

Justus-Liebig-Universität Gießen
Fachbereich 11: Innere Medizin
Institut für Molekulare Onkologie solider Tumore

**Charakterisierung der Interaktion von K-Ras mit Galektin-8 und deren
Einfluss auf die Signaltransduktion von Karzinomzellen**

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

vorgelegt von
Sarah-Jane Barnard
aus Arnsberg
Gießen 2015

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Dammann
Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Klaudia Giehl

1. Einleitung	1
1.1. Ras Proteine.....	1
1.1.1. Struktur der Ras Proteine.....	3
1.1.2. Onkogene Ras Proteine.....	4
1.1.3. Posttranslationale Modifikationen der Ras Proteine.....	5
1.1.4. Ras Nanocluster.....	6
1.1.5. Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade durch H-Ras.....	7
1.1.6. Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade durch K-Ras.....	9
1.2. Galektine.....	11
1.2.1. Galektine in der Tumorbilogie.....	13
1.2.2. Galektin-1 und Galektin-3.....	14
1.2.3. Galektin-8.....	14
1.2.4. Bedeutung der Farnesyl-Bindungstaschen für die Galektin/Ras-Interaktion.....	16
1.3. Zielsetzung der Arbeit.....	18
2. Material	19
2.1. Chemikalien.....	19
2.2. Verbrauchsmaterialien.....	21
2.3. Geräte.....	22
2.4. Software.....	23
2.5. Enzyme und molekularbiologische <i>Kits</i>	23
2.6. Rekombinante Proteine.....	23
2.7. Marker für die Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.8. Marker für die SDS-PAGE.....	24
2.9. Prokaryotische und eukaryotische Zellen.....	24
2.9.1. <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	24
2.9.2. Eukaryontische Zelllinien.....	25
2.10. Primäre Antikörper.....	25
2.11. Sekundäre Antikörper.....	27
2.11.1. 680LT-gekoppelte Antikörper.....	27
2.11.2. 800CW-gekoppelte Antikörper.....	28
2.11.3. Peroxidase (-HRP) gekoppelte Antikörper.....	28
2.11.4. Alkalische Phosphatase-gekoppelte Antikörper.....	28
2.12. Inhibitoren.....	28
2.13. siRNA.....	29
2.14. Transfektionsreagenzien.....	29
2.15. Plasmide.....	30
2.15.1. Eukaryotische Expressionsvektoren.....	30
3. Methoden	31
3.1. Mikrobiologische Methoden.....	31
3.1.1. Kultivierung, Anzucht und Selektion von Bakterien.....	31
3.1.2. Herstellung kompetenter Bakterien.....	31

3.1.3. Transformation kompetenter Bakterien.....	32
3.1.4. Plasmidisolierung.....	32
3.1.5. Bestimmung der DNA-Konzentration.....	32
3.1.6. Klonierung von Plasmidkonstrukten.....	33
3.1.7. DNA-Restriktion.....	33
3.1.8. Agarose-Gelelektrophorese.....	34
3.1.9. Gelextraktion.....	34
3.1.10. Ligation.....	35
3.2. Zellbiologische und proteinbiochemische Methoden.....	35
3.2.1. Anzucht, Kultivierung und Lagerung eukaryotischer Zellen.....	35
3.2.2. Auftauen eukaryotischer Zellen.....	36
3.2.3. Passagieren eukaryotischer Zellen.....	36
3.2.4. Einfrieren eukaryotischer Zellen.....	36
3.2.5. Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.....	37
3.2.6. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen.....	37
3.2.7. Herstellung von Zelllysaten.....	38
3.2.8. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels <i>Bicinchoninic-Acid Protein Assay</i> (BCA).....	39
3.2.9. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
3.2.10. Coomassie-Färbung.....	41
3.2.11. <i>Immunoblotting</i> von Proteinen.....	41
3.2.12. Proteindetektion mit spezifischen Antikörpern.....	42
3.2.13. Elution gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran.....	44
3.2.14. Immunpräzipitation.....	44
3.2.15. Ko-Immunpräzipitation von Proteinkomplexen mittels des <i>μMACS™ GFP</i> <i>Isolation Kits</i>	45
3.2.16. Präparation von partikulären und löslichen Proteinen.....	47
3.2.17. <i>Wounding-Assay</i>	48
3.2.18. Inhibierung von Kinasen verschiedener Signaltransduktionswege und deren Einfluss auf die Proteinexpression von Galektin-1, -3 und -8.....	49
3.2.19. Strukturanalyse.....	49
3.3. Statistik.....	50
4. Ergebnisse.....	51
4.1. Expression von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 in Lungenkarzinomzellen....	51
4.2. Klonierung von Galektin-8 long und Galektin-8 short.....	54
4.2.1. Ektope Expression von ECFP-Galektin-8 long und ECFP-Galektin-8 short in PANC-1 Zellen.....	57
4.3. Lokalisation von Galektin-8 in PANC-1 Zellen.....	59
4.3.1. Lokalisationsanalyse im Immunoblotverfahren nach Präparation von partikulären und löslichen Proteinen.....	59
4.3.2. Lokalisationsanalyse mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	60
4.4. Charakterisierung der K-Ras Interaktion mit Galektin-8 und Galektin-3.....	63
4.4.1. Ko-Immunpräzipitationsstudien von K-Ras mit endogenem Galektin-8 und endogenem Galektin-3 in PANC-1 Zellen.....	63

