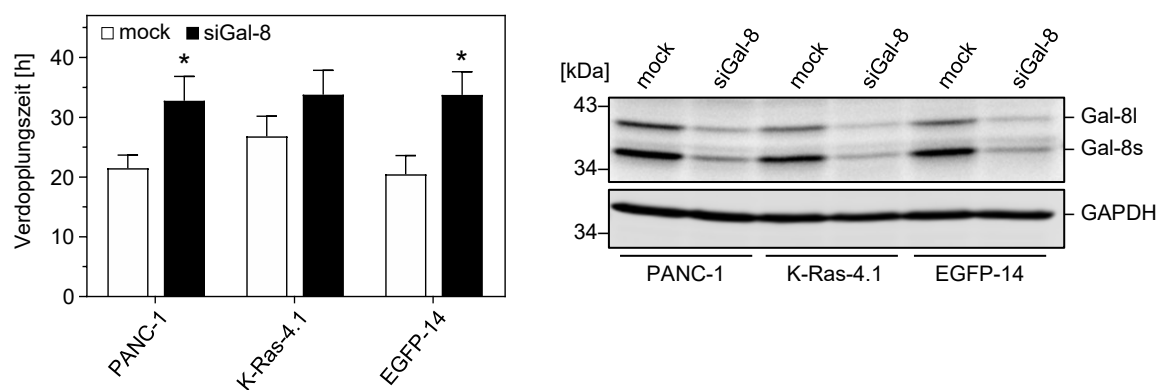


**Abb. 3.20: Effekt der Depletion von Gal-8 auf die Migration von PANC-1 und Colo699-Zellen.** PANC-1- bzw. Colo699-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA bzw. einer Gal-8 siRNA transfiziert und für 24 h kultiviert. Die Zellen wurden für 2 h mit Mitomycin-C (PANC-1: 10  $\mu$ g/ml; Colo699: 1  $\mu$ g/ml) behandelt, um proliferative Effekte im angewandten Assay auszuschließen. Im Anschluss wurden drei parallele *Scratches* in den konfluenten Zellrasen gezogen. Sechs zufällig gewählte Punkte entlang der *Scratches* wurden für die kommenden 48 h alle drei Stunden über automatisierte Aufnahmetechniken abgelichtet. **(A)** Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Auswertung von 3-4 unabhängig voneinander durchgeführten Migrationsassays der abgebildeten PANC-1-Zellen bzw. PANC-1-Zellklone (zweiseitiger Einstichproben t-test; \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ). Oberhalb des Balkendiagramms ist der Nachweis auf Gal-8 nach einem *knockdown* von Gal-8 bzw. nach Transfektion einer Kontroll-siRNA dargestellt. Die Lysate für diesen Nachweisen wurden nach Abschluss des Migrationsassays erstellt. Auf der rechten Seite sind *Scratches* zum Start- (t<sub>0h</sub>) und Endzeitpunkt (t<sub>48h</sub>) des Migrationsassays nach Transfektion mit einer Kontroll-siRNA (mock) und einer Gal-8 siRNA (siGal-8) für alle genutzten Zelllinien abgebildet. **(B)** Das hier dargestellte Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Migrationsassays (zweiseitiger Einstichproben t-test; \*  $p \leq 0.05$ ). Oberhalb ist wie in (A) exemplarisch der Nachweis auf Gal-8 nach *knockdown* von Gal-8 bzw. mock-Transfektion dargestellt. Ebenfalls sind auf der rechten Seite die *Scratches* zum Zeitpunkt t<sub>0h</sub> und t<sub>48h</sub> nach einer Kontroll-siRNA (mock) bzw. Gal-8 siRNA (siGal-8) Transfektion dargestellt.

### 3.3.2 Effekt der Depletion von Gal-8 auf die Proliferation von PANC-1-Zellen

Neben des Gal-8-vermittelten Effektes auf die Migration von PANC-1-Zellen wurde auch der Effekt von Gal-8 auf die Proliferation untersucht. Hierzu wurden PANC-1-

Zellen und stabil transfizierte PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) (K-Ras-4.1) und PANC-1/EGFP (EGFP-14) transient mit Gal-8 siRNA bzw. mit einer Kontroll-siRNA (mock) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in geringen Zellzahlen erneut ausplattiert. Ein Abheften der Zellen an das Zellkulturplastik wurde für die folgenden 12 Stunden ermöglicht. Im Anschluss wurden 5-6 zufällig gewählte Bereiche innerhalb der *wells* für die kommenden 48 Stunden in einem Abstand von 12 Stunden automatisiert fotografiert. Die Zellen wurden gezählt und die Verdopplungszeit wurde kalkuliert. Das Balkendiagramm in Abb. 3.21 zeigt die Auswertung von vier unabhängig voneinander durchgeführten Proliferationsassays als Mittelwerte der Verdopplungszeit  $\pm$  SEM der einzelnen getesteten Zelllinien. Auf der rechten Seite der Abbildung ist exemplarisch ein Western Blot der Lysate der einzelnen getesteten Zelllinien nach einem *knockdown* von Gal-8 und Nachweis über einen spezifischen Gal-8 bzw. GAPDH Antikörper dargestellt.



**Abb. 3.21: Effekt des Gal-8-knockdowns auf die Proliferation von PANC-1-Zellen.** PANC-1-Zellen, sowie die K-Ras-4.1 und EGFP-14 Zellklone wurden transient mit einer Kontroll-siRNA (mock) bzw. einer Gal-8 siRNA transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen dünn ausplattiert, für 12 Stunden die Anheftung an das Zellkulturplastik ermöglicht und danach alle 12 Stunden ein Foto von 5-6 zufällig definierten Bereichen innerhalb des *wells* aufgenommen. Die Verdopplungszeit wurde für vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimente berechnet und als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Auf der rechten Seite ist exemplarisch ein Nachweis auf Gal-8 bzw. GAPDH im Western Blot nach *knockdown* von Gal-8 in den drei getesteten Zelllinien nach durchgeführtem Proliferationsassay dargestellt. Das hier dargestellte Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Auswertung von vier unabhängig voneinander durchgeführten Migrationsassays (zweiseitiger Einstichproben t-test; \*  $p \leq 0.05$ ).

Abb. 3.21 zeigt, dass nach einem *knockdown* von Gal-8 die Verdopplungszeit der einzelnen getesteten PANC-1 Zelllinien ansteigt (PANC-1: von 21.485 h  $\pm$  2.190 h auf 32.775 h  $\pm$  4.053 h; K-Ras-4.1: von 26.825 h  $\pm$  3.336 h auf 33.768 h  $\pm$  4.105 h; EGFP-14: von 20.455 h  $\pm$  3.126 h auf 33.755 h  $\pm$  3.863 h). Dies geschieht signifikant für die PANC-1 und PANC-1/EGFP-14 Zelllinie, sowie tendenziell für die

PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V)-4.1 Zelllinie und zeigt somit einen Effekt eines Gal-8-*knockdowns* auf die Proliferation von PANC-1 Zelllinien.

### 3.4 Lokalisation von Gal-8 in PANC-1-Zellen

In den vorangehenden Kapiteln konnte eine direkte Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras gezeigt werden. Mittels Immunfluoreszenz sollte die Lokalisation von Gal-8 in PANC-1-Zellen analysiert werden. Ko-Färbungen mit einem spezifischen K-Ras-Antikörper und einem spezifischen Gal-8-Antikörper wurden durchgeführt, um die Ko-Lokalisation der in Interaktion stehenden Proteine nachzuweisen. Zum Nachweis der möglichen Lokalisation von Gal-8 an *Early*, *Late* und *Recycling* Endosomen wurden die spezifisch an diesen Endomembranen befindlichen Proteine Rab5, Rab7 und Rab11 über Antikörper nachgewiesen.

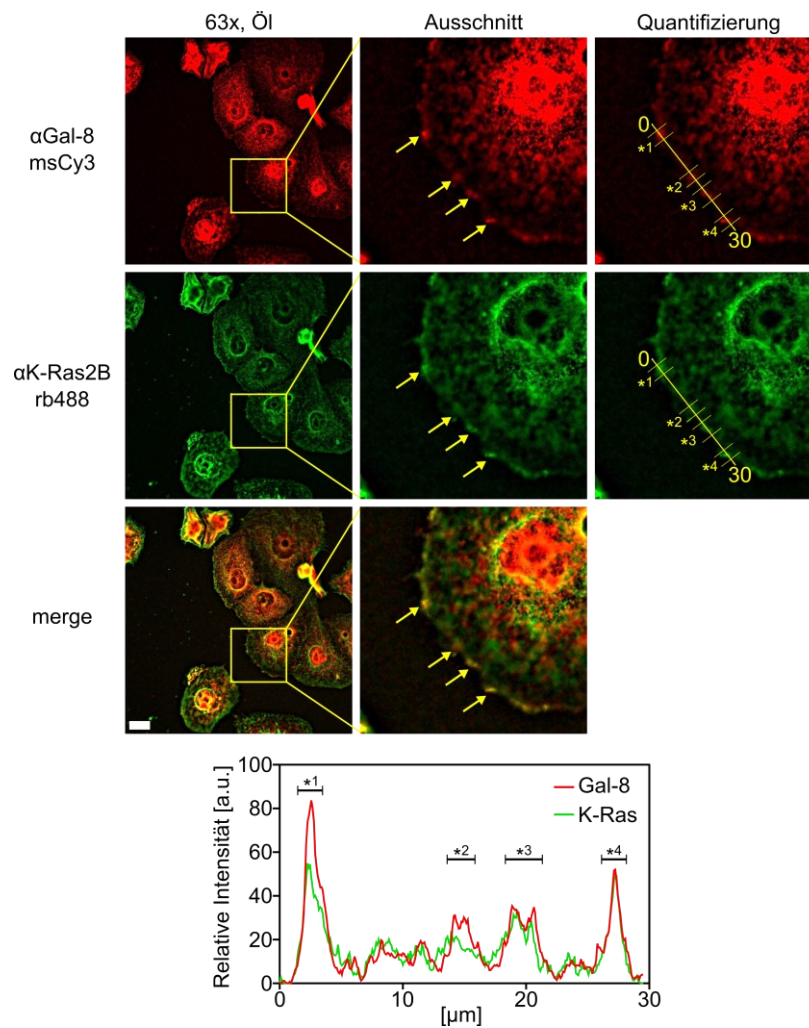
Die Präparate wurden mit Hilfe des Leica DMI8 S Mikroskops unter Verwendung eines 63x/1.4 HC PL APO Öl-Objektiv analysiert. Die Bilder wurden mit der speziellen, neuartigen Software „*THUNDER Imager 3D Live Cell & 3D Cell Culture*“ (Leica, Wetzlar) verarbeitet.

#### 3.4.1 Analyse der Lokalisation von Gal-8 und K-Ras in PANC-1-Zellen

Unter Verwendung der beiden spezifischen Antikörper anti-Gal-8 und anti-K-Ras2B wurde die Lokalisation der beiden Proteine in PANC-1-Zellen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Hierzu wurden sekundäre, fluorochrom-gekoppelte Antikörper genutzt, um Gal-8 mit dem mouse-Cy3 und K-Ras2B mit dem rabbit-Alexa488 Antikörper detektieren zu können. Es konnte eine eindeutige Ko-Lokalisation zwischen Gal-8 und K-Ras in PANC-1-Zellen nachgewiesen werden.

Die linke Spalte der Abb. 3.22 zeigt eine Übersichtsaufnahme der Lokalisation von Gal-8 und K-Ras. Das untere Bild zeigt eine *merge*-Aufnahme beider Bilder. Eine Vergrößerung eines Ausschnittes der Übersichtsaufnahme ist in der mittleren Spalte zu sehen. Auf der rechten Seite wurden die Signalintensitäten der beiden aufgenommenen Kanäle über eine Strecke von 30  $\mu\text{m}$  quantifiziert. Abschnitte, in denen beide Proteine innerhalb der quantifizierten 30  $\mu\text{m}$  Strecke ko-lokalisiert vorliegen sind mit \*<sup>1</sup>, \*<sup>2</sup>, \*<sup>3</sup> und \*<sup>4</sup> markiert und in der mittleren Spalte der Abbildung die Lokalisation dieser Abschnitte mit Pfeilen gekennzeichnet. Unter den Fluoreszenzaufnahmen ist das XY-Liniendiagramm der Quantifizierung beider Kanäle dargestellt. Die erwähnenswerten

Abschnitte \*1, \*2, \*3 und \*4 sind in das Diagramm eingezeichnet. Die Abbildung und die Quantifizierung der aufgenommenen Fluoreszenzbilder zeigen eine Ko-Lokalisation von Gal-8 und K-Ras an der Plasmamembran von PANC-1-Zellen. Vor allem in den analysierten Bildausschnitten \*1, \*3 und \*4 liegt eine klar zu detektierende Ko-Lokalisation vor, die sich in fast absoluter Deckung der beiden Linien des XY-Diagramms äußert.

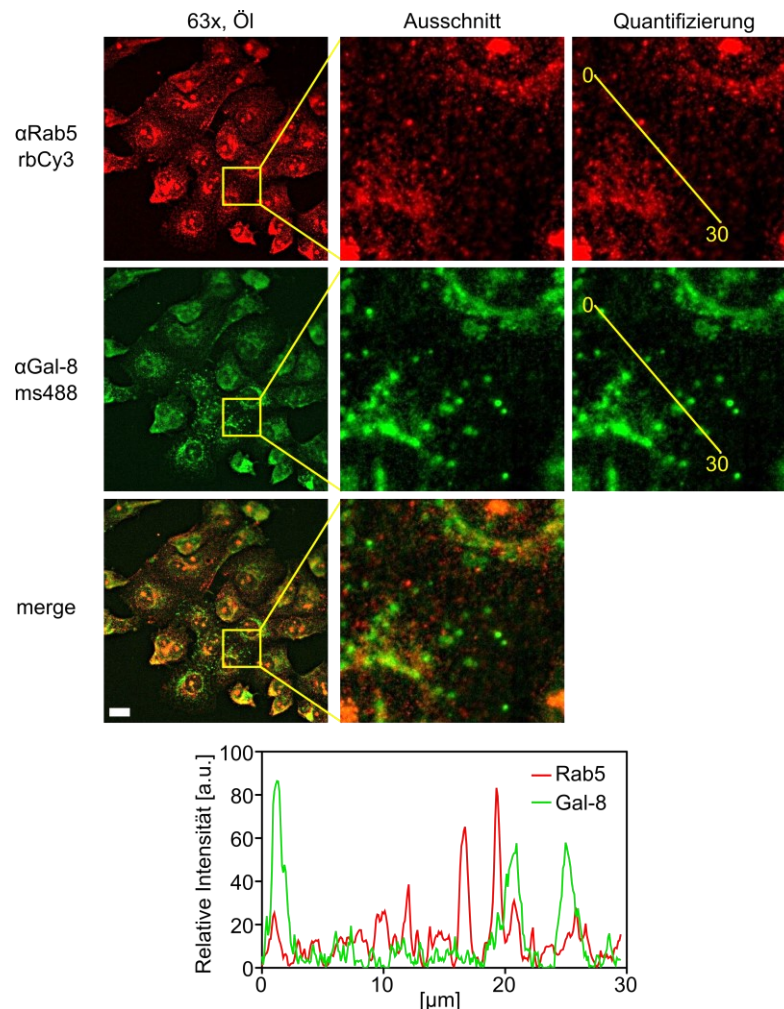


**Abb. 3.22: Analyse der Lokalisation von Gal-8 und K-Ras in PANC-1-Zellen.** PANC-1-Zellen wurden mit Hilfe der primären Antikörper anti-Gal-8 (obere Reihe) bzw. anti-K-Ras2B (mittlere Reihe) gefärbt und über fluorochromgekoppelte sekundäre Antikörper (Gal-8: mouse-Cy3; K-Ras2B: rabbit-Alexa488) nachgewiesen. Die linke Spalte zeigt eine Übersichtsaufnahme, die mittlere einen vergrößerten Ausschnitt der Übersichtsaufnahme. Rechts wurde ein interessanter 30  $\mu\text{m}$  langer Abschnitt mit Hilfe der Fiji Software in der Intensität des Cy3- und GFP-Kanals (Wellenlänge: 568 nm, rot und 525 nm, grün) quantifiziert. Die Evaluation der Quantifizierung ist im XY-Liniendiagramm dargestellt. Abschnitte von besonderem Interesse wurden als \*1, \*2, \*3 und \*4 markiert (unten und rechts in der Quantifizierung). Diese Bildabschnitte sind aus Gründen der Sichtbarkeit in der mittleren Spalte als Pfeile eingezeichnet. Ein Maßstab ist unten links dargestellt ( $\cong 10 \mu\text{m}$ ).

### 3.4.2 Analyse der Lokalisation von Gal-8 und Rab5, Rab7 sowie Rab11 in PANC-1-Zellen

Vergleichbar zum Nachweis von K-Ras und Gal-8 (Kapitel 3.4.1) wurden die Nachweise auf Rab5, Rab7 bzw. Rab11 in Kombination mit Gal-8 durchgeführt. Hierzu wurden in den Immunfluoreszenz-Versuchen die spezifischen Rab Antikörper unter Verwendung eines sekundären, fluorochrom-gekoppelten rabbit-Cy3 nachgewiesen, während Gal-8 über sekundäre, fluorochrom-gekoppelte mouse-Alexa488 Antikörper detektiert wurde. Es konnte eine eindeutige Ko-Lokalisation zwischen Gal-8- und Rab7-Proteinen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte eine Ko-Lokalisation zwischen Gal-8 und Rab11 detektiert werden, die allerdings im Vergleich zur Ko-Lokalisation zwischen Gal-8 und Rab7 schwächer ist. Eine Ko-Lokalisation zwischen Gal-8 und Rab5 konnte nicht gezeigt werden.

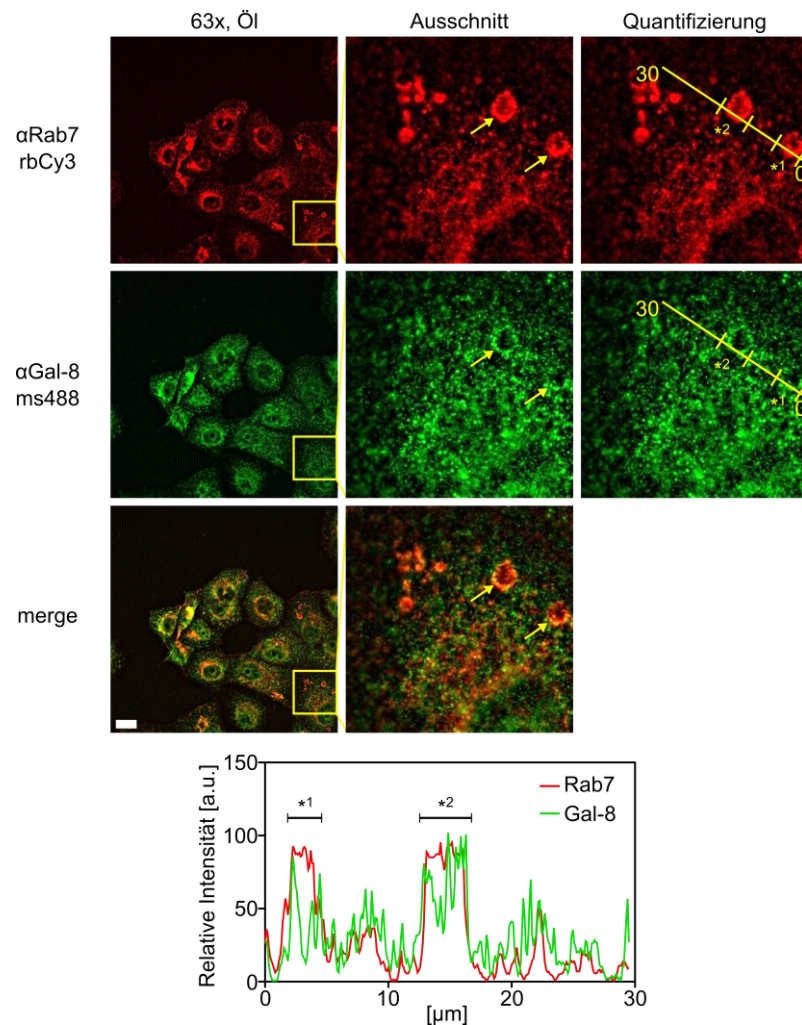
Abb. 3.23, Abb. 3.24 und Abb. 3.25 zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Aufnahmen anhand von jeweils einer repräsentativen Abbildung. In der linken Spalte jeder Abbildung ist die Übersichtsaufnahme, in der Mitte ein Ausschnitt der Übersichtsaufnahme und rechts die Quantifizierung eines interessanten Bildabschnittes dargestellt. Die obere Reihe zeigt den Nachweis auf Rab5, Rab7 bzw. Rab11, die mittlere Reihe auf Gal-8 und die untere Reihe eine *merge*-Aufnahme beider Kanäle. Das XY-Liniendiagramm stellt die Quantifizierung der relativen Intensität des Cy3- und des GFP-Kanals dar (Abb. 3.23, Abb. 3.24 und Abb. 3.25, unten).