4.4.2. Ko-Immünpräzipitation von farnesyldefizienten K-Ras Mutanten mit Galektin-3 in HEK293 Zellen.....	69
4.4.3. Ko-Immünpräzipitation von farnesyldefizienten K-Ras Mutanten mit Galektin-8 short und Galektin-8 long in HEK293 Zellen.....	71
4.4.4. Charakterisierung der Bindung von Galektin-8 und Galektin-3 an K-Ras(G12V) in PANC-1 Zellen.....	74
4.4.4.1. siRNA-vermittelte Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression in PANC-1 Zellen.....	75
4.4.4.2. Ko-Immünpräzipitationen von EGFP-K-Ras(G12V) mit Galektin-8 und Galektin-3.....	78
4.5. Struktureller Vergleich der N-terminalen und C-terminalen Galektin-8 CRD mit der Galektin-3 CRD.....	80
4.6. Einfluss von pharmakologischen Inhibitoren auf die Proteinexpression von Galektin-8, Galektin-3 und Galektin-1 in PANC-1 Zellen.....	84
4.7. Einfluss von Galektin-8 und Galektin-3 auf die Aktivität von Akt1/2 und ERK1/2 in PANC-1 Zellen.....	88
4.7.1. Einfluss einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression auf die Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2 in PANC-1 Zellen.....	88
4.7.2. Einfluss einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression auf die K-Ras(G12V)-vermittelte Akt Phosphorylierung in PANC-1 Zellen.....	91
4.7.3. Einfluss einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 Expression auf die Phosphorylierung von Akt und in A549 und A427 Lungenkarzinomzellen.....	93
4.7.4. Einfluss einer ektopen Galektin-8 Expression auf die K-Ras(G12V)-vermittelte Phosphorylierung von ERK1/2 in PANC-1 Zellen.....	97
4.8. Einfluss von Galektin-8 auf die Migration in PANC-1 Zellen.....	100
5. Diskussion.....	106
5.1. Interaktion von K-Ras(G12V) mit Galektin-8 und Galektin-3 in PANC-1 Zellen...	106
5.2. Strukturelle Analyse möglicher hydrophober Bindungstaschen in der N-terminalen und C-terminalen Galektin-8 CRD.....	109
5.3. Regulierung des Galektin-8 Proteingehalts in PANC-1 Zellen.....	110
5.4. Aktivierung von Akt2 und ERK1/2 durch Inhibierung der Galektin-8 Proteinexpression in PANC-1 Zellen.....	112
5.5. Einfluss von Galektin-8 auf die Migration von PANC-1 Zellen.....	116
5.6. Lokalisation von Galektin-8 und K-Ras(G12V) in PANC-1 Zellen mittels Immunoblot- und fluoreszenzmikroskopischer Analyse.....	117
6. Zusammenfassung/Abstract.....	119
7. Literaturverzeichnis.....	123
8. Anhang.....	139

9. Danksagung.....	143
10. Konferenzbeiträge.....	144

Abkürzungen

α	alpha
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Akt	Synonym für PKB
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Arf	<i>ADP-ribosylation factor</i>
AS	Aminosäure
ATCC-Nr.	<i>American Type Culture Collection Number</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
β	beta
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	kodierende DNA
cm	Zentimeter
CMF-PBS	Calcium- und Magnesium-freie Phosphat- gepufferte Saline
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
d. h.	das heißt
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleionsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithio-DL-threit(ol)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Abkürzungen

EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> - tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fötales Bovines Serum
FT	Farnesyltransferase
FTS	Farnesylthiosalizylsäure
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guaninbase-bindendes Sequenzelement
Gal-1	Galektin-1
Gal-3	Galektin-3
Gal-8	Galektin-8
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCPR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GDI	GDP-Dissoziations-Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Influenza-Virus-Hämagglutinin-12CA5-Epitop
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G

Abkürzungen

Ile	Isoleucin
IP	Immunpräzipitation
JNK	<i>c-jun NH₂-terminal protein kinase</i>
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
LB-Medium	Lysogeny-Broth-Medium
Leu	Leucin
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
M	molar (mol pro Liter)
m/V	Masse pro Volumen
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MEK	<i>MAPK/ERK-kinase</i>
MEM	<i>Minimum Essential Media</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
mk	monoklonal
MKP	MAPK Phosphatasen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP40	Nonidet P40
NSCLC	<i>non-small-cell lung cancer</i>

Abkürzungen

OD	optische Dichte
p38	<i>38 kDa protein kinase</i>
p53	<i>cellular tumor antigen p53</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PH-Domäne	<i>pleckstrin homology domain</i>
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
pk	polyklonal
PKB	Proteinkinase B
PM	Phosphat- und Magnesium-bindendes Sequenzelement
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
Rab	<i>Ras-like protein in brain</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ran	<i>Ras-like nuclear</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
rek.	rekombinant
Rho	<i>Ras homologous</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptor-Trosin-Kinase
s.	siehe
S6	ribosomales Protein S6 (Komponente der 40S ribosomalen Untereinheit)
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Ser	Serin
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>

Abkürzungen

siRNA	<i>small interference RNA</i>
t	Zeitpunkt
T	Threonin
Tab.	Tabelle
TAE	Trisacetat
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit 0,1 % Tween [®] 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton [™] X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Trp	Tryptophan
Tween [®] 20	Polyoxymethylensorbitan-monolaurat
Tyr	Tyrosin
U	<i>Units</i>
u.a.	unter anderem
ÜN	Über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
VF	Verdünnungsfaktor
VT	Volumenteil
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Ras Proteine

Die Ras (*rat sarcoma*) Superfamilie der monomeren GTPasen umfasst mehr als 150 humane Mitglieder und wird aufgrund ähnlicher Sequenzen und Funktionen in 5 Subfamilien eingeteilt: Ras, Rho (*Ras homologous*), Ran (*Ras-like nuclear*), Arf (*ADP-ribosylation factor*) und Rab (*Ras-like proteins in brain*) (Vetter und Wittinghofer, 2001; Colicelli, 2004). Die Subfamilie der Ras Proteine, die auch Namensgeber der Ras-Superfamilie ist, beinhaltet 36 Mitglieder (Repasky *et al.*, 2004).

Die Aufnahme von Signalen und Reizen mittels Rezeptoren sowie deren Weiterleitung in das Zellinnere ist für einen Organismus von sehr großer Bedeutung. Ras Proteine sind membranassoziierte, Guanosinnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) und spielen bei der Kopplung von membranständigen Rezeptoren an intrazelluläre Signalkaskaden eine bedeutende Rolle. Die größte Familie der membranständigen Rezeptoren umfasst die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) bilden eine weitere Familie von Transmembranproteinen, die als Rezeptoren über den Extrazellulärbereich spezifisch mit ihren Liganden interagieren und als Kinasen Substratproteine phosphorylieren und somit zur Signalweiterleitung beitragen (Schartl *et al.*, 2009).

Ras-Proteine fungieren, wie in Abbildung 1.1 dargestellt, als molekulare Schalter. Sie können in zwei Konformationen vorliegen: in der Guanosindiphosphat (GDP) gebundenen inaktiven und in der Guanosintriphosphat (GTP) gebundenen aktiven Form. *Guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) katalysieren den Austausch von GDP gegen GTP und aktivieren Ras. GEFs selbst werden durch Interaktion mit Oberflächenrezeptoren wie z.B. RTKs oder GPCRs aktiviert. Die *GTPase-activating proteins* (GAPs) hingegen erhöhen die intrinsische GTPase-Aktivität, was zu einer beschleunigten Hydrolyse zu GDP führt und Ras wieder inaktiviert (Bourne *et al.*, 1990; Hall, 1990; Takai *et al.*, 1992; Takai *et al.*, 2001).

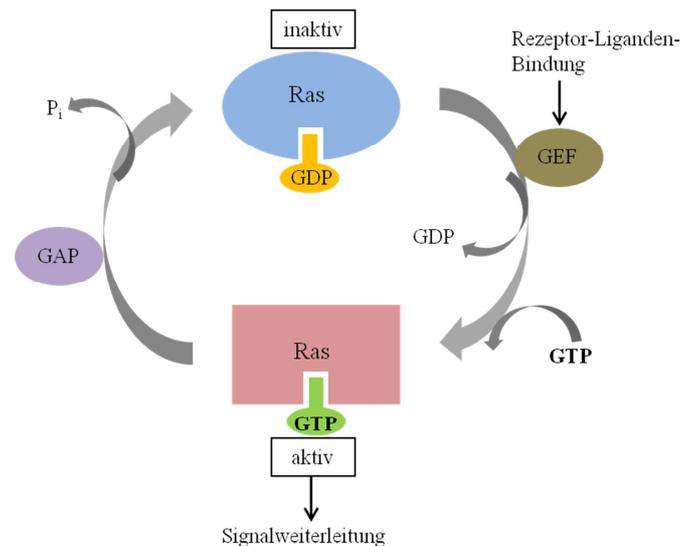


Abb. 1.1: Der Ras-GDP/GTP-Zyklus. Ras Proteine sind in ihrem inaktiven Zustand (blau) an GDP und in ihrem aktiven Zustand (rot) an GTP gebunden. Der Austausch von GDP zu GTP wird durch GEFs (braun) stimuliert, die ihrerseits nach Rezeptor-Liganden-Bindung und Rezeptoraktivierung aktiviert werden. Aktives Ras kann mit nachgeschalteten Effektorproteinen interagieren und somit zur Signalweiterleitung beitragen. Die Ras Inaktivierung wird durch GAPs (lila) gesteuert, die GTPasen stimulieren, die die Hydrolyse von GTP zu GDP katalysieren.

Im aktiven, GTP-gebundenen Konformationszustand sind Ras Proteine in der Lage mit *downstream* Effektorproteinen zu interagieren und nachgeschaltete zelluläre Signalproteine zu aktivieren bzw. Signale weiterzuleiten (Herrmann *et al.*, 2003). Zu den am besten untersuchten Effektorproteinen zählen die Proteinkinase C ξ (Diaz-Meco *et al.*, 1994), Rin1 (Han und Colicelli, 1995), AF-6 (Kuriyama *et al.*, 1995), Nore1/RASSF (Vavas *et al.*, 1998), RalGEF (Wolthius *et al.*, 1998; Gonzalez-Garcia *et al.*, 2005), Raf-Kinasen (Dhillon *et al.*, 2002) und Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) (Wymann *et al.*, 2003). Durch die Interaktion von Ras mit seinen unterschiedlichen Effektoren werden zahlreiche biologische Prozesse wie Genexpression, Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose reguliert (Martin und Blenis, 2002; Wymann *et al.*, 2003; Giehl, 2005; Wennerberg *et al.*, 2005). Weitere Funktionen von Ras umfassen die Kontrolle der Zellmorphologie und die Regulation der Migration und Zellmotilität (Downward, 1998; Giehl, 2005). Durch die Aktivierung von Ras kommt es auch zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts, bei der die Zelladhäsion deutlich reduziert sowie die Aktivität von Matrixmetalloproteasen erhöht wird (Wells, 2000; Giehl, 2005).

Fehlgulierungen der Ras Proteine durch Mutationen können eine zelluläre Transformation zur Folge haben (Goodsell, 1999). Andere Familienmitglieder wie Rin1 oder RASSF1A scheinen nicht als Onkogene, sondern als Tumorsuppressoren zu wirken (Colicelli, 2004; Karnoub und Weinberg, 2008).