**Abb. 3.23: Analyse der Lokalisation von Gal-8 und Rab5 in PANC-1-Zellen.** Die primären Gal-8- und Rab5-Antikörper wurden über sekundäre, fluorochrom-gekoppelte Antikörper nachgewiesen (obere und mittlere Reihe; Gal-8: mouse-Alexa488, grün; Rab5: rabbit-Cy3, rot). Die Aufnahmen beider Kanäle sind in der unteren Reihe übereinandergelegt. Die mittlere Spalte zeigt einen Ausschnitt der Übersichtsaufnahme der Rab5 bzw. Gal-8 Färbung (linke Spalte). In der rechten Spalte wurde eine Quantifizierung der relativen Intensitäten des Cy3- und des GFP-Kanals (Wellenlänge: 568 nm, rot und 525 nm, grün) entlang eines 30 μm langen Abschnitts vorgenommen. Die Resultate der Quantifizierung sind in Form eines XY-Diagrammes unten dargestellt. Ein Maßstab ist unten links dargestellt ( $\cong 10 \mu\text{m}$ ).

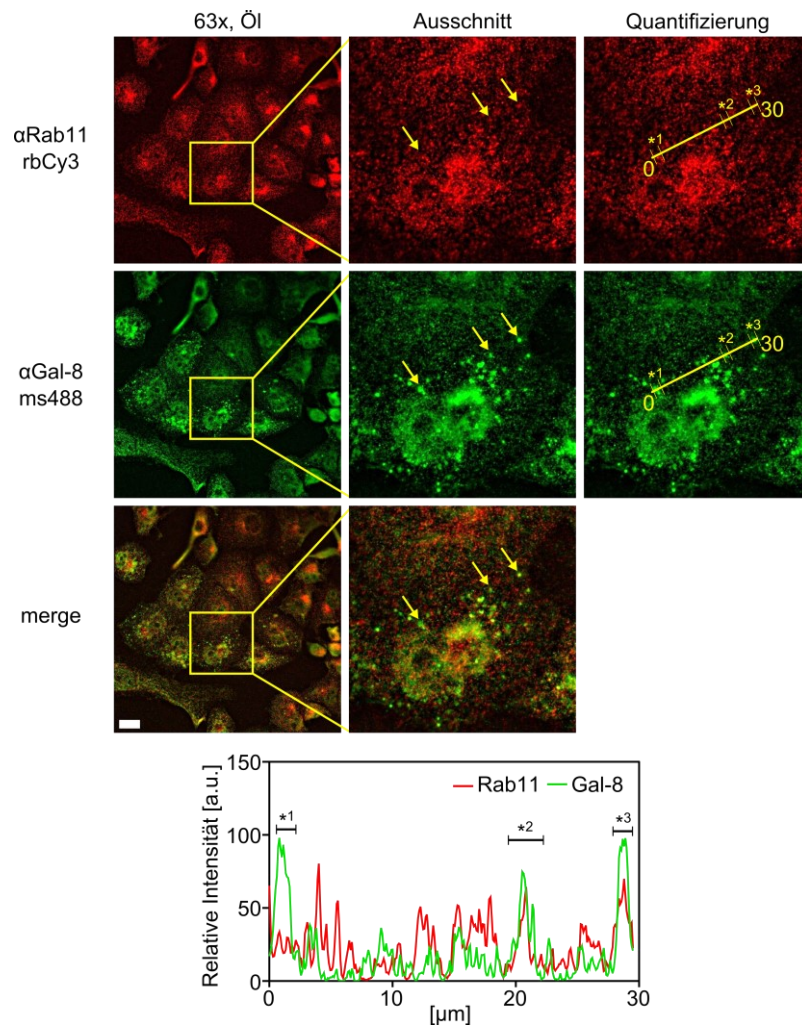
Die Aufnahmen in Abb. 3.23 zeigen, dass Rab5 in kleinen Vesikeln innerhalb des Zytoplasmas vorhanden ist. Auch Gal-8 ist in kleinen vesikelartigen Strukturen nachweisbar. Die Quantifizierung beider Kanäle in einem Bereich, in dem sowohl Rab5, als auch Gal-8 in vesikelartigen Strukturen nachweisbar sind, weist allerdings keine Ko-Lokalisation von Rab5 und Gal-8 nach.





**Abb. 3.24: Analyse der Lokalisation von Gal-8 und Rab7 in PANC-1-Zellen.** Über spezifische Antikörper und fluorchrom-gekoppelte, sekundäre Antikörper wurde Rab7 (obere Reihe) und Gal-8 (mittlere Reihe) detektiert (Gal-8: mouse-Alexa488, grün; Rab7: rabbit-Cy3, rot). In der unteren Reihe ist eine Überlagerung beider Kanäle (*merge*) dargestellt. Die linke Spalte zeigt eine Übersichtsaufnahme, die mittlere einen Ausschnitt der Übersichtsaufnahme. In der rechten Spalte wurde über eine Strecke von 30  $\mu\text{m}$  ein besonders interessanter Bildausschnitt in der Fluoreszenzintensität quantifiziert. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in unten abgebildetem XY-Liniendiagramm dargestellt. Die Bildabschnitte \*1 und \*2 weisen hierbei nahezu identische Kurvenverläufe auf und sind speziell in den Fluoreszenzaufnahmen markiert (\*1; \*2), sowie als korrespondierende Pfeile in der mittleren Spalte dargestellt. Ein Maßstab ist unten links in den Fluoreszenzaufnahmen dargestellt ( $\approx 10 \mu\text{m}$ ).

Rab7 findet sich auf kleinen bis recht großen Vesikelstrukturen innerhalb des Zytoplasmas (Pfeile, Abb. 3.24). Auch Gal-8 lässt sich in diesen Strukturen nachweisen. Dies bestätigt auch die Intensitätsüberlagerungsanalyse der Bereiche \*1 und \*2, die nahezu deckungsgleiche Peaks zeigen.



**Abb. 3.25: Analyse der Lokalisation von Gal-8 und Rab11 in PANC-1-Zellen.** Rab11 (obere Reihe) und Gal-8 (mittlere Reihe) wurden über spezifische primäre und sekundäre Antikörper detektiert (Gal-8: mouse-Alexa488, grün; Rab11: rabbit-Cy3, rot). Eine exemplarische Übersichtsaufnahme (linke Spalte), ein Ausschnitt aus dieser (mittlere Spalte) und eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten beider Kanäle eines 30  $\mu\text{m}$  langen Bildabschnittes (rechte Spalte) sind abgebildet. Unten findet sich das XY-Liniendiagramm der Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten. Ein Maßstab ist unten links dargestellt ( $\cong 10 \mu\text{m}$ ).

Rab11 lässt sich in kleinen Vesikeln im Zytoplasma von PANC-1-Zellen nachweisen (Abb. 3.25). Gal-8 ist ebenfalls in solch kleinen vesikulären Strukturen detektierbar. Die Überlagerung der beiden Kanäle der Quantifizierungsanalyse zeigt Ko-Lokalisierungen von Gal-8 und Rab11 an einigen Strukturen im Zytoplasma (\*<sup>2</sup> und \*<sup>3</sup>), allerdings gibt es im beprobten Bildabschnitt auch viele Unterschiede in der Lokalisation der beiden Proteine (z.B. \*<sup>1</sup>). Die korrespondierenden Bildabschnitte zu \*<sup>1</sup>, \*<sup>2</sup> und \*<sup>3</sup> sind in der mittleren Spalte als Pfeile dargestellt.

Die Immunfluoreszenz-Analysen zeigen, dass Gal-8 mit K-Ras2B, Rab7 und zumindest teilweise mit Rab11 ko-lokalisiert. Eine Ko-Lokalisation mit Rab5 konnte nicht

festgestellt werden. Gal-8 befindet sich in den Analysen an membranären Kompartimenten wie der Plasmamembran und an Endomembranen, die über die Ko-Lokalisation mit den Rab-Proteinen genauer eingegrenzt wurden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Interaktionsstudien von Gal-8 und K-Ras

#### 4.1.1 *In vitro*-Interaktionsstudien von Gal-8 und K-Ras

In vorangehenden Studien unserer Arbeitsgruppe wurde Gal-8 als Interaktionsprotein von K-Ras4B identifiziert [67, 68]. In diesen Studien konnte erstmals eine Interaktion der beiden Gal-8 Isoformen *short* und *long* mit K-Ras(G12V) über Ko-Immunopräzipitationsstudien nachgewiesen werden. Die Isoformen unterscheiden sich in einem zusätzlichen Exon 11, welches für 42 Aminosäuren codiert und innerhalb der *hinge*-Region zwischen der C-terminalen und der N-terminalen CRD von Gal-8 lokalisiert ist.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Plasmide für die ektope Expression von EGFP-markierten K-Ras(G12V)-, H-Ras(G12V)- und N-Ras(G12V)-Proteinen in HEK293-Zellen verwendet, um diese Proteine in *in vitro*-Interaktionsstudien mit endogenem Gal-8 aus PANC-1-Lysaten auf die Fähigkeit zur Interaktion zu analysieren. In diesen Versuchen wurde bestätigt, dass EGFP-K-Ras(G12V) mit endogenem Gal-8 *short* und *long* interagiert. EGFP-markiertes H-Ras(G12V) zeigte ebenfalls eine Interaktion mit Gal-8, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß, während EGFP-N-Ras(G12V) nicht mit Gal-8 interagiert. Ebenfalls konnte eine Interaktion zwischen Gal-1 und EGFP-K-Ras(G12V) sowie eine leichte Interaktion zwischen Gal-3 und EGFP-K-Ras(G12V) experimentell belegt werden (Abb. 3.3). Eine Interaktion zwischen Gal-1 bzw. Gal-3 und den Ras-Isoformen EGFP-H-Ras(G12V) und EGFP-N-Ras(G12V) konnte nicht nachgewiesen werden. Dies steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu Resultaten, die von Galit Elad-Sfadia und Ariella Paz in 2001, 2002 und 2004 publiziert wurden [80–82]. Paz konnte nachweisen, dass Gal-1 mit H-Ras(G12V) und in geringerem Maße mit K-Ras(G12V) interagiert. Die Experimente von Paz wurden allerdings nicht als *in vitro*-Interaktionen oder Ko-Immunopräzipitationen durchgeführt. Stattdessen wurden *Crosslinking Protein Interaction Assays* in Kombination mit einer zweistufigen SDS-Gelelektrophorese angewandt. Hierzu wurden membranäre Fraktionen von transformierten Rat-1(EJ)-Zellen verwendet, die K-Ras, H-Ras und N-Ras sowie Gal-1 in großen Mengen überexprimierten. Zusätzlich dazu wurden die Zellen mit dem sogenannten Lomant's Reagenz behandelt, was ein *cross-linking* aller momentanen in der Zelle vorhandenen Strukturen bewirkt. Daher unterscheiden sich die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden und Puffer von den Bedingungen, die in den Studien von

Paz gewählt wurden, sodass die Unterschiede im identifizierten Interaktionsverhalten der Galektine im Rahmen dieser Arbeit zu den Ergebnissen von Paz erklärbar sind. Im Vergleich zu den Versuchen von Paz beruhen die Versuche von Elad-Sfadia auf Ko-Immünpräzipitationen. Nach Ko-Transfektion von COS-7-Zellen mit Plasmiden, die für Gal-1 bzw. Gal-3 in Kombination mit K-Ras(G12V), H-Ras(G12V) und N-Ras(G12V) kodieren, wurden Ko-IPs durchgeführt und eine Interaktion zwischen Gal-1 und K-Ras(G12V) bzw. H-Ras(G12V) sowie zwischen Gal-3 mit allen drei verwendeten Ras-Isoformen nachgewiesen [81]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Interaktion zwischen Gal-1 bzw. Gal-3 mit K-Ras(G12V), aber nicht mit den weiteren Ras-Isoformen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Arbeit von Elad-Sfadia wurden in den Versuchen der vorliegenden Arbeit die EGFP-Ras-Proteine in HEK293-Zellen exprimiert und dann eine Interaktion mit endogenen Galektinen aus PANC-1-Lysat in einer *in vitro*-Interaktion durchgeführt. Erst bei Durchführung der *in vitro*-Interaktionsassays wurde beiden ekto exprimierten Proteinen ermöglicht zu interagieren. Möglicherweise führten diese gewählten Interaktionsbedingungen zu einem Ausbleiben der Interaktion zwischen Gal-1 bzw. Gal-3 und H-Ras(G12V) bzw. N-Ras(G12V). Das Ausbleiben einer Interaktion zwischen den genannten Proteinen harmonisiert mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die eine Interaktion zwischen EGFP-N-Ras(G12V) bzw. EGFP-H-Ras(G12V) und Gal-8s bzw. Gal-8l nach Überexpression beider Plasmid-Konstrukte in HEK293-Lysaten nachweisen, während die *in vitro*-Interaktionsassays der vorliegenden Arbeit eine solche Interaktion nicht nachweisen kann [70]. Weiterhin könnte der Mengenfaktor des eingesetzten Proteinlysates in den Interaktionsassays eine wichtige Rolle spielen. Statt einer Verwendung von 7 mg eines Ras- und Galektin-haltigen COS-7-Zelllysates, welches von Elad-Sfadia verwendet wurde [80, 81], wurden in den hier vorliegenden Versuchen lediglich 2 mg PANC-1-Lysat als Quelle der endogenen Galektine verwendet sowie 0.3 bis 1 mg HEK293-Lysat, welches die überexprimierten EGFP-Ras-Proteine beinhaltet. Aufgrund dieser Mengenunterschiede und der gewählten Inkubationszeit von zwei Stunden, in denen eine Interaktion stattfinden kann, könnte ein Unterschied in der Nachweisbarkeit der Interaktion zwischen den Ras-Proteinen und den Galektinen in den Versuchen von Elad-Sfadia und den hier durchgeführten Versuchen bestehen. Des Weiteren wurde statt humaner cDNA von Gal-1 in den Versuchen von Elad-Sfadia die Gal-1-cDNA von Ratten genutzt [81]. Zwar ähneln sich die beiden Aminosäuresequenzen sehr stark,

allerdings sind 13 der 135 Aminosäuren unterschiedlich zur jeweiligen anderen Sequenz, was eine Abweichung in der Struktur von 9.6 % ergibt. Ob dies eine Auswirkung auf die Interaktionsfähigkeit mit H-Ras und K-Ras begründet, ist rein spekulativ und müsste durch Strukturanalysen belegt werden.

Trotz der unterschiedlichen Analysemethoden konnte die Interaktion zwischen Gal-1 bzw. Gal-3 mit K-Ras(G12V), welche bereits in der Literatur beschrieben sind, bestätigt werden. Darüber hinaus konnte die Interaktion von Gal-8 mit EGFP-K-Ras(G12V) sowie mit EGFP-H-Ras(G12V) beschrieben und in Bezug auf die früheren Resultate unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden.

#### **4.1.2 Interaktionsstudien von Gal-8 und K-Ras in der Zelle**

Im Rahmen der Versuche zum Nachweis der Interaktion zwischen Ras und Gal-8 konnte erstmals eine Ko-Präzipitation von endogenem Gal-8 an K-Ras nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Aufgrund der Tatsache, dass eine indirekte Interaktion über mögliche Adapterproteine in einer Ko-IP nicht ausgeschlossen werden kann, wurde die Dot-Blot Methode zum Nachweis der direkten Interaktion unter Verwendung von gereinigten His- und HA-markierten Proteinen sowie kommerziellen rekombinanten Proteinen angewandt. Eine direkte Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras konnte sowohl nach Immobilisation von Galektin-8 als auch von K-Ras(G12V) in mengenabhängigen Verhältnissen detektiert werden (Abb. 3.6). Allerdings muss erwähnt werden, dass die His-markierten Proteine über Ni-NTA Agarose nicht absolut sauber aufgereinigt werden konnten (Abb. 3.6). Da die Expression der Proteine in H5-Insektenzellen durchgeführt wurde, ist nicht bekannt, ob eventuelle Adapterproteine innerhalb der Lysate enthalten sind. Stringentes Waschen der Ni-NTA Agarose und wiederholte Aufreinigungsschritte sollten es ermöglichen, die His-markierten Proteine in einer höheren Reinheit zu eluieren. Um die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen bietet sich die Methode der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie unter Verwendung von hochreinen Proteinen an. Als Basis für die Erzeugung von Kristallstrukturen des Komplexes aus Gal-8 und K-Ras4B sind hochreine Proteine ebenfalls notwendig. Zusammenfassend konnte mittels proteinbiochemischer Methoden die direkte Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras4B ermittelt werden.