1.1.1. Struktur der Ras Proteine

Im menschlichen Genom wurden 3 ubiquitär exprimierte *ras* Gene identifiziert: *H-ras* (Chromosom 11; 11p15-p15.5), *N-ras* (Chromosom 1; 1p22-p32) und *K-ras* (Chromosom 12; 12p12.1-pter). Durch alternatives Spleißen der Exons IV A und IV B kodiert das *K-ras* Gen für die Proteinisoformen K-Ras4A und K-Ras4B, welche sich in 25 Aminosäuren (AS) unterscheiden (Barbacid, 1987; Khosravi-Far *et al.*, 1998). Humane Zellen exprimieren kaum K-Ras4A (Shimizu *et al.*, 1983). Deshalb wird K-Ras4B nachfolgend als K-Ras bezeichnet. H-, N- und K-Ras4A sind aus 189 Aminosäuren aufgebaut, während K-Ras4B aus nur 188 Aminosäuren besteht. Alle 4 Ras Proteine besitzen eine Molekularmasse von 21 kDa. Bezüglich ihrer Aminosäuresequenz weisen die unterschiedlichen Ras Isoformen eine hohe Homologie auf. Wie der Abbildung 1.2 entnommen werden kann, sind die Aminosäuren 1-85 identisch und die Aminosäuren 86-165 zeigen eine 85 %ige Identität. Innerhalb dieser Sequenz wurden 8 hoch konservierte Domänen gefunden. Die Aminosäuren an den Positionen 10-17, 35 und 57-61 bilden 3 Phosphat- und Magnesium-bindende Bereiche (PM1-3). Drei Guaninbase-bindende Sequenzelemente (G1-3) konnten an den Positionen 28, 116-119 und 145-147 identifiziert werden. Mit *Switch I* (AS 30-36) bzw. *Switch II* (AS 60-67) wurden 2 Regionen lokalisiert, die mit RasGAPs und Effektoren bzw. mit RasGEFs interagieren. Durch die Bindungen von GDP bzw. GTP kommt es zu einer Konformationsänderung der Ras Proteine (Wittinghofer und Waldmann, 2000). Der C-Terminus der Ras Proteine, der für die subzelluläre Lokalisierung verantwortlich ist, erstreckt sich bei H-, N- und K-Ras4A von Aminosäure 166-189 bzw. 166-188 bei K-Ras4B. Innerhalb dieser hypervariablen Domäne weisen die Aminosäuresequenzen der Ras Isoformen eine Identität von nur 4 % auf. Die letzten 4 Aminosäuren einer jeden Ras Isoform bilden das sogenannte CAAX Motiv. Dabei handelt es sich um ein Cystein, 2 aliphatische Aminosäuren und eine beliebige Aminosäure.

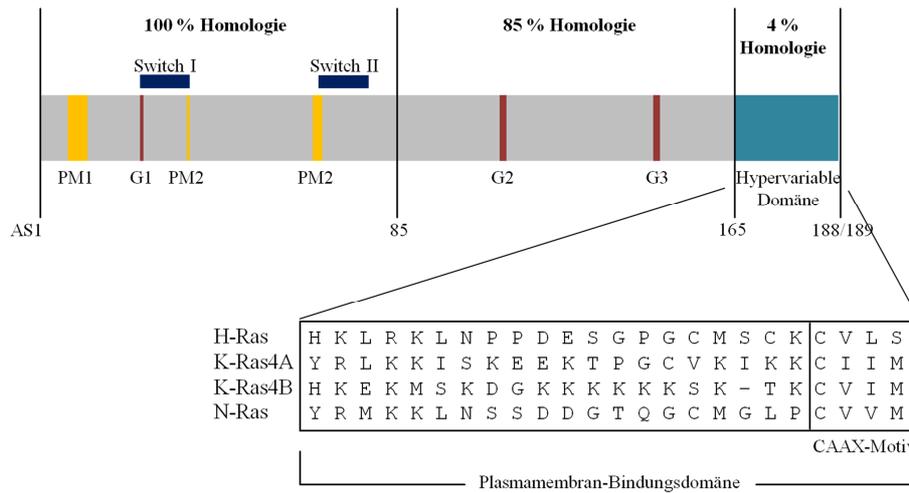


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Ras Primärstruktur. Die Aminosäuren 1-85 zeigen in allen Ras Isoformen eine 100 %ige Homologie. Innerhalb dieses Abschnittes befinden sich 2 *Switch* Domänen, 3 Phosphat- und Magnesium-bindenden Sequenzelemente (PM1-3) und ein Guaninbase-bindendes Sequenzelement (G1). Die Aminosäuresequenz von Position 86-165 ist zu 85 % homolog. Dort befinden sich die Domänen G2 und G3. Die Aminosäuren 166-188/189 werden als hypervariable Domäne bezeichnet und weisen eine Sequenzhomologie von nur 4 % auf. Dieser Bereich spielt eine bedeutende Rolle für die posttranslationalen Modifizierungen und somit bei der Ras Lokalisation innerhalb der Plasmamembran (verändert nach Hancock J.F., 2003: Ras proteins: different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 373-384).

1.1.2. Onkogene Ras Proteine

Onkogene Mutationen in *ras* treten in etwa 30 % aller humanen Tumoren auf. Aktivierende Punktmutationen wurden in allen 3 *ras* Genen gefunden, jedoch mit unterschiedlichen Mutationsraten (Downward, 2003). Dabei weist H-*ras* die niedrigste und K-*ras* die höchste Mutationsrate auf. Die Mutationen sind gewebs- und tumorspezifisch und betreffen normalerweise nur ein *ras*-Gen. Diese Punktmutationen betreffen die Kodons 12, 13 oder 61. In den meisten Tumoren tritt eine Mutation in Kodon 12 auf, was zu einem Austausch der Aminosäure Glyzin gegen Serin, Cystein, Arginin, Asparagin, Alanin oder Valin führt (Krontiris und Cooper, 1981; Perucho *et al.*, 1981; Shih und Weinberg, 1982; Bos, 1989; Chang *et al.*, 2009). Dadurch wird die intrinsische und GAP-katalysierte GTPase Aktivität gestört, so dass Ras im aktiven, GTP-gebundenen Zustand gehalten wird (Scheffzek *et al.*, 1997). Dies führt zu einer konstitutiven Aktivität von *downstream* Signalkaskaden (Bos, 1989; Malumbres und Barbacid, 2003; Schubert *et al.*, 2007). Onkogenes K-Ras fördert die Migration und Invasion von Pankreaskarzinom- und Nierenepithelzellen und destabilisiert die Zell-Zelladhäsion (Giehl *et al.*, 2000, Staehle *et al.*, 2003; Dreissigacker *et al.*, 2005; Schreiber *et al.*, 2008). Onkogene K-*ras* Mutationen betreffen 90 % aller Pankreaskarzinome, 45 % aller Kolonkarzinome und 35 % aller Lungenadenokarzinome (Bos, 1989; Prior *et al.*, 2012).