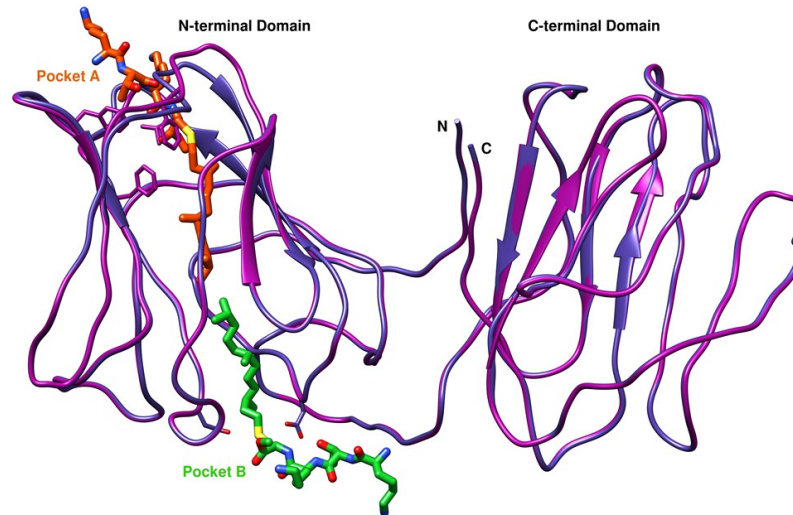
### 4.1.3 Eingrenzung der Interaktionsdomäne in Gal-8

Im Gegensatz zu Gal-1 und Gal-3 besitzt Gal-8 als *tandem-repeat* Galektin zwei CRDs, die über eine *hinge*-Region miteinander verbunden sind. In vorangehenden Analysen konnte die N-CRD von Gal-8 bereits als interagierende Domäne von Gal-8 mit K-Ras identifiziert werden, während die C-CRD nicht mit K-Ras interagiert [90]. Die in dieser Arbeit zusätzlich verwendeten Gal-8-Mutanten N-CRD-*hinge* (NH) und die C-CRD-*hinge* (CH) zeigten in *in vitro*-Interaktionsassays, dass die Interaktion zwischen der N-CRD und EGFP-K-Ras(G12V) nicht zusätzlich durch das Vorhandensein der *hinge*-Region verstärkt wird (Abb. 3.7). Allerdings zeigt sich, dass die C-CRD inklusive der *hinge*-Region eine schwache Interaktion mit EGFP-K-Ras(G12V) aufweist, obwohl für die C-CRD keine Interaktion mit EGFP-K-Ras(G12V) nachgewiesen wurde (Abb. 3.7). Um diese Ergebnisse interpretieren zu können, wurden vergleichende Strukturanalysen der CRDs von Gal-8 von Frau Dr. Karin Fritz-Wolf (Heidelberg, Kooperation mit der Gruppe von Frau Prof. Dr. Katja Becker) durchgeführt und kürzlich veröffentlicht [70]. Diese Strukturanalysen zeigen eine Ähnlichkeit in der räumlichen Anordnung der Aminosäuren innerhalb der CRDs von Gal-8 im Vergleich zu den CRDs von Gal-1 und Gal-3, welche für die Ausbildung einer hydrophoben Tasche von Bedeutung sind. Wie bereits in Kapitel 1.2.1 und 1.2.3 dieser Arbeit beschrieben, zeigen *in silico* Analysen von Rotblat, Ashery und Barnard, dass eine Interaktion zwischen Galektinen und post-translational prenylierten Ras-Proteinen über die Inkorporation der Prenyl-Gruppe in die hydrophobe Tasche der Galektine denkbar ist [27, 67, 79]. In den von Dr. Karin Fritz-Wolf durchgeführten Strukturanalysen zeigte sich, dass innerhalb der N-CRD von Gal-8 zwei mögliche hydrophobe Taschen vorhanden sind, in die eine Prenyl-Gruppe inkorporieren könnte (Abb. 4.1, Pocket A und Pocket B; [70]). Für die Insertion einer Prenyl-Gruppe müssen die hydrophoben Taschen leicht expandieren. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits für die Insertion der Geranylgeranyl-Gruppe von RhoGDIs in Gal-1 identifiziert [27]. Da in *Pocket A* mehr strukturelle Veränderungen in der Konformation bei Insertion der Prenyl-Gruppe stattfinden müssten, als in *Pocket B*, ist eine Insertion in *Pocket B* energetisch sinnvoller. Wir vermuten, dass die Interaktion der N-CRD von Gal-8 mit der Prenyl-Gruppe von Ras über *Pocket B* vermittelt wird. Unterstrichen wird dies durch die Tatsache, dass ein negatives Cluster von sechs Aminosäuren in der Nähe der *Pocket B* vorhanden ist, welches aus den Aminosäuren D25, D28, E133 und D136 innerhalb der N-CRD und aus D156 und E166 innerhalb der *hinge*-Region besteht (Abb. 4.2, rot bzw. hellblau). Abb. 4.2 zeigt die Aminosäuren

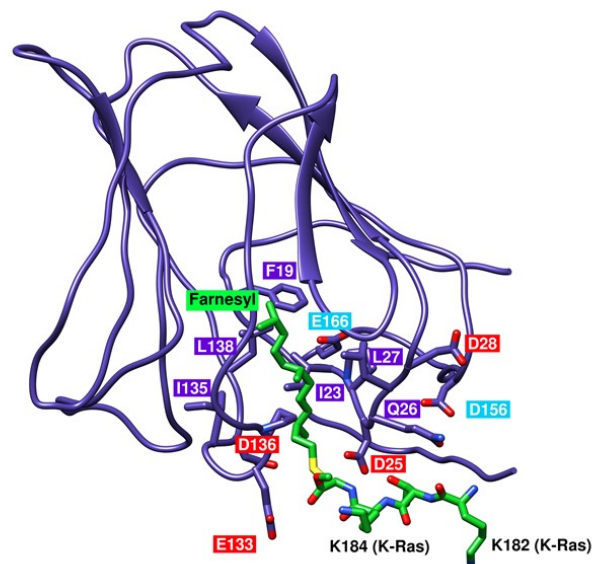
K182 bis K184 sowie das farnesylierte Cystein185 von K-Ras4B (PDB-Struktur: *5tar*). Die aus den sechs Lysinen (K175-K180) bestehende polybasische Domäne liegt upstream zur Aminosäure K182. In der hier vorliegenden Abbildung ist die polybasische Domäne allerdings aufgrund der hypervariablen Beweglichkeit mittels eines theoretischen Modellings in der Lokalisation nicht zu analysieren und somit nicht mit eingezeichnet. Die insgesamt acht positiv-geladenen Lysine von K-Ras4B liegen alle in möglicher räumlicher Nähe zum negativen Cluster der *Pocket* B der N-CRD von Gal-8. Die hydrophobe Tasche innerhalb der N-CRD wird hierbei von den Aminosäuren F19, I23, Q26, L27, I135 und L138 definiert (Abb. 4.2, lila). Ein solches negatives Aminosäure-Cluster ist in der C-CRD von Gal-8 nicht zu identifizieren (persönliche Korrespondenz mit Dr. Karin Fritz-Wolf, [70]), daher ist nicht davon auszugehen, dass über die C-CRD eine Interaktion mit K-Ras vermittelt wird. Dies unterstützt die Hypothese, dass die negativ-geladenen Aminosäuren (D156, E166; Abb. 4.2) innerhalb der *hinge*-Region von Gal-8 bei der Stabilisierung der Interaktion von K-Ras und Gal-8 über *Pocket* B der N-CRD teilhaben. Auf Basis dieser Überlegungen könnte es sich bei der im Rahmen der *in vitro*-Interaktionsstudien nachgewiesene Interaktion zwischen der C-CRD-*hinge* und EGFP-K-Ras(G12V) um eine rein elektrostatische Interaktion der negativ-geladenen Aminosäuren der *hinge*-Region mit den positiv-geladenen Lysinen der hypervariablen Region von Ras handeln. Dies würde auch erklären, warum diese Interaktion im Vergleich zur Interaktion zwischen der N-CRD und K-Ras(G12V) deutlich schwächer ist und eine Interaktion zwischen der C-CRD und K-Ras(G12V) nicht nachgewiesen werden kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche bildeten die Grundlage für das vorgeschlagene Interaktionsmodell. Das Modell ist in zukünftigen Versuchen durch Kristallstrukturen eines K-Ras(G12V)/Gal-8 Komplexes zu bestätigen.





**Abb. 4.1: Darstellung von zwei potentiellen Prenyl-bindenden Taschen innerhalb der N-terminalen Domäne von Gal-8.** Strukturanalysen, in denen die N-terminalen CRD von Gal-8 mit der Struktur von Gal-1 verglichen wurde, zeigen, dass innerhalb der N-terminalen Domäne von Gal-8 zwei potentielle Prenyl-bindende Taschen vorhanden sind, über die eine Inkorporation der Prenyl-Gruppe von K-Ras-Proteinen stattfinden könnte. Diese sind als Pocket A und B gekennzeichnet. Bei Insertion der Prenyl-Gruppe muss die hydrophobe Tasche leicht expandieren. Diese Konformationsänderung ist in Pocket B mit deutlich geringerem energetischem Aufwand verbunden. Daher wird vermutet, dass die Prenyl-Gruppe von K-Ras eher in Pocket B inkorporiert (verwendete Strukturen aus der PDB-Datenbank: Gal-8 - *4han*, dunkel lila; K-Ras4B - *5tar*; Gal-1 - *3t2t* (helles lila); Modelling durchgeführt von: Dr. Karin Fritz-Wolf, Heidelberg; [70]).



**Abb. 4.2: Modell der Farnesyl-Bindungstasche der N-terminalen CRD von Gal-8.** Der hydrophobe Charakter der putativen Farnesyl-Bindungstasche wird durch die Aminosäuren F19, I23, Q26, L27, I135 und L138 (lila) innerhalb der hier abgebildeten N-terminalen *Pocket B* definiert. Die Farnesyl-Modifikation ist an dem terminalen Cystein von K-Ras4B über eine Thioether-Bindung angebracht (gelb). Zwei der acht positiv-geladenen Lysine (K182 und K184) sind dargestellt und befinden sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zum negativen Cluster der *Pocket B*, welche durch die negativ-geladenen Aminosäuren D25, D28, E133 und D136 (rot) innerhalb der N-CRD und den zwei Aminosäuren D156 und E166 (hellblau) innerhalb der *hinge*-Region gebildet wird (abgebildete PDB-Strukturen: Gal-8 – *4han*; K-Ras4B, modifiziert – *5tar*; Modelling durchgeführt von: Dr. Karin Fritz-Wolf, Heidelberg; [70]).

#### 4.1.4 Eingrenzung der Interaktionsdomäne von K-Ras

Mutanten von K-Ras wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und verwendet, deren terminales Cystein zu einem Serin mutiert vorlag (C185S), sodass eine posttranslationale Modifikation von Ras nicht mehr stattfand. Gal-8 sowie die HA-markierte N-CRD von Gal-8 interagierten beide ausschließlich mit posttranslational modifiziertem K-Ras und nicht mit der farnesyl-defizienten Ras-Mutante (Abb. 3.9). Dies zeigt, dass die hydrophobe Farnesyl-Gruppe von K-Ras in Gal-8 entscheidend für die Interaktion ist. Ein möglicher Interaktionsmechanismus stellt die oben beschriebene Inkorporation der Farnesyl-Gruppe von K-Ras in die hydrophobe Farnesyl-bindende Tasche von Gal-8 dar, welche aus den Aminosäuren F19, I23, Q26, L27, I135 und L138 besteht. Ähnliche Aminosäuren bilden auch die hydrophoben Taschen in Gal-1, Gal-3 und in RhoGDI aus [27, 79, 101]. Eine solche Farnesyl-Gruppen-abhängige Interaktion von Galektinen mit Ras-Proteinen konnte bereits für Gal-1 und Gal-3 gezeigt werden. Weiterhin ist die Farnesylierung von Ras essentiell für die biologische Aktivität und die korrekte Bindung von Ras an die Plasmamembran und kann durch Zugabe eines Farnesyltransferase-Inhibitors verhindert werden [80, 82, 102, 103]. Ähnlich wie PDE6 $\delta$  könnten auch Galektine eine entscheidende Rolle beim Transport von Ras-Proteinen zur Plasmamembran haben. PDE6 $\delta$  ist neben VPS35, PRA1 und SmgGDS das einzige sehr gut charakterisierte Protein, welches K-Ras über die Farnesyl-Gruppe bindet und somit die Diffusion durch das Zytoplasma aufgrund der Abschirmung der Hydrophobizität ermöglicht [28–30]. Verschiedene Experimente haben gezeigt, dass bei Anstieg der intrazellulären zytosolischen Konzentration von Gal-1 und Gal-3 auch ein verstärktes *nanoclustering* von H-Ras und K-Ras identifiziert wurde [58, 60]. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass neben PDE6 $\delta$  auch die Interaktion von Galektinen mit Ras-Proteinen über die Farnesylierung von Ras entscheidend für einen korrekten Transport und somit letztlich für ein korrektes Ras-*Signaling* ist. Liegt Gal-3 beispielsweise über einen *knockdown* reduziert in der Zelle vor, konnte auch eine Reduktion von K-Ras.GTP-Nanoclustern nachgewiesen werden [59, 60].

Unabhängig davon, ob Ras im GTP- oder im GDP-gebundenen Zustand vorliegt, liegt eine Interaktion zwischen PDE6 $\delta$  und der Farnesyl-Gruppe von Ras-Proteinen vor. Ein gleiches Resultat konnte in den hier durchgeführten Experimenten für die Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras belegt werden. Die konstitutiv-aktive K-Ras(G12V)-Mutante liegt im GTP-gebundenen Zustand vor, während die dominant-negative K-Ras(S17N)-Mutante GDP gebunden hat. Diese Guaninnukleotid-Bindung konnte über einen Ras-

Aktivitätsassay bestätigt werden. Eine Interaktion von Gal-8 findet sowohl mit der GTP- als auch mit der GDP-gebundenen Ras-Mutante statt. Ebenso interagiert Gal-8 mit K-Ras in der Wildtyp-Konformation, in der K-Ras entweder GTP- oder GDP-gebunden vorliegt (Abb. 3.8). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Gal-8 ebenfalls eine ähnliche Transportprotein-Funktion wie PDE6 $\delta$  einnehmen könnte. Eine Depletion von PDE6 $\delta$  führt allerdings zu einer Reduktion von K-Ras an der Plasmamembran [104], während eine Depletion von Gal-8 zu einem Anstieg von EGFP-K-Ras(G12V) an der Plasmamembran führt (Abb. 3.16). Dies zeigt, dass der Transportmechanismus von K-Ras zur Plasmamembran über PDE6 $\delta$  gesteuert sein könnte, während Gal-8 eine gegenteilige Funktion einnimmt und K-Ras von der Plasmamembran in das Zellplasma rekrutiert.

In der Literatur finden sich Studien, die näher auf die Präferenz der Interaktion von Galektinen mit GTP- oder GDP-gebundenen Ras-Proteinen eingehen. Während Gal-3 präferentiell mit GTP-gebundenem K-Ras interagiert, besteht für Gal-1 eine Präferenz zur Interaktion mit H-Ras.GTP. Innerhalb von Ras Nanoclustern konnte für Gal-1 bzw. Gal-3 keine weitere Interaktion mit einem anderen Ras-Protein identifiziert werden als den zuvor genannten Varianten [54, 57, 105–109]. Dies zeigt, dass Gal-1 bzw. Gal-3 hoch spezifisch innerhalb von Nanoclustern mit definierten Ras-Isoformen interagieren [110]. Somit konnte anhand der erzielten Ergebnisse dieser Arbeit Gal-8 als erstes Galektin identifiziert werden, welches sowohl mit GTP- als auch mit GDP-gebundenem K-Ras zu interagieren. Dies resultiert in der Fragestellung, ob Gal-8 als erstes Galektin an der Bildung von Ras-Nanoclustern unabhängig vom gebundenen Nukleotid beteiligt ist oder ob Gal-8 möglicherweise keine Rolle bei der Ras-Nanocluster Bildung spielt, da die Spezifität in der Bindung mit Ras Proteinen fehlt. Anhand der im Rahmen dieser Arbeit vorliegenden Daten kann eine Beteiligung an der Ras-Nanocluster Bildung nicht ausgeschlossen werden, da Ko-Lokalisationsstudien zeigen, dass Gal-8 und EGFP-K-Ras(G12V) an der Plasmamembran ko-lokalisiert vorliegen (Abb. 3.22).

In weiterführenden Versuchen wurde der Einfluss der Lysine innerhalb der HVR von K-Ras auf die Interaktion mit Gal-8 analysiert. Hierzu wurden die Lysine der HVR nach und nach gegen korrespondierende Aminosäuren der HVR von H- bzw. N-Ras ausgetauscht, die allesamt keine Lysine darstellen (Abb. 3.2). Parallel hierzu wurden Lysine in die entsprechenden Positionen innerhalb der HVR von H- und N-Ras eingebracht.

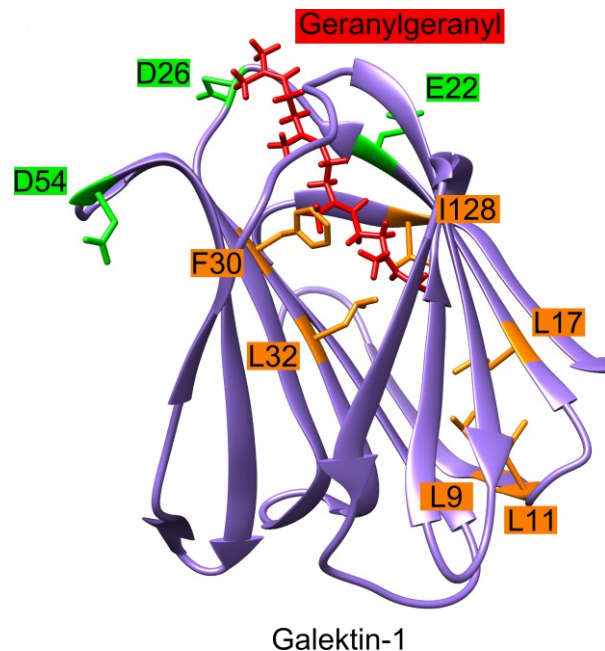
Unter Verwendung dieser K-, H- oder N-Ras-Mutanten wurden zunächst *in vitro*-Interaktionsassays durchgeführt, bei denen ausschließlich die Farnesyldomänen Mutanten eingesetzt wurden (Abb. 3.2B). Diese beinhalten Mutationen an den Lysin 182 und 184 im K-Ras sowie an den Positionen 183 und 185 im H- und N-Ras, sodass an den genannten Positionen entweder zwei, eine oder keine der dort vorhandenen Aminosäuren ein Lysin ist (Abb. 3.2B). Die Mutation K182S,K184P in der Farnesyldomäne von K-Ras führte dazu, dass der Interaktionsindex von Gal-8 *short* in Interaktion mit K-Ras(G12V,K182S,K184P) auf  $0.56 \pm 0.16$  sank verglichen zur Interaktion mit K-Ras(G12V) (Abb. 3.10A). Bei einem Lysinaustausch an Position 182 bzw. 184 ist allerdings kein Effekt auf die Interaktion zwischen Gal-8 und der jeweiligen K-Ras-Mutante identifizierbar. Auch führte der Austausch des einzigen Lysins in der Farnesyldomäne von H-Ras nicht zu einer Reduktion des Interaktionsindex. Allerdings erbrachte die Insertion eines Lysins anstelle des Serins an Position 183 im H-Ras eine verstärkte Interaktion mit Gal-8 (Interaktionsindex:  $1.8 \pm 0.06$ ; Abb. 3.10B). H-Ras ist die einzige Ras-Isoform, die neben der Farnesylierung am terminalen Cystein noch an zwei weiteren Cysteinen palmitoyliert wird. Die zusätzliche Palmitoylierung an Cys181 ist essentiell für eine korrekte Sortierung vom Golgi zur Plasmamembran. Die zweite Palmitoylierung an Cys184 spielt hingegen eine wichtige Rolle bei der lateralen Segregation innerhalb der Plasmamembran [24]. Möglicherweise könnten diese *second signals* zusätzlich auf die Interaktion von H-Ras mit Gal-8 einwirken. Daher könnte ein Wegfall des letzten positiv-geladenen Lysins in der H-Ras(G12V,K185P)-Mutante keinen gravierenden Einfluss auf die Interaktion mit Gal-8 haben. Auch ist denkbar, dass H-Ras nicht mit *Pocket B* sondern mit *Pocket A* von Gal-8 interagieren könnte.

Interessanterweise konnte bei Insertion von zwei Lysin an die entsprechenden Positionen im C-Terminus von N-Ras eine Interaktion mit Gal-8 *short* nachgewiesen werden. Aufgrund der allgemein niedrigeren Expression von Gal-8 *long* in PANC-1-Lysaten [68, 77], konnte die Interaktion zwischen N-Ras(G12V,G183K,P185K) und Gal-8 *long* allerdings nicht nachgewiesen werden.

Neben der Interaktionsfähigkeit von K-Ras mit Gal-8 wurden auch die Galektine Gal-1 und Gal-3 in Interaktion mit den Farnesyldomänen-Mutanten von K-Ras charakterisiert. Aufgrund der allgemein sehr schwachen Nachweisbarkeit von Gal-3 in den

durchgeführten Experimenten konnte in dem gewählten Versuchsssetup (Kap. 3.1.9.2) keine Aussage über eine Interaktion mit den K-Ras-Mutanten getroffen werden.

Für Gal-1 in Interaktion mit den vier K-Ras-Mutanten konnte gezeigt werden, dass nach Austausch von Lysin 184 zu Prolin [K-Ras(G12V,K184P)] der Interaktionsindex mit Gal-1 bei nur noch  $0.47 \pm 0.05$  verglichen zur Interaktion mit K-Ras(G12V) liegt. Nach Entfernung beider Lysine ist kaum noch eine Interaktion zwischen Gal-1 und der K-Ras(G12V,K182S,K184P)-Mutante nachweisbar (Abb. 3.11). Die hydrophobe Tasche von Gal-1, die von Rotblat und seinen Kollegen identifiziert wurde und von den Aminosäuren L9, L11, L17, L32, F30 und I128 ausgebildet wird, weist ebenfalls negativ-geladene Aminosäuren an der Öffnung der Tasche auf (Abb. 4.3, eigene durchgeführte Strukturanalysen basierend auf [27]).



**Abb. 4.3: Die hydrophobe Bindungstasche von Gal-1.** Auf Basis der PDB-Struktur 3t2t (Gal-1) und den Ergebnissen von Rotblat und seinen Kollegen wurden die Aminosäuren L9, L11, L17, L32, F30 und I128 eingezeichnet (orange). Diese definieren die hydrophobe Tasche von Gal-1. Das Modeling von Rotblat ging hypothetisch davon aus, dass die Geranylgeranyl-Gruppe von Cdc42 (rot), welche für die Strukturanalysen verwendet wurde, von links oben in die hydrophobe Tasche von Gal-1 inkorporiert. Eigene Strukturanalysen zeigten, dass am Ausgang der hydrophoben Tasche drei negativ-geladene Aminosäuren (grün) – ähnlich wie bei Gal-8 – vorhanden sind, die die Interaktion mit K-Ras über die positiv-geladene HVR vermitteln könnten. Die dargestellten Analysen wurden mit UCSF Chimera 1.13.1rc im Rahmen dieser Arbeit erstellt [27, 74, 111, 112].

Die Ergebnisse der Interaktion zwischen Gal-8 und den Farnesyldomänen-Mutanten von K-Ras bestätigen, dass positiv-geladene Lysine innerhalb der farnesylierten Domäne von Ras (Abb. 3.2) von Bedeutung für die Interaktion mit Gal-8 sind. Dies könnte durch das negative Aminosäurecluster in unmittelbarer Nähe der hydrophoben *Pocket*

B von Gal-8 erklärt werden, sodass es hier zu einer elektrostatischen Interaktion zwischen den beiden Aminosäuredomänen kommt. Es zeigt sich, dass bei Verlust der beiden positiv-geladenen Lysine 182 und 184 innerhalb der Farnesyldomäne von K-Ras die Interaktion mit Gal-8 drastisch reduziert vorliegt. Bei Vorhandensein beider Lysine in den Farnesyldomänen von H- und N-Ras wird die Interaktion mit Gal-8 verstärkt bzw. erstmalig ermöglicht.

Eine weitere, aus sechs Lysine bestehende Domäne innerhalb der Aminosäuresequenz von K-Ras befindet sich an Position 175-180. Aus diesen Gründen ist es naheliegend, dass über diese die elektrostatische Interaktion noch weiter stabilisiert wird. Daher wurde in einem weiteren Versuch die polybasische Domäne von K-Ras gegen korrespondierende Aminosäuredomänen von H-Ras (PL-H) und N-Ras (PL-N) ersetzt. Gepaart mit der zusätzlichen Mutation der Lysine 182 und 184 bewirkte dies, dass Gal-8 nicht mehr mit K-Ras interagieren kann (Abb. 3.12). Liegen allerdings die zwei Lysine 182 und 184 bei Mutation der polybasischen Domäne weiterhin vor, so ist eine schwache Interaktion zwischen Gal-8 und den entsprechenden Mutanten möglich (Abb. 3.12). Dies zeigt, dass nach Mutation aller acht Lysine innerhalb der hypervariablen Region von K-Ras eine Interaktion mit Gal-8 vollständig inhibiert vorliegt. Kombiniert mit den Ergebnissen, die in Abschnitt 3.1.8 dargestellt sind und die Bedeutung der posttranslationalen Prenylierung von K-Ras für die Interaktion mit Gal-8 zeigen, ermöglicht somit die Farnesylierung von Ras in Kombination mit der Anordnung der Lysine in der HVR eine Interaktion von Gal-8 und K-Ras.

#### **4.1.5 *In vitro* Interaktionsstudien von Gal-8 und weiteren GTPasen**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Rac1, Rac1b und Cdc42 mit Gal-8 in den durchgeführten *in vitro*-Interaktionsassays miteinander interagieren können. RhoA und RhoC können hingegen nicht mit Gal-8 interagieren (Abb. 3.13A). Vergleichende Aminosäuresequenzanalysen ergaben, dass alle in unseren Versuchen verwendeten GTPasen, welche mit Gal-8 interagieren, zwei Lysine an denselben Positionen relativ zum prenylierten Cystein verglichen mit K-Ras4B besitzen. RhoA verfügt lediglich an der Position drei Aminosäuren *upstream* des prenylierten Cysteins über ein Lysin, während RhoC kein Lysin an den korrespondierenden Positionen besitzt (Abb. 3.13B). Allerdings besitzen RhoC und auch RhoA mehrere Arginine, die ebenfalls positiv-geladene Aminosäuren sind. Deshalb bleibt hier die Frage offen, warum RhoA bzw. RhoC nicht

mit Gal-8 interagiert, obwohl positiv-geladene Aminosäuren innerhalb der Aminosäurestruktur der GTPasen vorhanden sind. Möglicherweise ist dies auf die Unterschiede in der Struktur der positiv-geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin zurückzuführen. Ein Lysin direkt neben dem prenylierten Cystein – wie in K-Ras – ist in der Aminosäuresequenz von RhoA und RhoC nicht vorhanden, auch ist keine weitere positive Ladung in Form eines Arginins direkt angrenzend zu diesem Cystein identifizierbar. Möglicherweise ist das Lysin an der Position direkt *upstream* zum prenylierten Cystein von entscheidender Bedeutung für die Interaktion mit Gal-8, unabhängig von weiteren positiven Aminosäuren. Letztere können eine Interaktion dann nur noch verstärken. Dafür spricht, dass H-Ras lediglich das Lysin in unmittelbarer Nähe zum prenylierten Cystein aufweist. Eine Interaktion mit Gal-8 konnte in diesem Fall auch nachgewiesen werden. Dagegen spricht, dass die K-Ras(G12V,K184P)-Mutante weiterhin mit Gal-8 interagieren kann, obwohl ihr das Lysin direkt *upstream* zum Cystein fehlt.

Die identifizierte Interaktion zwischen Gal-8 und Rac1, Rac1b bzw. Cdc42 resultiert in der Fragestellung, welche biologische Funktion die Interaktion zwischen Gal-8 und den identifizierten GTPasen besitzt. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass auch Rac-Proteine in Nanoclustern vorhanden sein können [113, 114]. Somit herrscht innerhalb der Plasmamembran eine strikte Grundordnung der GTPasen, die durch Proteine, wie zum Beispiele Galektine, stark beeinflusst werden [56–58, 60, 110]. Möglicherweise können im Zusammenhang mit den neu identifizierten Rac-Nanoclustern auch Galektine eine Rolle spielen und somit auch die im Rahmen dieser Arbeit dargestellte Interaktion zwischen Rac1 und Gal-8.

## **4.2 Bedeutung von Gal-8 im Ras/Raf/MEK/ERK- und im PI3K/Akt-Signalweg**

Die Bedeutung der Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras(G12V) auf physiologische, K-Ras-vermittelte Signaltransduktionskaskaden, wurden im Rahmen von siRNA vermittelten *knockdown* Experimenten von Gal-8 untersucht, um den Einfluss auf wichtige *downstream*-Faktoren der Ras/Raf/MEK/ERK- und PI3K/Akt Signalkaskaden zu analysieren. Es wurden humane Adenokarzinomzellen des exokrinen Pankreas (PANC-1) sowie stabil mit den Expressionsplasmiden für die Proteine EGFP-K-Ras(G12V) und EGFP transfizierte PANC-1-Zellen verwendet [77]. Weiterhin wurde als zweite Zelllinie eine epitheloide Adenokarzinomzelllinie der Lunge (Colo699) verwendet [94].

#### 4.2.1 Die Depletion von Gal-8 führt zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 bei gleichzeitiger Zunahme der EGFP-K-Ras(G12V)-Proteinmenge

In allen verwendeten Zelllinien konnte die Expression von Gal-8 nach einem siRNA-vermittelten *knockdown* um 60 – 90 % reduziert werden (Abb. 3.14A und C). Nach einem 72-stündigen *knockdown* von Gal-8 konnte in PANC-1-Zellen sowie in den PANC-1-Zellklonen und auch in den Colo699-Zellen ein Anstieg in der Phosphorylierung von ERK1/2 auf etwa das Doppelte detektiert werden (Abb. 3.14B und C). Interessanterweise ist die Proteinmenge von EGFP-K-Ras(G12V) in den PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V)-4.1-Klonen nach einem *knockdown* von Gal-8 deutlich angestiegen (Abb. 3.15). Dies ist übereinstimmend mit dem Anstieg in der Phosphorylierung von ERK1/2. Da EGFP-K-Ras(G12V) konstitutiv aktiv (Abb. 3.16) und zusätzlich an der Plasmamembran gebunden vorliegt, könnte es von dort aus die Raf/MEK/ERK-Signaltransduktion stimulieren [6]. Auch konnte in subzellulären Lokalisationsversuchen eine erhöhte Menge EGFP-K-Ras(G12V) in der membranären Fraktion von K-Ras-4.1-Zellen nach Depletion von Gal-8 nachgewiesen werden (Abb. 3.16A). Die Versuche von Dreissigacker haben gezeigt, dass eine kurzzeitige Änderung der Expression von Ras-Proteinen, beispielsweise nach transienter Expression, zu einem Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 führt, während eine stabil überexprimierende Zelle verglichen mit den parentalen PANC-1-Zellen keine Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs aufweist [6]. Daher zeigt sich in Abb. 3.14 kein großer Unterschied in der Phosphorylierung von ERK1/2 zwischen den parentalen PANC-1-Zellen und den stabil EGFP-K-Ras(G12V) überexprimierenden PANC-1-Zellen. Nach einem *knockdown* von Gal-8 liegt eine Steigerung der Menge von EGFP-K-Ras(G12V) in den Zellen vor, sodass es hierdurch zu einer Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges kommen könnte.

Versuche, endogenes K-Ras mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen und einen Anstieg auf den Gehalt von endogenem K-Ras nach Depletion von Gal-8 darzustellen, schlugen aufgrund der äußerst geringen Nachweisbarkeit im Western-Blot fehl (nicht abgebildet). Ebenso konnte nach Präparation der partikulären Fraktion von PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V)-4.1- und PANC-1/EGFP-14-Zellen nur in einem von drei durchgeführten Versuchen ein Anstieg von endogenem K-Ras nach *knockdown* von Gal-8 verzeichnet werden (Abb. 8.8). In den beiden anderen Versuchen blieb die Menge an nachweisbarem endogenem K-Ras unverändert (nicht abgebildet).



#### 4.2.2 Potentielle Beteiligung von Gal-8 an der Proteasom-vermittelten Degradation von K-Ras

MG132 ist ein potenter, Zell-permeabler Proteasominhibitor, der die Degradation von ubiquitinierten Proteinen durch die proteolytische Aktivität des 26S Komplex des Proteasoms inhibiert ohne dabei die ATPase oder Isopeptidase Aktivität des Proteasoms zu beeinflussen [115, 116]. Die Inhibition des Proteasoms unter Verwendung des MG132-Inhibitors führte dazu, dass der Proteingehalt von EGFP-K-Ras(G12V) auf ein Niveau anstieg, welches vergleichbar mit dem Proteingehalt nach Gal-8 *knockdown* ist (Abb. 3.17). Ein ähnlicher Effekt ist nach 48-stündiger Behandlung mit MG132 identifizierbar: die Proteinmenge an EGFP-K-Ras(G12V) ist stark angestiegen.

Der exakte Mechanismus der Degradation von Ras-Proteinen ist aktuell nicht bekannt, allerdings gibt es mehrere Hinweise darauf, wie die Degradation von Ras vermittelt werden könnte [117–119]. Der sogenannte *destruction complex*, bestehend aus den Proteinen Casein Kinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ), Glykogensynthasekinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), APC und Axin [117] kann über GSK3 $\beta$  Ras an den hoch konservierten Phosphorylierungsstellen Thr144 und Thr148 phosphorylieren [118, 120, 121]. Die Phosphorylierung führt zur Rekrutierung des  $\beta$ -TrCP-E3-Linker Proteins und somit zur Polyubiquitinierung von Ras sowie letztendlich zu dessen proteasomalen Degradation. Durch den proteasomalen Abbau von Ras kann somit kein weiteres Signaling erfolgen. Bei *knockdown* von Gal-8 findet eine Akkumulation von EGFP-K-Ras(G12V) in den stabil überexprimierenden K-Ras-4.1-Zellen statt (Abb. 3.15 und Abb. 3.17). Daher könnte Gal-8 an der Degradation von K-Ras potentiell beteiligt sein. Gal-8 könnte hier – wie oben bereits diskutiert – als ein Transportprotein fungieren, welches K-Ras von der Plasmamembran extrahiert und zur GSK3 $\beta$ -vermittelten Phosphorylierung führt. Da diese Prozesse im Zytoplasma der Zelle ablaufen, würde Gal-8 gleichermaßen die Funktion eines Chaperons einnehmen, um den hydrophoben C-Terminus von K-Ras gegen die hydrophile Umgebung des Zytoplasmas abzuschirmen. K-Ras wird im Folgenden über  $\beta$ -TrCP polyubiquitiniert und proteasomal degradiert.

#### 4.2.3 Die Depletion von Gal-8 führt zu einer Reduktion der Akt-Proteinmenge

Neben dem Einfluss von Gal-8 auf den Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg, konnte auch ein Effekt eines *knockdowns* von Gal-8 auf die Phosphorylierung und den Proteingehalt von Akt identifiziert werden (Abb. 3.18). In allen drei analysierten PANC-1-Zelllinien

bzw. Klonen konnte nach einem *knockdown* von Gal-8 eine verringerte Phosphorylierung von Akt einhergehend mit einer verringerten Proteinmenge von Akt detektiert werden. Genauere Analysen, welche der drei Akt-Isoformen für die verringerte Proteinmenge in den PANC-1-Zellen verantwortlich ist, ergaben, dass Akt2 um etwa die Hälfte im Proteingehalt reduziert vorliegt, verglichen mit der mock-Kontrolle (Abb. 3.19). Da die Phosphorylierung von Akt gleichermaßen wie der Proteingehalt an Akt sinkt, ist anzunehmen, dass aufgrund des geringeren Proteingehaltes von Akt auch die Menge an phosphoryliertem Akt reduziert vorliegt. Die Gen-Regulation von Akt ist zum aktuellen Zeitpunkt in der einschlägigen Literatur nicht gut charakterisiert. Eine aktuelle Studie konnte belegen, dass die *AKT*-Gene über miRNAs reguliert werden können [122]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von K-Ras zur Reduktion von Akt2 in PANC-1-Zellen führt [123]. Ein *knockdown* von Gal-8 führt ebenfalls zu einer größeren Proteinmenge an EGFP-K-Ras(G12V). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Depletion von Gal-8 eine verringerte Akt2 Menge detektiert werden. Diese Beobachtung könnte durch die erhöhte Proteinmenge an EGFP-K-Ras(G12V) erklärt werden. In PANC-1-Zellen wird Akt2 auf Proteinebene stark exprimiert [124, 125]. Da Gal-8 auch im Nukleus der Zelle lokalisiert ist [126], könnte Gal-8 über Transkriptionsfaktor-abhängige Mechanismen den Proteingehalt von Akt beeinflussen. Zukünftige Experimente in unserer Arbeitsgruppe werden die mRNA Expression der *AKT*-Gene nach einem Gal-8-*knockdown* in PANC-1-Zellen analysieren. Hierzu liegen zum momentanen Zeitpunkt allerdings noch keine aktuellen Daten vor.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, existieren *Crosstalks* zwischen dem Ras/Raf/MEK/ERK- und dem PI3K/Akt-Signalweg. Eine zu erwähnende Cross-Inhibition wird durch aktiviertes ERK vermittelt. Dieses phosphoryliert das Protein GAB1, welches für die Rekrutierung von PI3K an die Plasmamembran von Bedeutung ist, sodass die Phosphorylierung von Akt inhibiert wird. Aufgrund des Anstiegs an phosphoryliertem ERK nach Gal-8-*knockdown* könnte dies – zusätzlich zur Reduktion des Proteingehaltes von Akt – die Reduktion der Phosphorylierung von Akt erklären [44]. Auch kann aktives ERK über die Rekrutierung von p90RSK und den mTORC1 Komplex auf S6K einwirken, welches nach Aktivierung Rictor in mTORC2 phosphoryliert. Dies führt letztlich zu einer Reduktion von phosphoryliertem und damit aktivem Akt [43, 127–129].

### 4.3 Bedeutung von Gal-8 für die Migration und die Proliferation in PANC-1-Zellen und Colo699-Zellen

In PANC-1-, sowie in PANC-1-Zellen, die stabil EGFP-K-Ras(G12V) und EGFP überexprimieren und in Colo699-Zellen führt ein *knockdown* von Gal-8 über einen Zeitraum von 72 h zu einer Reduktion der Migration verglichen mit der Kontrolle (Abb. 3.20). Des Weiteren ist die Verdopplungszeit in den drei PANC-1-Zelllinien nach einem Gal-8-*knockdown* erhöht (Abb. 3.21). Dies bedeutet, dass hier eine reduzierte Proliferation vorliegt.

Wird Gal-8 in den Extrazellularraum sekretiert, kann es mit Integrinen interagieren und dadurch die Zelladhäsion modulieren [69, 73, 130]. Durch die Interaktion mit Integrinen können der Ras/Raf/MEK/ERK- und der PI3K-Signalweg aktiviert werden, was die Zellproliferation und die Zellmigration steuert [131, 132]. Studien von Cárcamo in Jurkat-Zellen zeigen, dass Gal-8 die Rho-GTPase Rac1 aktivieren kann und dazu führt, dass Zellen sich ausbreiten und Lamellipodien durch Aktinzytoskelett-Umordnungen ausbilden und dies zu einer erhöhten Migration der Zelle führt [133]. Eine Interaktion zwischen der Rho-GTPase Rac1 und Gal-8 konnte *in vitro* in der hier vorliegenden Arbeit bereits bestätigt werden (Abb. 3.13). Ein *knockdown* von Gal-8 würde diese genannten Effekte folglich reduzieren, weshalb auch eine Reduktion der Migrations- und Proliferationsrate nachweisbar sein könnte. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Akt2 in PANC-1-Zellen essentiell für die Migration der Zellen ist [77, 125]. Akt2 liegt nach einem *knockdown* von Gal-8 drastisch reduziert vor und könnte einen Grund für die verringerte Migration der Zellen darstellen. Für einen Gal-8/Integrin vermittelten Effekt könnte auch sprechen, dass Akt2 die Motilität und Invasivität durch Induktion von  $\beta$ 1-Integrinen fördert [134]. Durch diese Interaktion werden fokale Kontakte ausgebildet, die für die Protrusion und die Zelladhäsion von motilen Zellen essentiell sind. In Ovarialkarzinomzellen konnte nach Inhibition von Akt2 eine Reduktion der Zellproliferation detektiert werden, während eine Inhibition von Akt1 keinen Einfluss auf die Proliferation hat [135]. Auch in Lungenkarzinomzelllinien konnte nach einem *knockdown* von Akt2 eine Reduktion in der Proliferation sowie der Motilität der Zellen detektiert werden [136].

Dies zeigt, dass die Effekte eines *knockdowns* von Gal-8 auf Migration und Proliferation durch die Reduktion des Akt2-Proteingehaltes erklärbar sein könnten. Dennoch sollte erwähnt sein, dass aktives ERK1/2 diverse Faktoren der Zellmotilitätsmaschine-

rie über direkte Phosphorylierung positiv beeinflusst [137]. Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 zeigt aber keinen Einfluss auf die durchgeführten Migrations- und Proliferationsversuche und führt nicht zu einer erhöhten Motilität der Zellen. Eine Begründung für diese Tatsache bedarf weiterer Analysen.