Das Pankreaskarzinom ist weltweit unter den Krebserkrankungen die vierthäufigste Todesursache (Hariharan *et al.*, 2008; Hidalgo, 2010; Ma *et al.*, 2013). In den frühen Stadien

der Krankheit treten Mutationen im *K-ras* Protoonkogen auf. Diese Mutationen reichen jedoch nicht aus, um eine gesunde Pankreaszelle in eine Tumorzelle zu transformieren (Bos, 1989; Khalid, 2009). In späteren Stadien werden in 60 % der Fälle die Tumorsuppressionsgene p16 und p53 inaktiviert (Rozenblum *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2001). Da in 90 % aller humanen duktaalen Pankreasadenokarzinome eine *K-ras* Mutation vorliegt, wurde die Zelllinie PANC-1 in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem ausgewählt.

Karzinome der Lunge sind die häufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen weltweit (Siegel *et al.*, 2014). Etwa 80 % aller Lungentumoren sind nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (*non-small-cell lung cancer*, NSCLC) (Riccardo *et al.*, 2014). *K-ras* ist das am häufigsten mutierte Onkogen in Adenokarzinomen der Lunge. In ungefähr 30 % der Lungenadenokarzinome treten aktivierende Mutationen des *K-ras* Gens auf (Cox und Der, 2010). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Präsenz der *K-ras* Mutationen mit der Aggressivität des Tumors einhergeht (Mascaux *et al.*, 2005; Gautschi *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2007).

Die Diagnose erfolgt bei 67 % der Patienten in den späten Stadien der Krankheit. Molekulare Faktoren wie die Zellzyklus-regulierenden Tumorsuppressoren p53 und p21 spielen bei der Tumorprogression eine große Rolle (Xie *et al.*, 2014).

1.1.3. Posttranslationale Modifikationen der Ras Proteine

Alle 4 Ras Isoformen werden im Cytosol als inaktive Proteine synthetisiert. Sie durchlaufen an der CAAX Sequenz eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen. Im ersten Schritt nutzt die Farnesyltransferase (FT) ein Farnesyldiphosphat und katalysiert die kovalente Bindung eines 15-C Farnesyloisoprenoids an das Cystein des CAAX Motivs. Die Endoprotease *Ras-converting enzyme-1* spaltet die AAX Sequenz ab und durch die *Isoprenylcysteine carboxymethyl-transferase* wird das nun terminale farnesylierte Cystein carboxymethyliert. Durch die Farnesylierung werden H- und N-Ras zum endoplasmatischen Retikulum (ER) gelenkt. Dort können die Proteine entweder über einen nicht-vesikulären Transport sehr schnell zu anderen Endomembranen transportiert werden oder aber sie werden durch Proteinacyltransferasen palmitoyliert. N-Ras wird an Cys181 monopalmitoyliert und H-Ras an Cys181 und Cys184 dipalmitoyliert. Durch den Vesikel-vermittelten klassischen sekretorischen Weg können die nun 2fach modifizierten Proteine über die Golgimembranen hin zur Plasmamembran transportiert werden (Linder und Deschenes, 2007). Die Prenylierung

allein ist ein schwacher Membrananker, während die Palmitoylierung die Affinität von Ras zur Plasmamembran deutlich erhöht (Choy *et al.*, 1999).

K-Ras4B wird im Gegensatz zu H- und N-Ras nicht palmitoyliert, sondern trägt an der hypervariablen Region eine polybasische Domäne (AS 175-184), welche u.a. aus 6 Lysinen aufgebaut ist. Das Polylysinmotiv besitzt eine positive Nettoladung und kann so elektrostatisch mit den negativ geladenen Phospholipiden der Plasmamembran interagieren (Hancock *et al.*, 1990; Hancock *et al.*, 1991). Die Ankerdomäne der Ras Proteine umfasst neben dem CAAX Motiv die Palmitoylierungsstellen von H- und N-Ras bzw. die polybasische Domäne von K-Ras4B. Die Proteinsequenz zwischen der hoch konservierten und der Ankerdomäne wird als *linker* bezeichnet (Hancock, 2003).

Der Transport von K-Ras zur Plasmamembran erfolgt wahrscheinlich durch 3 mögliche Mechanismen: (1) aufgrund der polybasischen Domäne kann K-Ras durch einfache Diffusion entlang eines elektrostatischen Gradienten zur negativ geladenen Plasmamembran gelangen, (2) durch ein noch unidentifiziertes Chaperon oder (3) durch Mikrotubuli-abgängige Prozesse (Thissen *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000).

1.1.4. Ras Nanocluster

Die unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen, die die Ras Isoformen durchlaufen und die GDP/GTP Bindung sind entscheidend für die Lokalisierung der Proteine in sogenannten Nanodomänen innerhalb der Plasmamembran. Die am besten charakterisierten Nanostrukturen sind *lipid rafts* und *non-raft* Domänen. Die *lipid rafts* bestehen aus Phospholipiden, angereichert mit langkettigen, gesättigten Fettsäuren, die zusammen mit Cholesterin spontan eine kleine, aber stabile Struktur formen. Die *non-raft* Domänen hingegen sind Cholesterin-frei (Hancock, 2003). Während H-Ras.GDP die höchste Affinität für die Cholesterin-reichen *lipid rafts* zeigt, ist H-Ras.GTP in *non-raft* Domänen lokalisiert. K-Ras interagiert unabhängig seines Aktivierungszustands zu etwa 85 % mit *non-raft* Domänen der Plasmamembran (Prior *et al.*, 2001; Niv *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2003; Rotblat *et al.*, 2004b; Eisenberg *et al.*, 2006; Plowman *et al.*, 2008). Für N-Ras konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem Konformationszustand und der Lokalisierung innerhalb der Plasmamembran nachgewiesen werden. Hier zeigte sich, dass N-Ras.GTP bevorzugt in *lipid rafts* verankert ist, während N-Ras.GDP in *non-raft* Domänen lokalisiert ist (Prior *et al.*, 2003).