#### 4.4 Lokalisation von Gal-8 in PANC-1-Zellen

Gal-8 wurde in vorangehenden Arbeiten bereits in der löslichen und in der membranären Fraktion nach einer Fraktionierung mittels Western Blot Analyse detektiert [67, 90]. In diversen Datenbanken und Publikationen ist Gal-8 als Protein gelistet, welches im Zytosol, in zytoplasmatischen Vesikeln, im Zellkern und im extrazellulären Raum detektiert wurde [69, 76, 126]. Während die hauptsächliche Lokalisation von K-Ras in der Plasmamembran nicht angezweifelt wird, kann es auch in anderen Kompartimenten der Zelle, vor allem in vesikulären Strukturen, dem ER und dem Golgi nachgewiesen werden [6, 50, 138]. Die Ergebnisse von Thurston und ihren Kollegen weisen darauf hin, dass Gal-8 an endosomalen Strukturen vorliegt [76]. Lu *et al.* beschreiben, dass auch K-Ras an endosomalen Strukturen nachweisbar ist [50], sodass eine Ko-Lokalisation zwischen K-Ras und Gal-8 an endosomalen Strukturen möglich ist. Als Markerprotein für *Early* Endosomen wurde Rab5, für *Late* Endosomen Rab7 und für *Recycling* Endosomen Rab11 verwendet [47].

Immunfluoreszenzaufnahmen von Gal-8 und K-Ras zeigen eine klare Ko-Lokalisation der beiden Proteine an der Plasmamembran (Abb. 3.22). Die Quantifizierung mittels der Fiji Software legt eine nahezu 100 %-ige Übereinstimmung der relativen Intensitätskurven in dem gewählten Bildausschnitt nahe, wodurch die Interaktion zwischen Gal-8 und K-Ras nochmals bestätigt wird. Es zeigt sich allerdings, dass eine Ko-Lokalisation nicht über den gesamten analysierten Bereich, sondern lediglich innerhalb von gewissen Bereichen stattfindet. Dazwischen ist eine Ko-Lokalisation nicht nachweisbar. Dies könnte einerseits mit der dreidimensionalen Auffaltung der Plasmamembran innerhalb einer Immunfluoreszenzaufnahme, andererseits aber auch mit der zeitlichen und räumlichen Verteilung von Ras-Proteinen innerhalb der Plasmamembran erklärt werden. In weiteren Analysen konnte in einigen analysierten Strukturbereichen eine Ko-Lokalisation von Gal-8 mit Rab11 und eine Ko-Lokalisation von Gal-8 mit Rab7 belegt werden (Abb. 3.24 und Abb. 3.25). Eine Ko-Lokalisation mit Rab5 liegt hingegen nicht vor (Abb. 3.23). Dies zeigt erstmals, dass Gal-8 und K-Ras gemeinsam an *Late*-

sowie *Recycling*-Endosomen ko-lokalisiert vorliegen. Wie bereits oben erwähnt, könnte Gal-8 die Funktion als Chaperon-ähnliches Transportprotein von K-Ras einnehmen. Hierzu würde das an den *Late*- und *Recycling*-Endosomen lokalisierte K-Ras von Gal-8 extrahiert werden, indem die hydrophobe Prenylierung von K-Ras in Gal-8 inkorporiert. Dies führt zu einer Abschirmung der hydrophilen Umgebung im Zytoplasma und könnte im Folgenden zum Transport von K-Ras zur Degradation über den *destruction complex* führen. Da Gal-8 an der Plasmamembran als auch an vesikulären Strukturen nachgewiesen werden kann und gezeigt wurde, dass K-Ras an der Plasmamembran und an Endomembranen ein Raf/MEK/ERK-vermitteltes *Signaling* induzieren kann [50, 108], könnte Gal-8 in der Tat als regulatorisches Protein für die Stabilität von K-Ras wirken. Diesbezüglich müssen detailliertere Analysen den genauen potentiellen Mechanismus der Ras/Gal-8-Interaktion an Endomembranen aufklären.

#### 4.5 Therapeutische Einsatzmöglichkeiten

Als direkter Interaktionspartner von K-Ras ist Gal-8 und allgemein die Gruppe der Galektine ein geeigneter Ansatzpunkt für eine gezielte Tumorthapie. Aufgrund der geringen Wirksamkeit bzw. der hohen Toxizität diverser Therapeutika, die alle auf Ras-assoziierte-Proteine wirken oder die Lokalisation von Ras an der Plasmamembran verhindern, ist ein Durchbruch in den Therapie-Möglichkeiten bei Ras-induzierten Tumoren bislang nicht erzielt worden [139–148]. Galektine werden in der aktuellen Forschung aufgrund ihres Expressionsprofils in malignen Tumoren als prognostische Marker und andererseits als Ansatzpunkte für diverse Therapieansätze genutzt [63, 69, 149, 150]. Studien beschreiben Gal-1 als einen geeigneten prognostischen Marker für ein frühes Stadium von NSCLC, da der Proteingehalt an Gal-1 in malignen Zellen erhöht vorliegt [151]. Auch ein erhöhter Gal-3-Proteingehalt wurde bereits als ein Indikator für schlechte Prognosen von NSCLC-Patienten identifiziert [152]. Bereits vor mehr als 20 Jahren wurde Gal-8 als prognostischer Marker von Prostatakrebs identifiziert. Nicht ohne Grund wird Gal-8 auch als *Prostate Cancer Tumor Antigen-1* bezeichnet, da es nur in neoplastischen Gewebeabschnitten und nicht im gesunden Prostatagewebe exprimiert wird [153]. In Pankreas- und Lungenkarzinomzelllinien liegt die Expressionsverteilung von Gal-8 homogen vor. In allen von uns getesteten Zelllinien, mit Ausnahme von H1299-Zellen, konnte Gal-8 nachgewiesen werden (Tab. 1). In der hier vorliegenden Arbeit konnte Gal-8 mit der Stabilität von K-Ras in Verbindung gebracht werden. Ein *knockdown* von Gal-8 führte zu einer erhöhten Proteinmenge von ekto-

exprimiertem EGFP-K-Ras in den Zellen und zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2, bei gleichzeitiger Reduktion des Proteingehaltes von AKT. Weiterhin bewirkte ein *knockdown* von Gal-8 eine Reduktion der Migrations- und Proliferationsrate von PANC-1-Zellen. Trotz des Anstiegs von EGFP-K-Ras und der Phosphorylierung von ERK1/2 könnte somit ein *knockdown* von Gal-8 für einen Therapieansatz in Pankreaszellen erwogen werden. Zukünftige Studien müssten unter Verwendung der CRISPR/Cas-Methode Gal-8 vollständig depletieren, sodass analysiert werden kann, ob es Anpassungsprozesse innerhalb der Zelle gibt, die einem *knockdown* von Gal-8 entgegenwirken oder ob die Effekte auf Migration und Proliferation bestehen bleiben. Nur wenige Studien fokussieren sich momentan auf den Einfluss von Gal-8 auf diverse Krankheitsbilder. Eine Studie von Evelyn Pardo und ihren Kollegen zeigt, dass Gal-8 eine immunsuppressive und protektive Rolle gegen Autoimmunitätserscheinungen des zentralen Nervensystems bei Multipler Sklerose aufweist [154]. Weitere Studien sind zwar verfügbar, beschreiben aber lediglich das Expressionsmuster von Gal-8 in diversen Geweben, nicht aber die funktionelle Rolle von Gal-8 [155].

Für Gal-1 und Gal-3 sind mittlerweile erste Versuchsreihen gestartet, die darauf abzielen, die Proliferation von Tumoren zu inhibieren. Eine Studie von Lynda Vuong nutzt den Gal-3 Inhibitor GB1107, welcher die Proliferation von menschlichen und murinen Lungenadenokarzinomzellen reduziert und die Metastasierung blockiert [156]. Ein modifiziertes Zitruspektin kann an die CRD von Gal-3 binden und die Gal-3-vermittelten Funktionen dadurch antagonisieren. Die Behandlung mit dem modifizierten Zitruspektin bei akuten Nierenverletzungen führt zu einer reduzierten renalen Zellproliferation. Auch konnten Entzündungsreaktionen reduziert werden, die alleinig über Gal-3 vermittelt werden [85]. Weiterhin spielt Gal-3 eine bedeutende Rolle während der akuten myeloischen Leukämie (ALM). Eine Kombinationstherapie aus dem Gal-3-Inhibitor GCS-100 und ABT-737 oder ABT-199, welche beide auf den anti-apoptotischen Faktor Bcl-2 wirken, konnte effektiv primäre AML-Vorläuferzellen inhibieren [86]. Aufgrund der Tatsache, dass Studien eine Interaktion von H-Ras und Gal-1 nachgewiesen haben, wurde mittels des Therapeutikums OTX008 versucht H-Ras zu inhibieren. In Studien konnte eine Abhängigkeit zwischen einer erhöhten Proteinmenge von H-Ras zu einer erhöhten Proteinmenge von Gal-1 bzw. in umgekehrtem Maße zwischen Gal-1 und H-Ras identifiziert werden [57, 58]. Der Wirkstoff OTX008 ist in der Lage, die H-Ras-vermittelte Signaltransduktion über den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg zu inhibieren. Wird zusätzlich zu OTX008 der PI3K-Signalweg-Inhibitor Rapamycin verwendet, so

kann nahezu die gesamte H-Ras-vermittelte Tumorpheriferation eingeschränkt werden [84].

Die vorliegenden Ergebnisse sowie die dargestellten Therapieansätze zeigen das große Potential, welches in der Anwendung von Galektin-Inhibitoren vorhanden ist. Dies wird mit großer Wahrscheinlichkeit in zukünftigen Studien näher analysiert und zu einigen Erfolgen führen. Dafür sprechen die aktuell bei *clinicaltrials.gov* angemeldeten 101 Galektin-bezogenen klinischen Studien [157].

## 5. Zusammenfassung

Die vier Ras-Isoformen H-Ras, N-Ras, K-Ras4A sowie K-Ras4B gehören zur Familie der Ras-Proteine. Diese Membran-assoziierten monomeren GTPasen wechseln zwischen einem GTP-gebundenen, aktiven und einem GDP-gebundenen, inaktivem Zustand. Das aktive GTP-gebundene Ras-Protein vermittelt an der Plasmamembran eine Aktivierung von Effektorproteinen, die über verschiedene Signalwege Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Transformation von Zellen beeinflussen. Die intrinsische und die durch GTPase-aktivierende-Proteine(GAP)-vermittelte GTPase Aktivität von Ras liegt in vielen bekannten, onkogenen Ras-Mutanten stark reduziert vor, sodass Ras im GTP-gebundenen Zustand an der Plasmamembran verbleibt und dort unkontrolliert Effektor-Signalwege aktiviert.

In Pankreas- und Lungenkarzinomen liegt das *KRAS*-Onkogen prädominant mutiert vor. Versuche, onkogenes K-Ras zu inhibieren oder die Lokalisation von K-Ras zu verändern waren aufgrund der Toxizität bzw. Ineffektivität der pharmakologischen Inhibitoren erfolglos.

Galektin-8 wurde in unserer Arbeitsgruppe als ein neuer Interaktionspartner von K-Ras4B beschrieben. In früheren Analysen konnte die N-terminale *carbohydrate recognition domain* (CRD) von Galektin-8 bereits als interagierende Domäne mit K-Ras identifiziert werden. Um die Bedeutung der Farnesylierung von K-Ras4B für die Interaktion mit Galektin-8 zu analysieren, wurden Farnesyldomänen-Mutanten von K-Ras4B ektop exprimiert und *in vitro*-Interaktionsstudien mit endogenem Galektin-8 aus PANC-1-Lysaten durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass farnesyl-defizientes K-Ras4B nicht mit Galektin-8 interagiert. Weiterhin wurde der Einfluss der positiv-geladenen Lysine im C-Terminus von K-Ras4B auf die Interaktion mit Galektin-8 untersucht. Lysine an den Positionen 182 bzw. 184 in der Aminosäuresequenz von K-Ras4B wurden gegen Serin bzw. Prolin ausgetauscht. Es zeigte sich, dass bei einer Mutation beider Lysine an den Positionen 182 und 184 die Interaktion mit Galektin-8 eingeschränkt ist. Werden darüber hinaus zusätzlich die Lysine innerhalb der polybasischen Domäne von K-Ras4B mutiert, so kommt es zu einem nahezu vollständigen Verlust der Interaktion der beiden Proteine. Im Gegensatz zur Interaktion von Galektin-1 und Galektin-3 mit Ras-Proteinen ist die Interaktion von Galektin-8 mit K-Ras4B unabhängig von dem gebundenen Guaninnukleotid. Weitere GTPasen, wie Rac1, Rac1b und Cdc42, die posttranslational geranylgeranyliert vorliegen, konnten in *in vitro*-Interaktionsstudien ebenfalls als Interaktionspartner von Galektin-8 identifiziert werden. Dabei zeigte



sich, dass Lysine in unmittelbarer Nähe des prenylierten Cysteins erneut einen stabilisierenden Einfluss auf die Interaktion dieser GTPasen mit Galektin-8 haben.

Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden Strukturanalysen in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Karin Fritz-Wolf (Institut für Ernährungswissenschaften, Gießen) erstellt. Es konnte eine hydrophobe Tasche innerhalb der N-CRD von Galektin-8 identifiziert werden, die ein negativ-geladenes Aminosäure-Cluster enthält, welches mit der polybasischen Domäne von K-Ras elektrostatisch interagieren und somit die Interaktion zwischen den beiden Proteinen stabilisieren könnte.

Untersuchungen zu den Effekten eines siRNA-vermittelten *knockdowns* von Galektin-8 auf den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg, zeigten, dass der Proteingehalt von EGFP-K-Ras(G12V) nach *knockdown* von Galektin-8 zunimmt. Ebenfalls konnte eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen werden, welche durch den Anstieg des Proteingehaltes von EGFP-K-Ras(G12V) begründet sein könnte. Analysen hinsichtlich des PI3K/Akt-Signalwegs zeigten, dass nach einem *knockdown* von Galektin-8 der Proteingehalt von Akt sowie die Phosphorylierung von Akt verringert ist. Über Akt-Isoform-spezifische Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass die Akt-Isoform Akt2 als einzige der drei analysierten Akt-Isoformen nach Galektin-8 *knockdown* reduziert vorliegt. Die Depletion von Galektin-8 führte außerdem zu einer Reduktion der Migrations- und Proliferationsrate von PANC-1-Zellen. Des Weiteren zeigten Immunfluoreszenz-Analysen, dass Galektin-8 mit K-Ras an der Plasmamembran ko-lokalisiert. Es konnte an einigen der analysierten Strukturen eine Ko-Lokalisation von Gal-8 mit Rab7 sowie eine Ko-Lokalisation von Galektin-8 mit Rab11 an *Late*- und *Recycling*-Endosomen detektiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die direkte Interaktion von K-Ras und Galektin-8 nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von K-Ras und Galektin-8 abhängig von der Farnesylierung von K-Ras, den Lysinen 182 und 184 am C-Terminus von K-Ras sowie abhängig von der polybasischen Domäne von K-Ras ist. Weiterhin konnte dargestellt werden, dass Galektin-8 die beiden bedeutenden, tumor-relevanten Signaltransduktionswege Ras/Raf/MEK/ERK sowie den PI3K/Akt beeinflusst und bei Depletion zu einer Reduktion der Migration und Proliferation von PANC-1-Zellen führt. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Daten weisen weiterhin darauf hin, dass Galektin-8 als Chaperon-ähnliches Transportprotein K-Ras von der Plasmamembran oder von endosomalen Strukturen extrahieren und im Folgenden zur proteasomalen Degradation geleiten könnte.

## 6. Summary

The four Ras proteins H-Ras, N-Ras, K-Ras4A as well as K-Ras4B belong to the family of Ras proteins. These membrane-associated monomeric GTPases cycle between a GTP-bound, active and a GDP-bound, inactive state. The active, GTP-bound Ras-proteins mediate the activation of downstream effector proteins, thereby influencing processes like proliferation, migration, differentiation, survival and transformation. The intrinsic and the GTPase-activating protein (GAP)-mediated GTPase activity of Ras is reduced in many Ras-mutants rendering the proteins in a predominantly GTP-bound state which subsequently lead to a permanent activation of downstream signal transduction pathways.

The *KRAS*-oncogene is frequently mutated in many pancreatic and lung carcinoma cells. Many approaches to directly inhibit oncogenic Ras or target its localization at the plasma membrane fail due to the high toxicity and low efficiency of diverse pharmacological inhibitors.

Our group identified Galectin-8 as a novel interaction partner of K-Ras4B. Previous studies revealed that the N-terminal carbohydrate recognition domain (CRD) of Galectin-8 interact with K-Ras4B. To identify the role of the farnesylation of K-Ras4B in mediating the interaction with Galectin-8, *in vitro* interaction assays with farnesyl-domain mutants of K-Ras were performed. Therefore, these mutants were expressed ectopically and subsequently incubated with endogenous Galectin-8 isolated from PANC-1-cells. It was shown, that farnesyl-deficient K-Ras4B was not able to interact with Galectin-8. Furthermore, the impact of the positively charged lysines in close proximity to the C-terminus of K-Ras4B were analyzed regarding their influence on the interaction with Galectin-8. Lysines at position 182 and 184, respectively, were replaced by serine and proline. By mutating both lysines the interaction with Galectin-8 was impeded. Mutating further lysines within the polybasic domain of K-Ras4B led to an almost complete loss of the interaction between both proteins. In contrast to the interaction of Galectin-1 or Galectin-3 with Ras-proteins, the interaction of Galectin-8 and K-Ras4B is independent of the type of bound guanine nucleotide. Further *in vitro* interaction assays revealed, that other GTPases, like Rac1, Rac1b and Cdc42, which are posttranslationally geranylgeranylated, also interact with Galectin-8. Again, lysines close to the prenylated cysteine might stabilize the interaction between the respective GTPase and Galectin-8.

Based on these studies, structure analyses were performed in cooperation with Dr. Karin Fritz-Wolf (Institute of Nutritional Sciences, Giessen). We identified a hydrophobic pocket within the N-CRD of Galectin-8 containing a cluster of negatively charged amino acids, which might interact electrostatically with the polybasic domain of K-Ras, thereby stabilizing the interaction between both proteins.

Additionally, siRNA-mediated depletion experiments were performed to elucidate possible effects of a knockdown of Galectin-8 on the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. The protein content of EGFP-K-Ras(G12V) was increased after depletion of Galectin-8. Furthermore, the phosphorylation of ERK1/2 was enhanced, which might be caused by the elevated amounts of EGFP-K-Ras(G12V). Analyses of the PI3K/Akt signaling pathway showed, that the protein amounts as well as the phosphorylation levels of Akt were reduced after Galectin-8 depletion. By using Akt-isoform-specific antibodies, it was discovered, that only the protein levels of Akt2 but not that of Akt1 or Akt3 was reduced upon depletion of Galectin-8. A knockdown of Galectin-8 also led to a reduction of the migration and proliferation rate of PANC-1-cells. Immunofluorescence studies showed, that Galectin-8 co-localizes with K-Ras in PANC-1-cells. Furthermore, a co-localization of Galectin-8 with the endosomal marker proteins Rab7 as well as Rab11 on late and recycling endosomes was revealed, respectively.

The studies performed in the scope of this work uncovered a novel direct interaction of K-Ras with Galectin-8. This interaction depends on the farnesylation of lysine residues 182 and 184 located at the C-terminus of K-Ras within the polybasic domain. Furthermore, the data presented in this work revealed an influence of Galectin-8 on the tumor-relevant pathways Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt. Moreover, a depletion of Galectin-8 led to a reduction of the migration and proliferation rate of PANC-1-cells. Altogether, the data obtained in this work indicate a role of Galectin-8 as a chaperon-like transport protein, which might extract K-Ras from the plasma membrane or other endomembranes leading to its subsequent transport from these compartments towards the proteasomal degradation machinery.