Die H-Ras.GTP, N-Ras.GDP, K-Ras.GDP und K-Ras.GTP Nanocluster befinden sich in Cholesterin-unabhängigen Regionen. Sie unterscheiden sich voneinander und überlappen

nicht. Durch die Bindung von GDP oder GTP und den damit verbundenen unterschiedlichen Konformationen der einzelnen Ras Isoformen assoziiert jedes der Proteine mit unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen der Membran (Zhou und Hancock, 2014).

In Experimenten, in denen die *linker* Domäne von H-Ras (AS 166-179) deletiert wurde, wurde das Protein zwar zur Plasmamembran transportiert, jedoch lokalisiert das aktive H-Ras in *lipid rafts* und nicht in *non-raft* Domänen (Prior *et al.*, 2001; Jaumot *et al.*, 2002). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die hypervariable Region mit anderen ebenfalls Plasmamembran-assoziierten Proteinen interagiert, die die laterale Segregation von H-Ras regulieren. Galektin-1 wurde als Plasmamembran-assoziiertes Protein identifiziert, welches mit H-Ras.GTP und schwach mit K-Ras.GTP, jedoch nicht mit N-Ras oder H-Ras.GDP interagiert (Paz *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Galektin-1 den GTP-gebundenen Zustand von H-Ras stabilisiert (Elad-Sfadia *et al.*, 2002). Dies führt zu einer erhöhten Rekrutierung von Effektorproteinen und somit zu einer gesteigerten Signalintensität (Belanis *et al.*, 2008). Für K-Ras.GTP konnte eine selektive Interaktion mit Galektin-3 nachgewiesen werden (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Im Rahmen ihrer Doktorarbeit, die 2006 in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl angefertigt wurde, identifizierte Monika Unger Galektin-8 als bisher unbekanntes, Isoform-spezifisches Interaktionspartner von konstitutiv aktivem K-Ras (G12V) („Charakterisierung des Einflusses von konstitutiv aktivem K-Ras(G12V) auf die Signaltransduktion und die Migration von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen“, Dissertation von Dr. rer. Nat. Monika Unger, Universität Ulm, 2006).

1.1.5. Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade durch H-Ras

In der Transformation und Tumorgenese spielen zwei Ras-abhängige Signaltransduktionswege eine bedeutende Rolle: (1) die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade und (2) der PI3K/Akt-Signalweg (Chappell *et al.*, 2011; Ferro und Falasca, 2014).

Die Serin/Threonin-Kinasen der Raf-Familie sind *downstream* Effektoren von Ras. Bisher wurden die 3 Raf Isoformen A-Raf, B-Raf und Raf-1 (Synonym: c-Raf) identifiziert (Hagemann und Rapp, 1999). Da es sich bei Raf-1 um ein Homolog des viralen onkogenen v-Raf handelt, zählt es zur Gruppe der Protoonkogene (Rapp *et al.*, 2003).

Paz und Mitarbeiter publizierten, dass Galektin-1 spezifisch mit H-Ras(G12V) interagiert. Eine signifikant schwächere Interaktion konnte zwischen Galektin-1 und K-Ras(G12V) gezeigt werden, während Galektin-1 und N-Ras nicht im Komplex nachgewiesen werden konnten (Paz *et al.*, 2001).

Aktiviertes und an Galektin-1 gebundenes H-Ras bindet Raf-1 (Abbildung 1.3), aktiviert dieses und rekrutiert es zur Plasmamembran (Kolch, 2000; Dhillon, 2002). Die Interaktion erfolgt N-terminal an der Ras-Bindungsdomäne (AS 55-131) und der Cystein-reichen Domäne (AS 139-184) von Raf-1, was zu dessen Konformationsänderung führt (Morrison und Cutler, 1997). Aktiviertes Raf-1 kann nun durch Phosphorylierung von Ser217 und Ser221 die *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase-kinases 1 and 2* (MEK1/2) aktivieren. MEK1/2 aktivieren durch Phosphorylierung eines Threonins an Position 202 und eines Tyrosins an Position 204 die *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2* (ERK1/2) (Peyssonnaud und Eychène, 2001; Pouyssegur *et al.*, 2002). ERK1/2 phosphorylieren ihrerseits Substrate in verschiedenen zellulären Kompartimenten wie z.B. im Zytoplasma, in zytoplasmatischen Organellen (Mitochondrien etc.), im Golgi, in Endosomen/Lysosomen, an Membranen und vor allem im Kern (Torii *et al.*, 2004; Teis *et al.*, 2006; Casar *et al.*, 2009; Fehrenbacher *et al.*, 2009; Galli *et al.*, 2009). Mittels dieser Phosphorylierungen werden zahlreiche ERK1/2-abhängige zelluläre Prozesse, wie Proliferation und Differenzierung, aber auch Morphologie, neuronale Plastizität, Überleben, Stressantwort und Apoptose reguliert (Yoon und Seger, 2006). MAP-Kinase-Phosphatasen (MKPs) können durch Dephosphorylierung ERK1/2 inaktivieren und somit die Signalkaskade unterbrechen (Brondello *et al.*, 1997; Yip-Schneider *et al.*, 2001)