## 7. Literatur

- [1] Wennerberg, K., Rossman, K. L., Der, C. J. 2005. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science* 118, Pt 5, 843–846.
- [2] Cherfils, J., Chardin, P. 1999. GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends in biochemical sciences* 24, 8, 306–311.
- [3] Cox, A. D., Der, C. J. 2010. Ras history: The saga continues. *Small GTPases* 1, 1, 2–27.
- [4] Giehl, K. 2005. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biological chemistry* 386, 3, 193–205.
- [5] Calvisi, D. F., Ladu, S., Conner, E. A., et al. 2010. Inactivation of Ras GTPase-activating proteins promotes unrestrained activity of wild-type Ras in human liver cancer. *Journal of hepatology* 54, 2, 311–319.
- [6] Dreissigacker, U., Mueller, M. S., Unger, M., et al. 2006. Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. *Cellular signalling* 18, 8, 1156–1168.
- [7] Vetter, I. R. 2014. The Structure of the G Domain of the Ras Superfamily. In *Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms 1. General Features, Signaling*, A. Wittinghofer, Ed. Springer Vienna, Vienna, s.l., 25–50. DOI=10.1007/978-3-7091-1806-1\_2.
- [8] Ryan, M. B., Corcoran, R. B. 2018. Therapeutic strategies to target RAS -mutant cancers. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 11, 709–720.
- [9] Vetter, I. R., Wittinghofer, A. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, N.Y.)* 294, 5545, 1299–1304.
- [10] Ahmadian, M. R., Zor, T., Vogt, D., et al. 1999. Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12, 7065–7070.
- [11] Ahearn, I. M., Haigis, K., Bar-Sagi, D., et al. 2012. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 1, 39.
- [12] Fu, H. W., Casey, P. J. 1999. Enzymology and biology of CaaX protein prenylation. *Recent progress in hormone research* 54, 315-42; discussion 342-3.
- [13] Whyte, D. B., Kirschmeier, P., Hockenberry, T. N., et al. 1997. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 272, 22, 14459–14464.
- [14] Choy, E., Chiu, V. K., Silletti, J., et al. 1999. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98, 1, 69–80.
- [15] Boyartchuk, V. L., Ashby, M. N., Rine, J. 1997. Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis. *Science (New York, N.Y.)* 275, 5307, 1796–1800.
- [16] Dai, Q., Choy, E., Chiu, V., et al. 1998. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 273, 24, 15030–15034.
- [17] Hancock, J. F., Paterson, H., Marshall, C. J. 1990. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63, 1, 133–139.
- [18] Janosi, L., Gorfe, A. A. 2010. Segregation of Negatively Charged Phospholipids by the Polycationic and Farnesylated Membrane Anchor of Kras. *Biophysical journal* 99, 11, 3666–3674.
- [19] Rocks, O., Gerauer, M., Vartak, N., et al. 2010. The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins. *Cell* 141, 3, 458–471.
- [20] Cox, A. D., Der, C. J., Philips, M. R. 2015. Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 8, 1819–1827.
- [21] Lin, D. T. S., Conibear, E. 2015. ABHD17 proteins are novel protein depalmitoylases that regulate N-Ras palmitate turnover and subcellular localization. *eLife* 4.
- [22] Schmick, M., Kraemer, A., Bastiaens, P. I. H. 2015. Ras moves to stay in place. *Trends in cell biology* 25, 4, 190–197.
- [23] Goodwin, J. S., Drake, K. R., Rogers, C., et al. 2005. Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *The Journal of cell biology* 170, 2, 261–272.
- [24] Roy, S., Plowman, S., Rotblat, B., et al. 2005. Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Molecular and cellular biology* 25, 15, 6722–6733.
- [25] Tsai, F. D., Wynne, J. P., Ahearn, I. M., et al. 2014. Metabolic labeling of Ras with tritiated palmitate to monitor palmitoylation and depalmitoylation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1120, 33–41.

- [26] Garcia-Mata, R., Boulter, E., Burridge, K. 2011. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, 8, 493–504.
- [27] Rotblat, B., Niv, H., André, S., et al. 2004. Galectin-1(L11A) predicted from a computed galectin-1 farnesyl-binding pocket selectively inhibits Ras-GTP. *Cancer research* 64, 9, 3112–3118.
- [28] Berg, T. J., Gastonguay, A. J., Lorimer, E. L., et al. 2010. Splice variants of SmgGDS control small GTPase prenylation and membrane localization. *The Journal of biological chemistry* 285, 46, 35255–35266.
- [29] Figueroa, C., Taylor, J., Vojtek, A. B. 2001. Prenylated Rab acceptor protein is a receptor for prenylated small GTPases. *J. Biol. Chem.* 276, 30, 28219–28225.
- [30] Zhou, M., Wiener, H., Su, W., et al. 2016. VPS35 binds farnesylated N-Ras in the cytosol to regulate N-Ras trafficking. *The Journal of cell biology* 214, 4, 445–458.
- [31] Nancy, V., Callebaut, I., El Marjou, A., et al. 2002. The delta subunit of retinal rod cGMP phosphodiesterase regulates the membrane association of Ras and Rap GTPases. *J. Biol. Chem.* 277, 17, 15076–15084.
- [32] Zhang, H., Li, S., Doan, T., et al. 2007. Deletion of PrBP/delta impedes transport of GRK1 and PDE6 catalytic subunits to photoreceptor outer segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 21, 8857–8862.
- [33] Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., et al. 1997. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes & Development* 11, 19, 2468–2481.
- [34] Fivaz, M., Meyer, T. 2005. Reversible intracellular translocation of KRas but not HRas in hippocampal neurons regulated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *J Cell Biol* 170, 3, 429–441.
- [35] Hanzal-Bayer, M., Renault, L., Roversi, P., et al. 2002. The complex of Arl2-GTP and PDEδ: from structure to function. *The EMBO journal* 21, 9, 2095–2106.
- [36] Roberts, P. J., Der, C. J. 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 22, 3291.
- [37] Chardin, P., Cussac, D., Maignan, S., et al. 1995. The Grb2 adaptor. *FEBS letters* 369, 1, 47–51.
- [38] Aramini, J. M., Vorobiev, S. M., Tuberty, L. M., et al. 2015. The RAS-Binding Domain of Human BRAF Protein Serine/Threonine Kinase Exhibits Allosteric Conformational Changes upon Binding HRAS. *Structure (London, England : 1993)* 23, 8, 1382–1393.
- [39] Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., et al. 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 22, 3279–3290.
- [40] Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Dhand, R., et al. 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370, 6490, 527–532.
- [41] Nicholson, K. M., Anderson, N. G. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular signalling* 14, 5, 381–395.
- [42] Liu, P., Gan, W., Chin, Y. R., et al. 2015. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer discovery* 5, 11, 1194–1209.
- [43] Dibble, C. C., Asara, J. M., Manning, B. D. 2009. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Molecular and cellular biology* 29, 21, 5657–5670.
- [44] Yu, C. F., Liu, Z.-X., Cantley, L. G. 2002. ERK negatively regulates the epidermal growth factor-mediated interaction of Gab1 and the phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 22, 19382–19388.
- [45] Guan, K.-L., Figueroa, C., Brtva, T. R., et al. 2000. Negative Regulation of the Serine/Threonine Kinase B-Raf by Akt. *J. Biol. Chem.* 275, 35, 27354–27359.
- [46] Hata, A. N., Engelman, J. A., Faber, A. C. 2015. The BCL-2 family: key mediators of the apoptotic response to targeted anti-cancer therapeutics. *Cancer discovery* 5, 5, 475–487.
- [47] Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 8, 513–525.
- [48] Bivona, T. G., Castro, I. P. d., Ahearn, I. M., et al. 2003. Phospholipase Cy activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* 424, 6949, 694.
- [49] Chiu, V. K., Bivona, T., Hach, A., et al. 2002. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nature Cell Biology* 4, 5, 343.
- [50] Lu, A., Tebar, F., Alvarez-Moya, B., et al. 2009. A clathrin-dependent pathway leads to KRas signaling on late endosomes en route to lysosomes. *The Journal of cell biology* 184, 6, 863–879.
- [51] Plowman, S. J., Muncke, C., Parton, R. G., et al. 2005. H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 43, 15500–15505.

- [52] Murakoshi, H., Iino, R., Kobayashi, T., et al. 2004. Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 19, 7317–7322.
- [53] Ghosh, S., Strum, J. C., Sciorra, V. A., et al. 1996. Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 14, 8472–8480.
- [54] Abankwa, D., Gorfe, A. A., Inder, K., et al. 2010. Ras membrane orientation and nanodomain localization generate isoform diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 3, 1130–1135.
- [55] Giehl, K., Skripczynski, B., Mansard, A., et al. 2000. Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras: implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene* 19, 25, 2930–2942.
- [56] Wittinghofer, A. 2014. *Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms 1: General Features, Signaling*. Springer Vienna.
- [57] Prior, I. A., Muncke, C., Parton, R. G., et al. 2003. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *The Journal of cell biology* 160, 2, 165–170.
- [58] Belanis, L., Plowman, S. J., Rotblat, B., et al. 2008. Galectin-1 Is a Novel Structural Component and a Major Regulator of H-Ras Nanoclusters. *Molecular Biology of the Cell* 19, 4, 1404–1414.
- [59] Shalom-Feuerstein, R., Levy, R., Makovski, V., et al. 2008. Galectin-3 regulates RasGRP4-mediated activation of N-Ras and H-Ras. *Biochimica et biophysica acta* 1783, 6, 985–993.
- [60] Shalom-Feuerstein, R., Plowman, S. J., Rotblat, B., et al. 2008. K-ras nanoclustering is subverted by overexpression of the scaffold protein galectin-3. *Cancer research* 68, 16, 6608–6616.
- [61] Dimitroff, C. J. 2015. Galectin-Binding O-Glycosylations as Regulators of Malignancy. *Cancer research* 75, 16, 3195–3202.
- [62] Liu, F.-T., Rabinovich, G. A. 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews. Cancer* 5, 1, 29–41.
- [63] Vladioiu, M. C., Labrie, M., St-Pierre, Y. 2014. Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapy (Review). *International journal of oncology* 44, 4, 1001–1014.
- [64] Cummings, R. D., Liu, F.-T., and Vasta, G. R. 2017. *Galectins*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [65] Delacour, D., Koch, A., Jacob, R. 2009. The role of galectins in protein trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10, 10, 1405–1413.
- [66] Cooper, D. N.W., Barondes, S. H. 1990. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *The Journal of cell biology* 110, 5, 1681–1691.
- [67] Barnard, S.-J. 2015. *Charakterisierung der Interaktion von K-Ras mit Galectin-8 und deren Einfluss auf die Signaltransduktion von Karzinomzellen*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- [68] Porr, A. 2010. *Expression und Lokalisation von Galectin-1, Galectin-3 und Galectin-8 in Pankreaskarzinomzelllinien*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- [69] Elola, M. T., Wolfenstein-Todel, C., Troncoso, M. F., et al. 2007. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64, 13, 1679–1700.
- [70] Meinohl, C., Barnard, S. J., Fritz-Wolf, K., et al. 2019. Galectin-8 binds to the Farnesylated C-terminus of K-Ras4B and Modifies Ras/ERK Signaling and Migration in Pancreatic and Lung Carcinoma Cells. *Cancers* 12, 1.
- [71] Yoshida, H., Yamashita, S., Teraoka, M., et al. 2012. X-ray structure of a protease-resistant mutant form of human galectin-8 with two carbohydrate recognition domains. *The FEBS journal* 279, 20, 3937–3951.
- [72] Bidon-Wagner, N., Le Pennec, J.-P. 2002. Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconjugate journal* 19, 7-9, 557–563.
- [73] Levy, Y., Arbel-Goren, R., Hadari, Y. R., et al. 2001. Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 276, 33, 31285–31295.
- [74] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., et al. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* 25, 13, 1605–1612.
- [75] Jia, J., Abudu, Y. P., Claude-Taupin, A., et al. 2018. Galectins Control mTOR in Response to Endomembrane Damage. *Molecular cell* 70, 1, 120-135.e8.
- [76] Thurston, T. L. M., Wandel, M. P., Muhlinen, N. von, et al. 2012. Galectin-8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482, 7385, 414–418.

- [77] Unger, M. 2006. *Charakterisierung des Einflusses von konstitutiv aktivem K-Ras(G12V) auf die Signaltransduktion und die Migration von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen*. Biologische Dissertation, Universität Ulm.
- [78] Elola, M. T., Ferragut, F., Méndez-Huergo, S. P., et al. 2018. Galectins: Multitask signaling molecules linking fibroblast, endothelial and immune cell programs in the tumor microenvironment. *Cellular immunology*.
- [79] Ashery, U., Yizhar, O., Rotblat, B., et al. 2006. Spatiotemporal organization of Ras signaling: rasoosomes and the galectin switch. *Cellular and molecular neurobiology* 26, 4-6, 471–495.
- [80] Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Balan, E., et al. 2004. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *The Journal of biological chemistry* 279, 33, 34922–34930.
- [81] Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Ballan, E., et al. 2002. Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 277, 40, 37169–37175.
- [82] Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., et al. 2001. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* 20, 51, 7486–7493.
- [83] Blaževič, O., Mideksa, Y. G., Šolman, M., et al. 2016. Galectin-1 dimers can scaffold Raf-effectors to increase H-ras nanoclustering. *Scientific reports* 6, 24165.
- [84] Michael, J. V., Wurtzel, J. G. T., Goldfinger, L. E. 2016. Inhibition of Galectin-1 Sensitizes HRAS-driven Tumor Growth to Rapamycin Treatment. *Anticancer research* 36, 10, 5053–5061.
- [85] Kolatsi-Joannou, M., Price, K. L., Winyard, P. J., et al. 2011. Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury. *PLoS one* 6, 4, e18683.
- [86] Ruvolo, P. P., Ruvolo, V. R., Benton, C. B., et al. 2016. Combination of galectin inhibitor GCS-100 and BH3 mimetics eliminates both p53 wild type and p53 null AML cells. *Biochimica et biophysica acta* 1863, 4, 562–571.
- [87] Seguin, L., Camargo, M. F., Wettersten, H. I., et al. 2017. Galectin-3, a Druggable Vulnerability for KRAS-Addicted Cancers. *Cancer discovery* 7, 12, 1464–1479.
- [88] Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nature methods* 9, 7, 671–675.
- [89] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9, 7, 676–682.
- [90] Meinohl, C. 2015. *Charakterisierung der Interaktionsdomäne des Galectin-8 mit K-Ras*. Biologische Master-Arbeit, Justus-Liebig-Universität.
- [91] Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., et al. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36, 1, 59–74.
- [92] Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., et al. 1975. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *International journal of cancer* 15, 5, 741–747.
- [93] Niv, H., Gutman, O., Henis, Y. I., et al. 1999. Membrane Interactions of a Constitutively Active GFP-Ki-Ras 4B and Their Role in Signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 3, 1606–1613.
- [94] Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. COLO-699, DSMZ no.: ACC-196. <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-196.html>. Accessed 05.01.19.
- [95] Stähle, M., Veit, C., Bachfischer, U., et al. 2003. Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK. *Journal of cell science* 116, Pt 18, 3835–3846.
- [96] Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16, 22, 10881–10890.
- [97] Glaß, M., Möller, B., Zirkel, A., et al. 2012. Cell migration analysis: Segmenting scratch assay images with level sets and support vector machines. *Pattern Recognition* 45, 9, 3154–3165.
- [98] Walsh, B. W., Lenhart, J. S., Schroeder, J. W., et al. 2012. Far western blotting as a rapid and efficient method for detecting interactions between DNA replication and DNA repair proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 922, 161–168.
- [99] Hall, A. 2000. *GTPases*. Oxford University Press.
- [100] Li, V. S.W., Ng, S. S., Boersema, P. J., et al. 2012. Wnt Signaling through Inhibition of  $\beta$ -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell* 149, 6, 1245–1256.
- [101] Hoffman, G. R., Nassar, N., Cerione, R. A. 2000. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* 100, 3, 345–356.
- [102] Kato, K., Cox, A. D., Hisaka, M. M., et al. 1992. Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 14, 6403–6407.

- [103] Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., et al. 2000. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends in cell biology* 10, 4, 147–154.
- [104] Chandra, A., Grecco, H. E., Pisupati, V., et al. 2011. The GDI-like solubilizing factor PDE $\delta$  sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nature Cell Biology* 14, 2, 148–158.
- [105] Abankwa, D., Hanzal-Bayer, M., Ariotti, N., et al. 2008. A novel switch region regulates H-ras membrane orientation and signal output. *The EMBO journal* 27, 5, 727–735.
- [106] Gorfe, A. A., Babakhani, A., McCammon, J. A. 2007. H-ras protein in a bilayer: interaction and structure perturbation. *Journal of the American Chemical Society* 129, 40, 12280–12286.
- [107] Janosi, L., Li, Z., Hancock, J. F., et al. 2012. Organization, dynamics, and segregation of Ras nanoclusters in membrane domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 21, 8097–8102.
- [108] Plowman, S. J., Hancock, J. F. 2005. Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1746, 3, 274–283.
- [109] Plowman, S. J., Ariotti, N., Goodall, A., et al. 2008. Electrostatic interactions positively regulate K-Ras nanocluster formation and function. *Molecular and cellular biology* 28, 13, 4377–4385.
- [110] Zhou, Y., Hancock, J. F. 2015. Ras nanoclusters: Versatile lipid-based signaling platforms. *Biochimica et biophysica acta* 1853, 4, 841–849.
- [111] Collins, P. M., Oberg, C. T., Leffler, H., et al. 2012. Taloside inhibitors of galectin-1 and galectin-3. *Chemical biology & drug design* 79, 3, 339–346.
- [112] National Center for Biotechnology Information. *Geranylgeranyl diphosphate*. CID=447277. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447277>. Accessed 23 April 2019.
- [113] Remorino, A., Beco, S. de, Cayrac, F., et al. 2017. Gradients of Rac1 Nanoclusters Support Spatial Patterns of Rac1 Signaling. *Cell reports* 21, 7, 1922–1935.
- [114] Maxwell, K. N., Zhou, Y., Hancock, J. F. 2018. Clustering of Rac1: Selective Lipid Sorting Drives Signaling. *Trends in biochemical sciences* 43, 2, 75–77.
- [115] Han, Y. H., Moon, H. J., You, B. R., et al. 2009. The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncology reports* 22, 1, 215–221.
- [116] Goldberg, A. L. 2012. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *The Journal of cell biology* 199, 4, 583–588.
- [117] Jeong, W.-J., Ro, E. J., Choi, K.-Y. 2018. Interaction between Wnt/ $\beta$ -catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of  $\beta$ -catenin and RAS by targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *NPJ Precision Oncology* 2.
- [118] Jeong, W.-J., Yoon, J., Park, J.-C., et al. 2012. Ras stabilization through aberrant activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes intestinal tumorigenesis. *Science signaling* 5, 219, ra30.
- [119] Shukla, S., Allam, U. S., Ahsan, A., et al. 2014. KRAS protein stability is regulated through SMURF2: UBCH5 complex-mediated  $\beta$ -TrCP1 degradation. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 16, 2, 115–128.
- [120] Moon, B.-S., Jeong, W.-J., Park, J., et al. 2014. Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Journal of the National Cancer Institute* 106, 2, djt373.
- [121] Cha, P.-H., Cho, Y.-H., Lee, S.-K., et al. 2016. Small-molecule binding of the axin RGS domain promotes  $\beta$ -catenin and Ras degradation. *Nature chemical biology* 12, 8, 593–600.
- [122] Slattery, M. L., Mullany, L. E., Sakoda, L. C., et al. 2018. The PI3K/AKT signaling pathway: Associations of miRNAs with dysregulated gene expression in colorectal cancer. *Molecular carcinogenesis* 57, 2, 243–261.
- [123] Fensterer, H., Giehl, K., Buchholz, M., et al. 2004. Expression profiling of the influence of RAS mutants on the TGFB1-induced phenotype of the pancreatic cancer cell line PANC-1. *Genes, chromosomes & cancer* 39, 3, 224–235.
- [124] Shi, X. H., Liang, Z. Y., Ren, X. Y., et al. 2009. Combined silencing of K-ras and Akt2 oncogenes achieves synergistic effects in inhibiting pancreatic cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Therapy* 16, 3, 227.
- [125] Lammert, A. *Charakterisierung der molekularen Mechanismen der K-Ras/Akt-regulierten Motilität sowie der Funktion von Akt-Effektoren in Karzinomzelllinien mit onkogenem K-Ras*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität.
- [126] Elola, M. T., Ferragut, F., Cárdenas Delgado, V. M., et al. 2014. Expression, localization and function of galectin-8, a tandem-repeat lectin, in human tumors. *Histology and histopathology* 29, 9, 1093–1105.



- [127] Jahangiri, A., Weiss, W. A. 2013. It takes two to tango: Dual inhibition of PI3K and MAPK in rhabdomyosarcoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 21, 5811–5813.
- [128] Roux, P. P., Shahbazian, D., Vu, H., et al. 2007. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J. Biol. Chem.* 282, 19, 14056–14064.
- [129] Mendoza, M. C., Er, E. E., Blenis, J. 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends in biochemical sciences* 36, 6, 320–328.
- [130] Hadari, Y. R., Arbel-Goren, R., Levy, Y., et al. 2000. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *Journal of cell science* 113 (Pt 13), 2385–2397.
- [131] Levy, Y., Auslender, S., Eisenstein, M., et al. 2006. It depends on the hinge: a structure-functional analysis of galectin-8, a tandem-repeat type lectin. *Glycobiology* 16, 6, 463–476.
- [132] Diskin, S., Chen, W.-S., Cao, Z., et al. 2012. Galectin-8 promotes cytoskeletal rearrangement in trabecular meshwork cells through activation of Rho signaling. *PLoS one* 7, 9, e44400.
- [133] Cárcamo, C., Pardo, E., Oyanadel, C., et al. 2006. Galectin-8 binds specific beta1 integrins and induces polarized spreading highlighted by asymmetric lamellipodia in Jurkat T cells. *Experimental Cell Research* 312, 4, 374–386.
- [134] Arboleda, M. J., Lyons, J. F., Kabbinnavar, F. F., et al. 2003. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer research* 63, 1, 196–206.
- [135] Noske, A., Kaszubiak, A., Weichert, W., et al. 2007. Specific inhibition of AKT2 by RNA interference results in reduction of ovarian cancer cell proliferation: increased expression of AKT in advanced ovarian cancer. *Cancer letters* 246, 1-2, 190–200.
- [136] Attoub, S., Arafat, K., Hammadi, N. K., et al. Akt2 knock-down reveals its contribution to human lung cancer cell proliferation, growth, motility, invasion and endothelial cell tube formation. *Scientific reports* 5, 12759. DOI=10.1038/srep12759.
- [137] Tanimura, S., Takeda, K. 2017. ERK signalling as a regulator of cell motility. *Journal of biochemistry* 162, 3, 145–154.
- [138] Zimmermann, G., Papke, B., Ismail, S., et al. 2013. Small molecule inhibition of the KRAS-PDEδ interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* 497, 7451, 638–642.
- [139] Shima, F., Yoshikawa, Y., Ye, M., et al. 2013. In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 20, 8182–8187.
- [140] Berndt, N., Hamilton, A. D., Sebt, S. M. 2011. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 11, 11, 775–791.
- [141] Marom, M., Haklai, R., Ben-Baruch, G., et al. 1995. Selective inhibition of Ras-dependent cell growth by farnesylthiosalicylic acid. *J. Biol. Chem.* 270, 38, 22263–22270.
- [142] Lyons, J. F., Wilhelm, S., Hibner, B., et al. 2001. Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocrine-related cancer* 8, 3, 219–225.
- [143] Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., et al. 2004. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral anti-tumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer research* 64, 19, 7099–7109.
- [144] Lito, P., Rosen, N., Solit, D. B. 2013. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nature Medicine* 19, 11, 1401–1409.
- [145] Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., et al. 2010. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464, 7287, 431–435.
- [146] Engelman, J. A., Chen, L., Tan, X., et al. 2008. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nature Medicine* 14, 12, 1351–1356.
- [147] Gilmartin, A. G., Bleam, M. R., Groy, A., et al. 2011. GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 5, 989–1000.
- [148] Morris, E. J., Jha, S., Restaino, C. R., et al. 2013. Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer discovery* 3, 7, 742–750.
- [149] Laderach, D. J., Gentilini, L., Jaworski, F. M., et al. 2013. Galectins as new prognostic markers and potential therapeutic targets for advanced prostate cancers. *Prostate cancer* 2013, 519436.
- [150] Schulz, H., Schmoekel, E., Kuhn, C., et al. 2017. Galectins-1, -3, and -7 Are Prognostic Markers for Survival of Ovarian Cancer Patients. *International journal of molecular sciences* 18, 6.

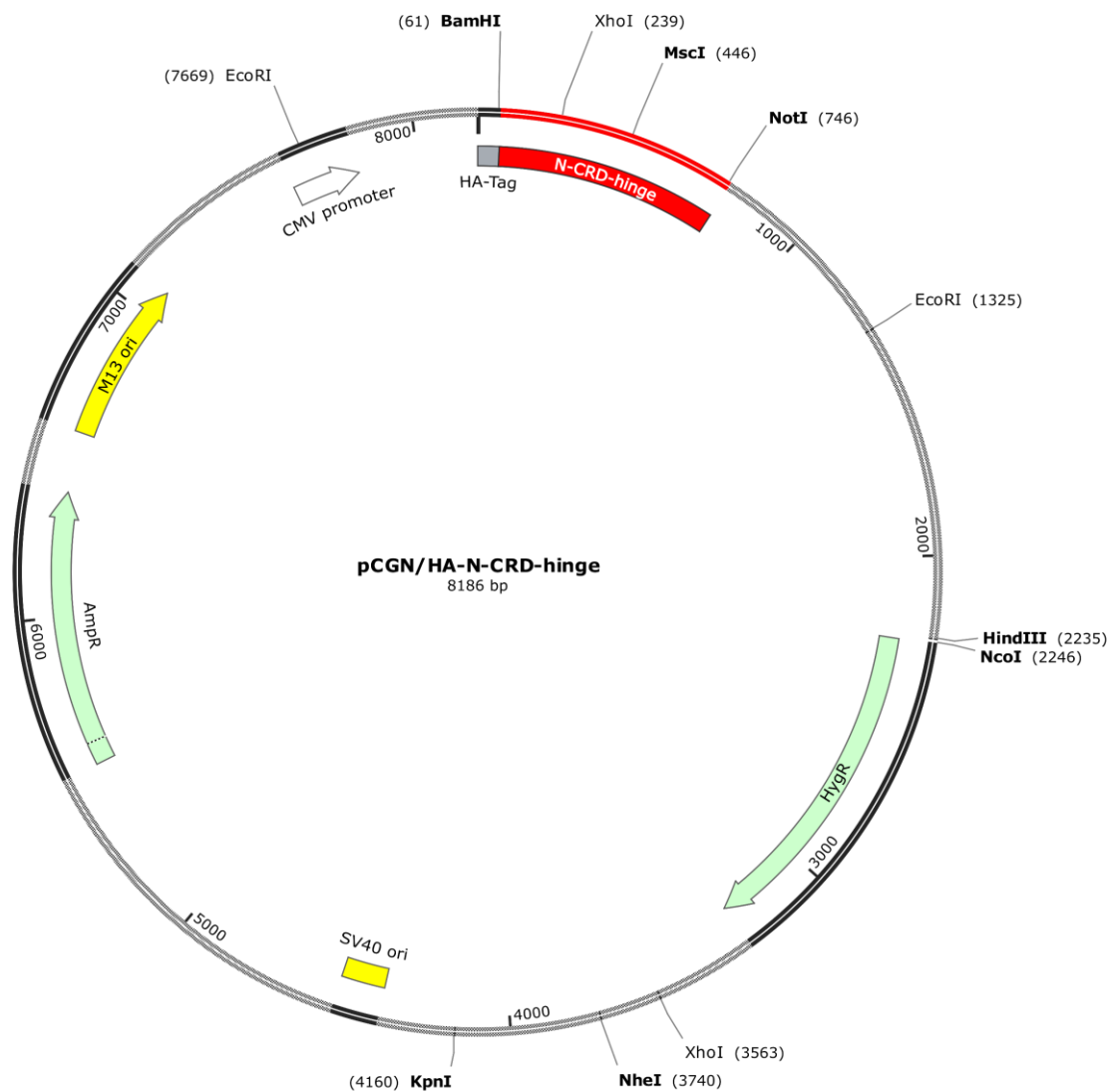
- [151] Szöke, T., Kayser, K., Trojan, I., et al. 2007. The role of microvascularization and growth/adhesion-regulatory lectins in the prognosis of non-small cell lung cancer in stage II. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 31, 5, 783–787.
- [152] Kosacka, M., Piesiak, P., Kowal, A., et al. 2011. Galectin-3 and cyclin D1 expression in non-small cell lung cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 30, 101.
- [153] Su, Z. Z., Lin, J., Shen, R., et al. 1996. Surface-epitope masking and expression cloning identifies the human prostate carcinoma tumor antigen gene PCTA-1 a member of the galectin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14, 7252–7257.
- [154] Pardo, E., Cárcamo, C., Uribe-San Martín, R., et al. 2017. Galectin-8 as an immunosuppressor in experimental autoimmune encephalomyelitis and a target of human early prognostic antibodies in multiple sclerosis. *PloS one* 12, 6, e0177472.
- [155] Wdowiak, K., Francuz, T., Gallego-Colon, E., et al. 2018. Galectin Targeted Therapy in Oncology: Current Knowledge and Perspectives. *International journal of molecular sciences* 19, 1.
- [156] Vuong, L., Kouverianou, E., Rooney, C. M., et al. 2019. An Orally Active Galectin-3 Antagonist Inhibits Lung Adenocarcinoma Growth and Augments Response to PD-L1 Blockade. *Cancer research* 79, 7, 1480–1492.
- [157] U.S. National Library of Medicine. 2019. *Galectin Studies Overview*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=galectin&cntry=&state=&city=&dist=>. Accessed 5 January 2020.
- [158] GSL Biotech. 2019. *SnapGene*. GSL Biotech.

## 8. Anhang

### 8.1 Plasmide

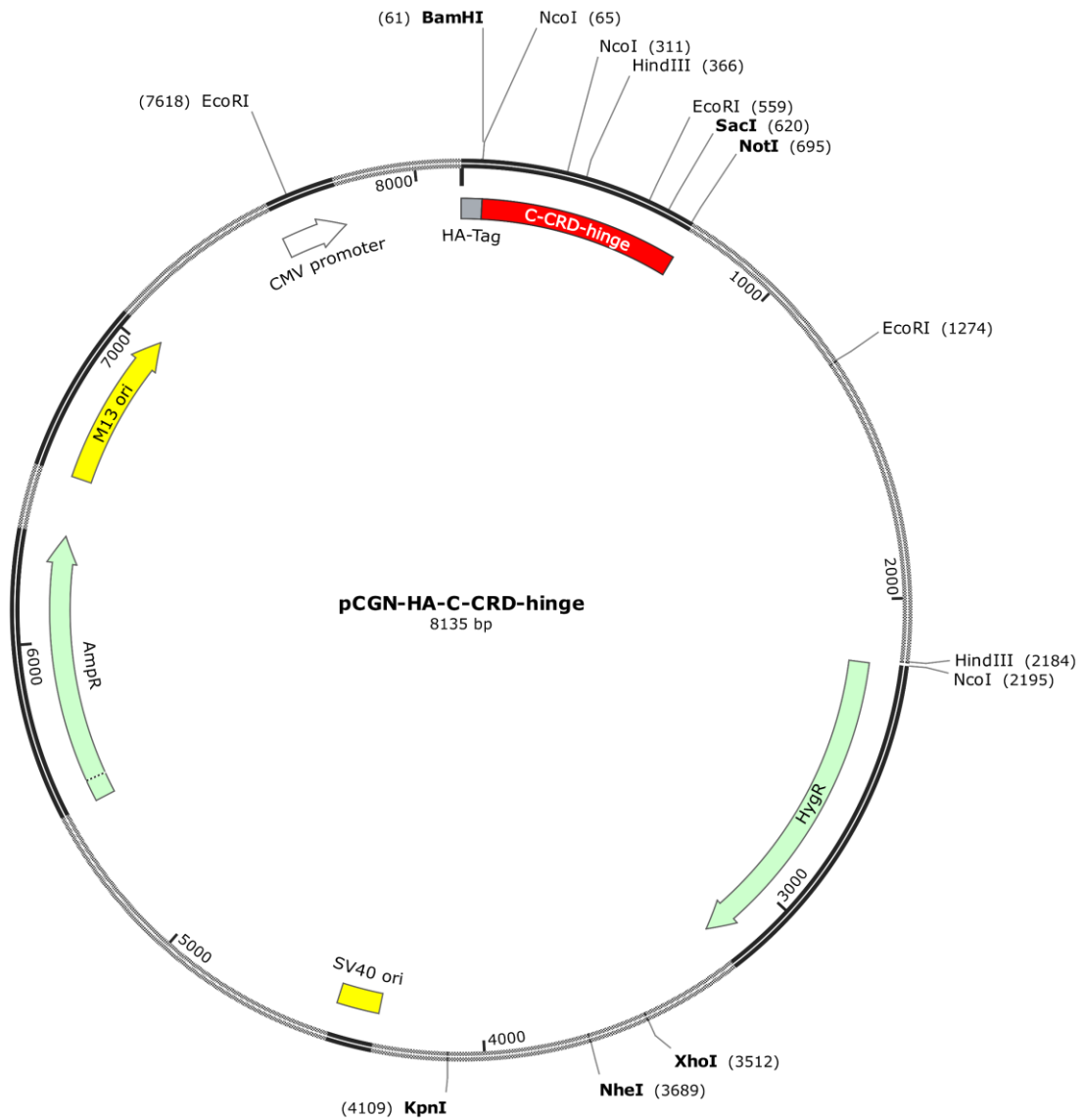
Im Folgenden finden sich alle in dieser Arbeit erzeugten Plasmide mit ihren spezifischen Restriktionsschnittstellen, sowie essentiellen strukturellen Merkmalen, wie zum Beispiel ein EGFP-Tag oder eine Antibiotika Resistenz. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die gängigsten Restriktionsenzyme dargestellt. Alle Abbildungen wurden mit SnapGene (Version 4.2.11, GSL Biotech, verfügbar unter [snapgene.com](http://snapgene.com) [158]) erstellt und liegen in digitaler Form dieser Arbeit bei.

#### 8.1.1 pCGN/HA-N-CRD-hinge



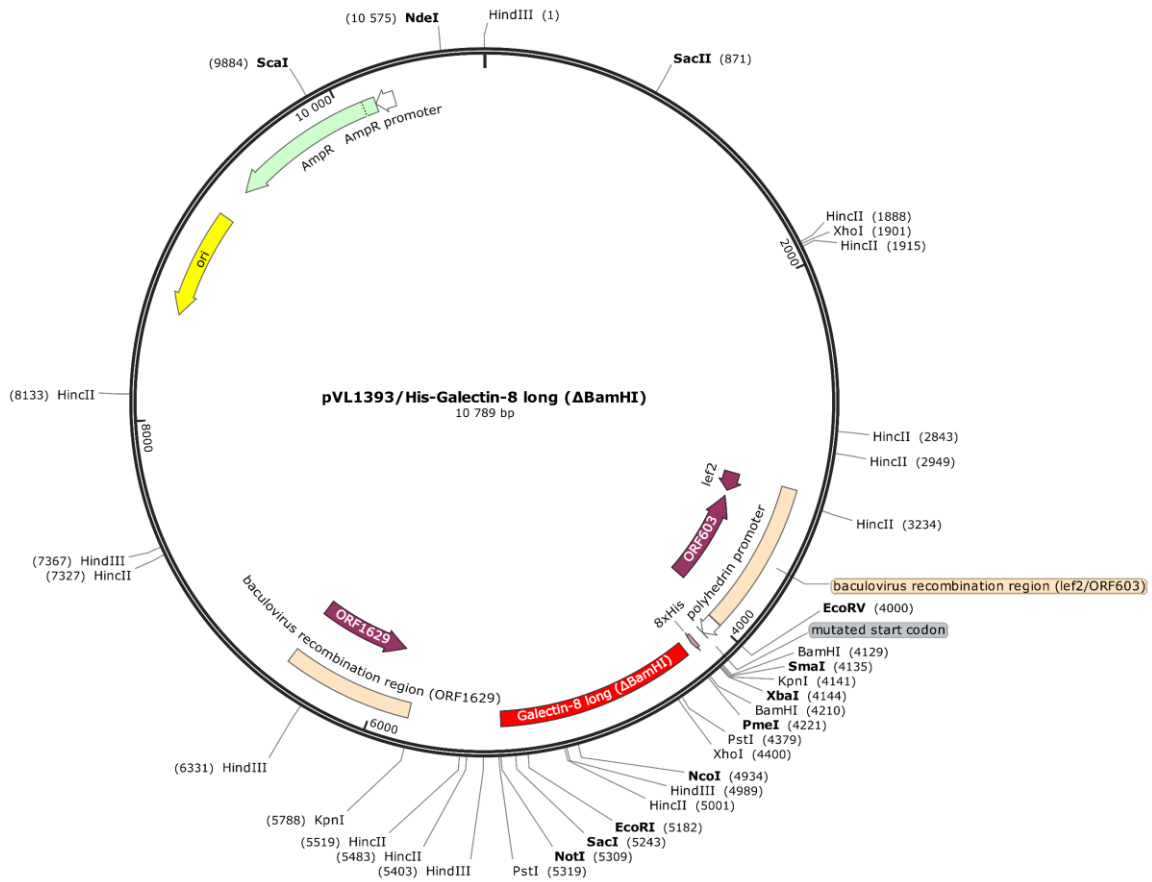
**Abb. 8.1: Das Plasmid pCGN/HA-N-CRD-hinge.** Die N-CRD-hinge wurde mit Hilfe von spezifischer Primer (Tab. 9) aus dem Plasmid pSNAPf/Galectin-8 long (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Klaudia Giehl) erzeugt und über *Bam*HI/*Not*I-Schnittstellen in den *Bam*HI/*Not*I gespaltenen pCGN-Vektor ligiert.

### 8.1.2 pCGN/HA-C-CRD-hinge



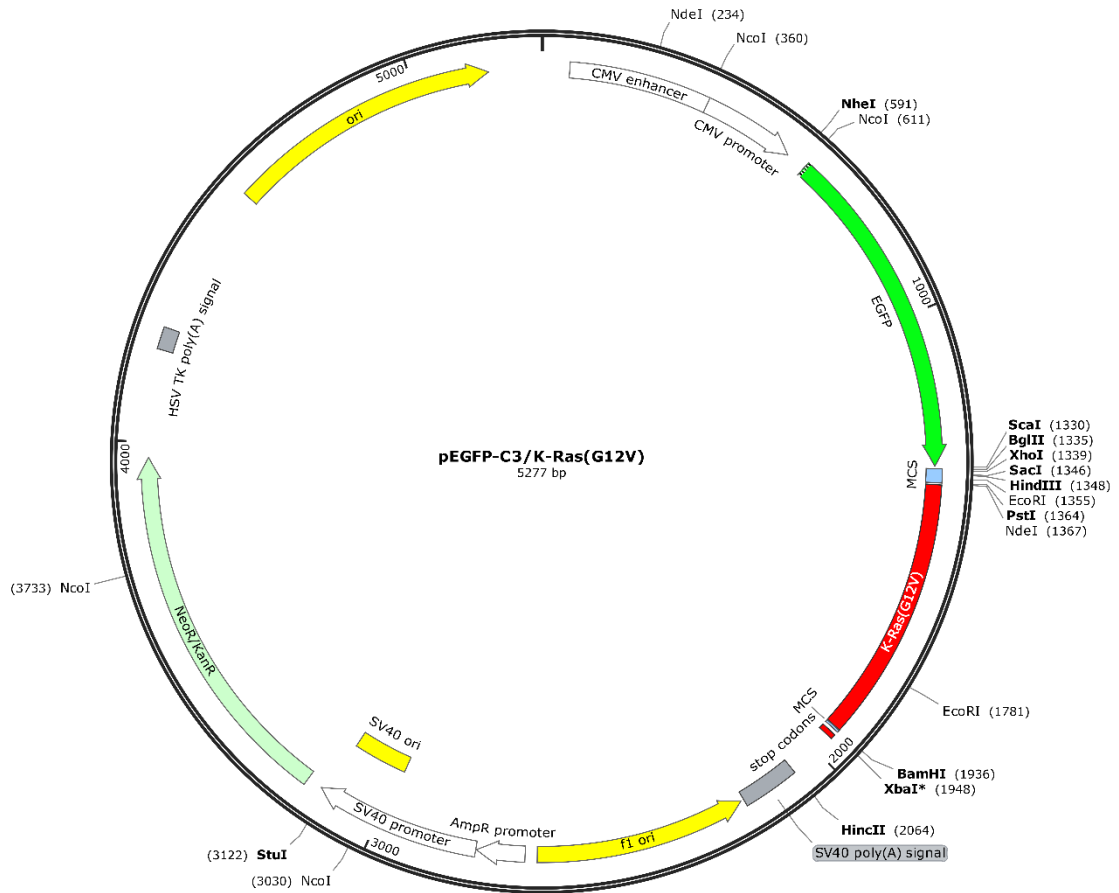
**Abb. 8.2: Das Plasmid pCGN/HA-C-CRD-hinge.** Mittels spezifischer Primer (Tab. 9) wurde die C-CRD-hinge aus dem pSNAPf/Galektin-8 *long* per PCR erzeugt. Die anschließende Ligation in erfolgte nach *Bam*HI/*Not*I-Restriktion des PCR-Fragmentes und des Vektors.