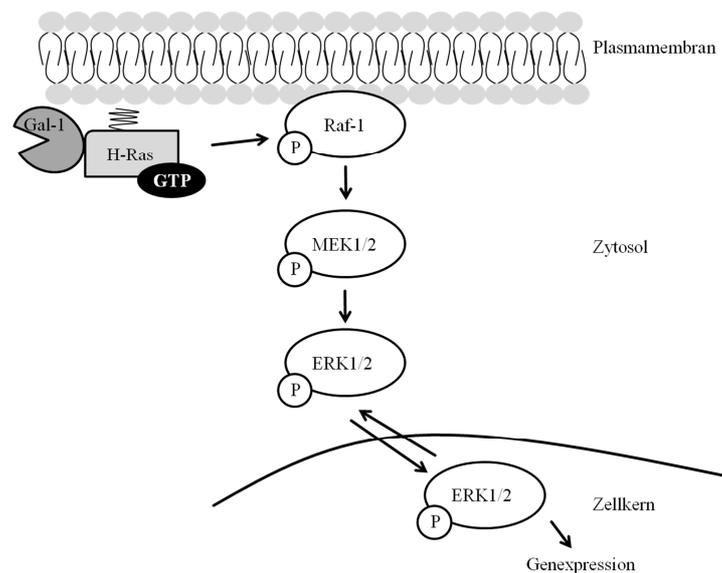


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade. H-Ras.GTP, gebunden an Gal-1, aktiviert durch Phosphorylierung Raf-1 und rekrutiert dieses an die Plasmamembran. Das aktive Raf-1 aktiviert die im Zytosol lokalisierten *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase-kinases 1 and 2* (MEK1/2). Anschließend phosphorylieren MEK1/2 die *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2* (ERK1/2), welche in den Zellkern translozieren und dort mit einer großen Anzahl an Substraten interagieren. Dadurch werden verschiedene Prozesse wie z.B. die Genexpression reguliert.

Fehlregulationen innerhalb der Kaskade führen zu neurodegenerativen Erkrankungen, Entwicklungsstörungen, Diabetes und Krebs (Dhillon *et al.*, 2007; Montagut und Settleman, 2009; Tanti und Jager, 2009; Tidyman und Rauen, 2009; Kim und Choi, 2010). Aktivierende Mutationen von Komponenten *upstream* oder innerhalb der Kaskade wurden in mehr als der Hälfte aller Krebserkrankungen gefunden (Montagut und Settleman, 2009). Dies deutet auf eine Rolle der ERK1/2 Kaskade bei der Karzinogenese hin (Plotnikov *et al.*, 2010).

1.1.6. Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade durch K-Ras

Nicht nur der Raf/MEK/ERK-, sondern auch der PI3K/Akt-Signalweg ist eine Kaskade, die durch Ras aktiviert wird.

In einer Publikation von Elad-Sfadia wurde die bevorzugte Interaktion von Galektin-3 mit aktiviertem K-Ras gegenüber aktiviertem H-Ras und N-Ras beschrieben (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Durch die Interaktion von Galektin-3 mit K-Ras.GTP werden zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Wachstum, Überleben, Apoptose, Zelladhäsion und -motilität reguliert (Luo *et al.*, 2003; Wymann *et al.*, 2003; Downward, 2004; Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Der PI3K/Akt-Signalweg spielt in der Tumorforschung eine bedeutende Rolle.

Bis heute wurden 8 verschiedene PI3Ks in Säugetieren identifiziert. PI3Ks sind Heterodimere mit separaten katalytischen und regulatorischen Untereinheiten. Im ersten Schritt der PI3K-Aktivierung wird die katalytische Untereinheit an die Plasmamembran rekrutiert. Dies geschieht entweder durch die Bindung der regulatorischen Untereinheit an aktive RTKs oder durch direkte Interaktion der katalytischen Untereinheit mit Ras (Abbildung 1.4) (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1998). Aktive PI3Ks phosphorylieren Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃). Die Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) kann PIP₃ durch Dephosphorylierung inaktivieren (Wymann *et al.*, 2003). Aktives PIP₃ seinerseits rekrutiert und aktiviert eine große Anzahl an *downstream* Effektoren, u.a. GEFs der Rac und Rho GTPasen und die Serin-Threonin-Proteinkinasen der Proteinkinase B (PKB; Synonym: Akt)-Familie (Burgering und Coffey, 1995; Han *et al.*, 1998; Vivanco und Sawyers, 2002).

Zu der Akt-Familie zählen die 3 Isoformen Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) und Akt3 (PKB γ), deren Aminosäuresequenzen zu 80 % identisch sind (Alessi und Cohen, 1998; Bellacosa *et al.*, 2004). Akt1 inhibiert apoptotische Prozesse oder induziert die Proteinsynthese. Eine Deletion von Akt1 führt zu Wachstumsretardierungen und gesteigerter spontaner Apoptose (Chen *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2001). Akt2 hingegen reguliert die Glukosehomöostase und induziert den Glukosetransport (Garofalo *et al.*, 2003; Tschopp *et al.*, 2005). Akt3 wird

hauptsächlich im Gehirn exprimiert und dessen Abwesenheit führt zu einer Abnahme von Gehirngröße und –gewicht um 25 % (Tschopp *et al.*, 2005). Akt3 vermittelt außerdem die Progression von Brustkrebs, da das Fehlen von Akt3 massiv die Proliferation der Tumorzellen reduziert (Clark und Toker, 2014; Grabinski *et al.*, 2014).