### 8.1.3 pVL1393/His-Galectin-8 long



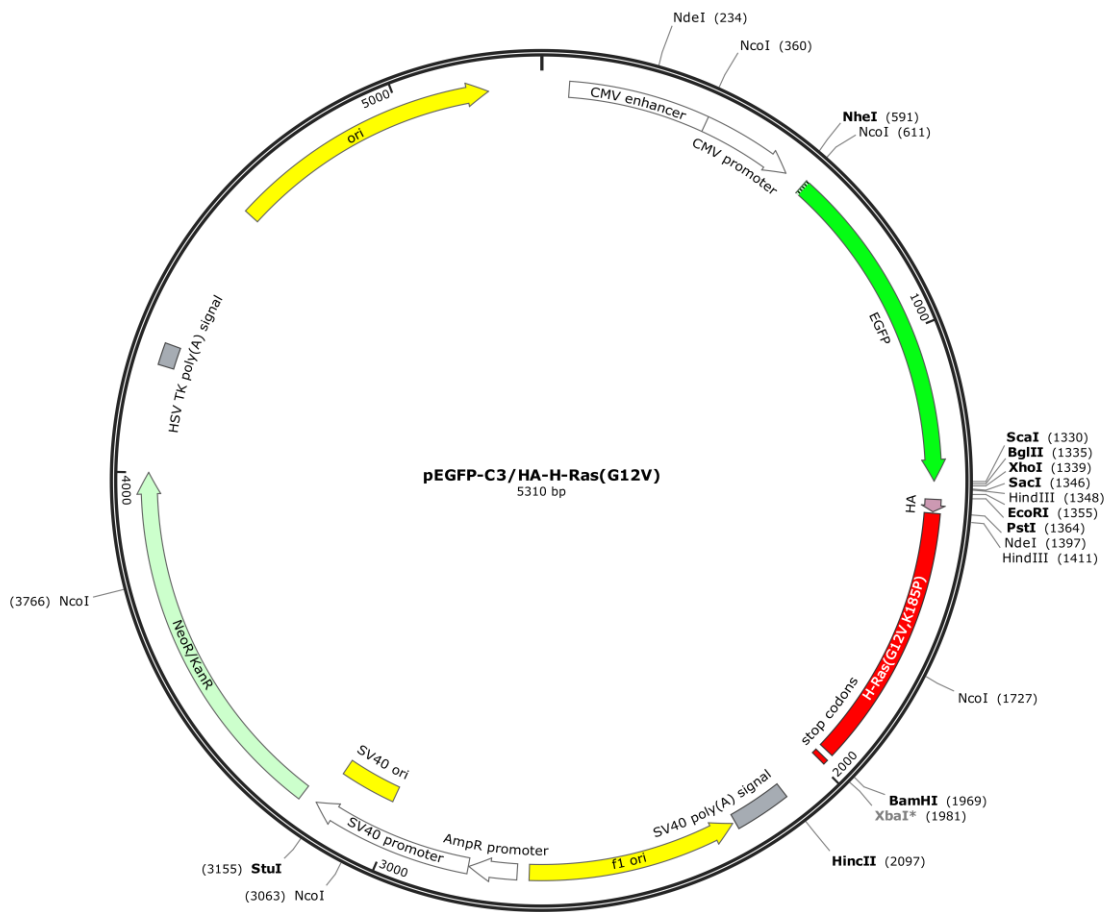
**Abb. 8.3: Das Plasmid pVL1393/His-Galectin-8 long.** Das Plasmid pVL1393/HA-Galectin-8 long (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Klaudia Giehl) wurde über *in vitro*-Mutagenese und unter Verwendung spezifischer Primer (Tab. 8) zum pVL1393/His-Galectin-8 long modifiziert.

### 8.1.4 pEGFP-C3/K-Ras(G12V)



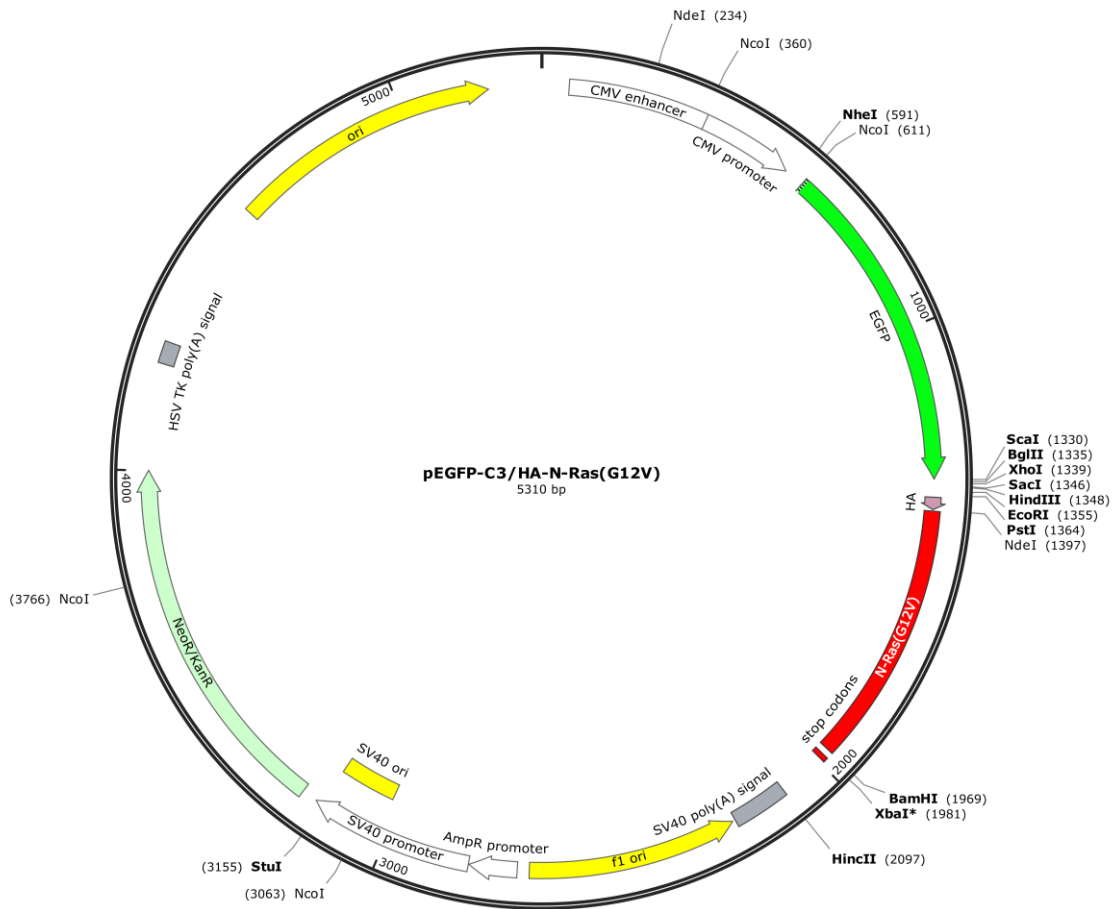
**Abb. 8.4: Das pEGFP-C3/K-Ras(G12V) Plasmid.** Die Klonierung erfolgte über Insertion einer *NdeI/BamHI*-geschnittenen K-Ras(G12V) cDNA aus einem pKS/K-Ras(G12V) Plasmid (Prof. Dr. Klaudia Giehl) in einen *NdeI/BamHI* geschnittenen pEGFP-C3 Vektor (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Klaudia Giehl).

### 8.1.5 pEGFP-C3/HA-H-Ras(G12V)



**Abb. 8.5: Das Plasmid pEGFP-C3/HA-H-Ras(G12V).** Dieses Plasmid wurde im Rahmen von vorangehenden Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe erstellt (Prof. Dr. Claudia Giehl).

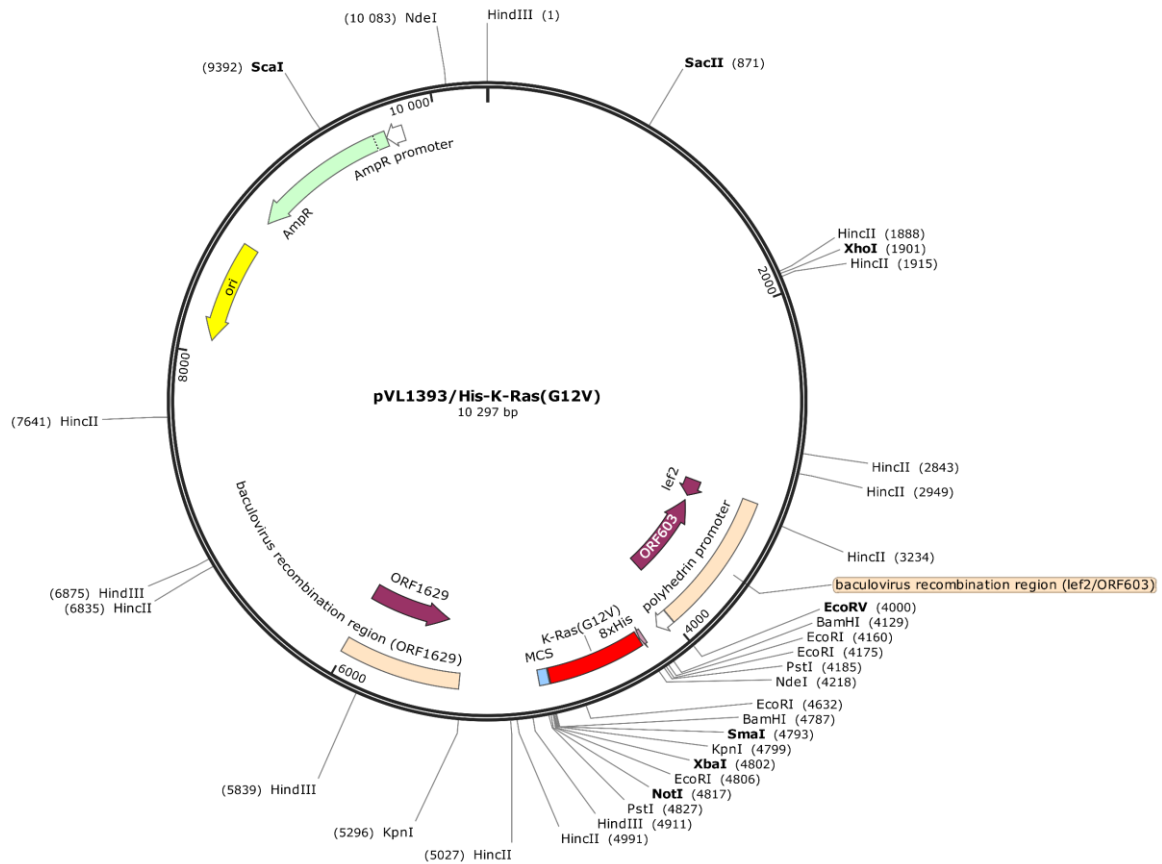
### 8.1.6 pEGFP-C3/HA-N-Ras(G12V)



**Abb. 8.6: Das Plasmid pEGFP-C3/HA-N-Ras(G12V).** Das Plasmid wurde in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl erzeugt und in dieser Arbeit verwendet.



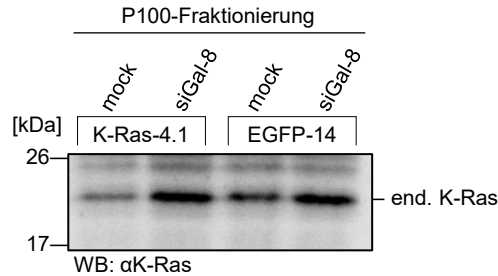
### 8.1.7 pVL1393/His-K-Ras(G12V)



**Abb. 8.7: Das Plasmid pVL1393/His-K-Ras(G12V).** Das His-K-Ras(G12V) Fragment wurde mittels PCR unter Verwendung spezifischer Primer (Tab. 9) erzeugt. Nach Restriktion des pVL1393-Vektors und des PCR-Fragmentes mit *Bam*HI wurden beide Fragmente miteinander ligiert.

## 8.2 Ergänzende Abbildungen

### 8.2.1 Einfluss des Gal-8-*knockdowns* auf den Proteingehalt von endogenem K-Ras



**Abb. 8.8: Einfluss des Gal-8-*knockdowns* auf den Proteingehalt von endogenem K-Ras.** Stabil EGFP-K-Ras(G12V)- bzw. EGFP-exprimierende PANC-1-Zellen wurden mit einer siRNA gegen Gal-8 bzw. einer Kontroll-siRNA (mock) transfiziert, nach 72 Stunden lysiert und eine Präparation von partikulären (P100) Proteinen bei Zentrifugation mit 100000 x g durchgeführt. 25 µg der P100-Fractionen wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, geblottet und mit Hilfe spezifischer Antikörper endogenes K-Ras nachgewiesen. Die Abbildung zeigt den Nachweis auf endogenes K-Ras nach Transfektion einer Kontroll-siRNA im Vergleich zu einem *knockdown* von Gal-8.

## 8.3 Rohdaten

Aufgrund der großen Anzahl an Daten und der daraus resultierenden Datenmenge können dieser Arbeit nicht alle Rohdaten beigelegt werden. Auf der beigelegten Datendisk sind Zusammenstellungen aller Versuche pro Experiment in einer PowerPoint-Datei zusammengefasst. Hierbei sind die Folien der PowerPoint-Datei grün hinterlegt, wenn diese Experimente im Rahmen dieser Arbeit für die Erstellung der jeweiligen Abbildung genutzt wurden. Sollten Berechnungen durchgeführt worden sein, liegt eine entsprechende Excel-Tabelle sowie die GraphPad Prism Datei bei. Sollte Bedarf an der Einsicht von weiteren Rohdaten bestehen, sind diese bei Prof. Dr. Klaudia Giehl einzusehen.

Die Sortierung der Daten folgt der Nummerierung der einzelnen Kapitel dieser Arbeit und untergliedert sich darauffolgend in die jeweilige Nummer der Abbildung aus der vorliegenden Arbeit.

Darüber hinaus wurde die vorliegende Arbeit als PDF- und Word-Datei mit abgespeichert.

## **9. Curriculum Vitae**

Aus Datenschutzgründen wurde der Lebenslauf aus der vorliegenden Version der Dissertation entfernt.

## 10. Publikationen, Konferenzbeiträge und Auszeichnungen

- Meinohl, C., Barard, S.J., Fritz-Wolf, K., Unger, M., Porr, A., Heipel, M., Wirth, S., Madlung, J., Nordheim, A., Menke, A., Becker, K., Giehl, K. (2019): Galectin-8 binds to the Farnesylated C-terminus of K-Ras4B and Modifies Ras/ERK Signaling and Migration in Pancreatic and Lung Carcinoma Cells. *Cancers*. 20.12.2019
- Meinohl, C., Wirth, S., Heipel, M., Menke, A., Giehl, K., (2018): Identifying molecular mechanisms in the interaction of K-Ras4B and Galectin-8. Justus-Liebig-Universität Gießen: *Science Day 2018*. 16.11.2018
- Meinohl, C., Wirth, S., Heipel, M., Giehl, K., (2018): Galectin-8 interacts with K-Ras4B via the hypervariable region and influences the PI3K/AKT and Ras/ERK pathway. 22 th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): *Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes*. 05.-07.11.2018, Weimar.
- Meinohl, C. (2018) *Poster Prize 2018 for the contribution*: Galectin-8 interacts with K-Ras4B via the hypervariable region and influences the PI3K/AKT and Ras/ERK pathway. 22 th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): *Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes*. 05.-07.11.2018, Weimar.
- Munoz-Llancao, P., de Gregorio, C., Las Heras, M., Meinohl, C., Noorman, K., Boddeke, E., Cheng, X., Lezoualc'h, F., Schmidt, M., Gonzalez-Billault, C. (2017): Microtubule-regulating proteins and cAMP-dependent signaling in neuroblastoma differentiation, *Cytoskeleton*, 74, 3, 143–158.
- Meinohl, C., Wirth, S., Giehl, K., (2017): The interaction of Galectin-8 and Ras depends on two distinct lysines within the hypervariable region of Ras. 21 th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): *Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes*. 08.-10.11.2017, Weimar.
- Meinohl, C., Barnard, S.J., Wirth, S., Bier, J., Heipel, M., Giehl, K., (2017): Molecular mechanism determining the interaction of K-Ras and Galectin-8. Herbsttagung der GBM: *Molecular Basis of Life 2017*. 24.09.-27.09.2017, Bochum.
- Meinohl, C., Wirth, S., Heipel, M., Giehl, K., (2016): The posttranslational modification of small GTPases in the interaction with Galectin-8. 20 th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): *Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes*. 09.-11.11.2018, Weimar.
- Meinohl, C., Wirth, S., Heipel, M., Giehl, K., (2015): Choosing the right side: Specifying the interaction between K-Ras and Galectin-8. 19 th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): *Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes*. 02.-05.11.2018, Weimar.

## 11.Danksagung

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

Zunächst möchte ich mich besonders bei Maximilian Brell bedanken, der mir bei informatischen Fragen immer gerne und zeitnah geholfen hat und somit viele wichtige Auswertemethoden, die in dieser Arbeit genutzt wurden, sehr vereinfacht und mit mir zusammen etabliert hat. Ohne ihn würde ich vermutlich heute noch an der Auswertung meiner Daten sitzen. Dafür danke ich ihm sehr!

Des Weiteren danke ich Verena Mathes sehr herzlich dafür, dass sie die Korrektur meiner Arbeit als „Außenstehende“ übernommen hat und auch noch den letzten kleinen Verständnisfehler aus meiner Arbeit ausgemerzt hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl für Ihre hervorragende Betreuung, ihre Diskussionsbereitschaft und ihr Engagement während der letzten dreieinhalb Jahre. Die Zusammenarbeit mit Ihr war immer sehr fruchtbar und hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dammann für die Übernahme des Erstgutachtens, sowie seiner exzellenten Lehre während meiner Studienzeit. Durch seine interessante und ansprechende Vortragsweise war und bin ich immer von der Genetik begeistert.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen meinen Kollegen, vor allem aber bei Johannes Klinke, Julia Seiz, Marisa Heipel und Stefanie Wirth, die mir in den letzten Jahren immens geholfen haben und mir immer unterstützend zur Verfügung standen.

Auch möchte ich mich unbekannterweise bei Herrn Dr. rer. nat. Markus Glaß bedanken. Durch sein Script konnte eine effiziente Durchführung der Auswertung der Migrationsdaten erst ermöglicht werden. Bei Fragen stand er mir zudem immer gern und hilfreich zur Verfügung.

Zuletzt geht ein Dank an meine Eltern für die Unterstützung während den letzten neun Jahren meiner universitären Laufbahn.

## 12. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten 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 zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Gemäß § 25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmungen für modularisierte Studiengänge dulde ich eine Überprüfung der Thesis mittels Anti-Plagiatssoftware.

Samstag, 4. April 2020

---

Datum

---

Unterschrift