Die 3 Akt Isoformen haben alle eine N-terminale *pleckstrin homology* (PH)-Domäne, eine Kinasedomäne und eine C-terminale regulatorische Region gemein. Bei Stimulierung der Zelle wird Akt1 und Akt2 aus dem Zytoplasma zur Plasmamembran rekrutiert (Andjelkovic *et al.*, 1997; Meier *et al.*, 1997). PIP3 bindet an die PH-Domäne des Akt und aktiviert dieses (Franke *et al.*, 1997; Stokoe *et al.*, 1997). Akt ändert seine Konformation und kann an Thr308 (in der Kinasedomäne) und an Ser473 (in der C-terminalen Region) phosphoryliert werden. Nur wenn beide Aminosäuren phosphoryliert sind und Akt mit der Plasmamembran assoziiert ist, ist Akt vollständig aktiv (Alessi und Cohen, 1998; Song *et al.*, 2005). Das aktive Akt wandert zurück ins Zytoplasma oder in den Zellkern und aktiviert durch Phosphorylierung weitere Proteine, wodurch z.B. das Zellüberleben und durch Phosphorylierung des *mammalian target of Rapamycin* (mTOR) das Zellwachstum gefördert wird (Nave *et al.*, 1999).

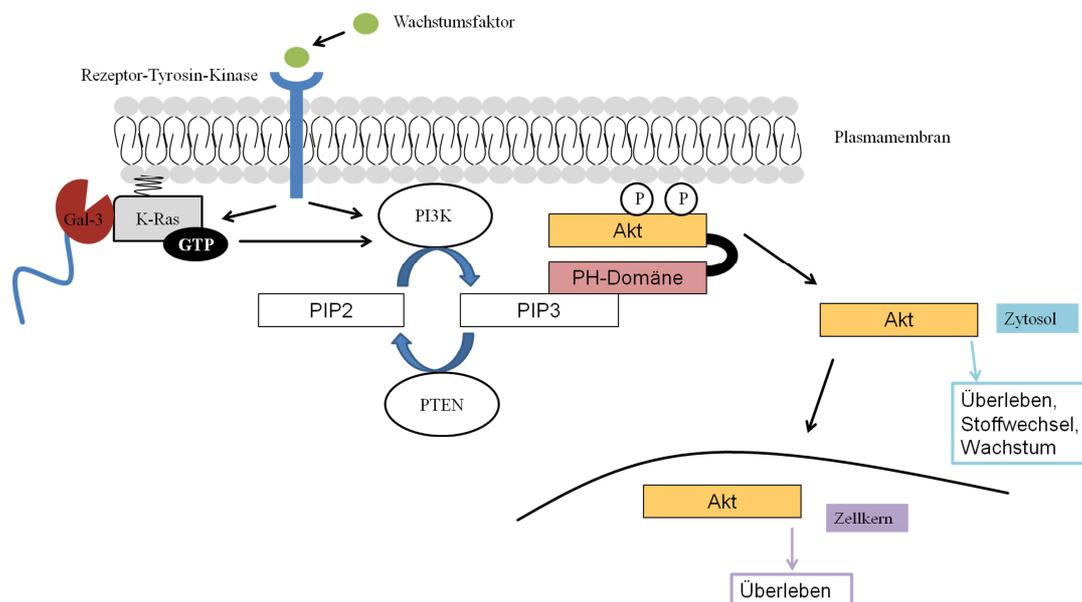


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Ras/PI3K/Akt-Signalwegs. PI3K wird durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder durch K-Ras.GTP, gebunden an Galektin-3, aktiviert und generiert durch Phosphorylierung von PIP2 das Phospholipid PIP3. Die Phosphatase PTEN kann PIP3 dephosphorylieren und somit inaktivieren. PIP3 interagiert mit der PH-Domäne von Akt und rekrutiert dieses an die Plasmamembran. Diese Interaktion führt zu einer Konformationsänderung von Akt, wodurch Thr308 und Ser473 phosphoryliert werden können. Das aktive Akt transloziert ins Zytoplasma und in den Nukleus. Durch diese Kaskade werden Prozesse wie Überleben, Stoffwechsel und Wachstum reguliert.

Es wird geschätzt, dass in mindestens 50 % aller Krebsarten eine Fehlregulierung des PI3K Signalweges auftritt (Ferro und Falasca, 2014). Verschiedene genetische Veränderungen, die den PI3K/Akt-Signalweg aktivieren können, sind bisher bekannt, wie z.B. die Inaktivierung des Tumorsuppressors PTEN, wodurch die Inaktivierung von PIP3 verhindert wird und der Signalweg dauerhaft aktiv ist (Teng *et al.*, 1997; Haas-Kogan *et al.*, 1998). Weitere Fehlregulationen können Punktmutationen (E17K) in der PH-Domäne von Akt1 sein (Bleeker *et al.*, 2008). Der Verlust von Akt1 fördert die Zellinvasion und Metastasierung, vermutlich durch die Verlagerung der Signalweiterleitung hin zu Akt2. Eine Überexpression von Akt2 führt zu gesteigertem Zellwachstum und Überleben (Irie *et al.*, 2005; Rychahou *et al.*, 2008). Zahlreichen Studien zeigen, dass die PI3K/Akt-Kaskade ein hyperaktivierter Signalweg in der Tumorgenese ist (Kahn *et al.*, 2013).

1.2. Galektine

Die Galektine bilden eine Familie von strukturell ähnlichen, tierischen Lektinen. Sie zeichnen sich durch ihre Affinität für β -Galaktoside und ihre Sequenzhomologie aus (Barondes *et al.*, 1994a; Barondes *et al.*, 1994b). Die Verbreitung der Galektine im Tierreich ist ubiquitär. Bisher wurden 15 Galektine in Säugern identifiziert.

Die für die Galektine kodierenden Gene wurden *lectin, Galactoside-binding, soluble (LGALS)* genannt (Barondes *et al.*, 1994a; Farmer *et al.*, 2008). Während der Transkription entstehen durch alternatives Spleißen diverse Galektin mRNA Varianten (Barondes *et al.*, 1994b; Leffler *et al.*, 2001).

Alle Galektine haben eine Konsensussequenz gemein, welche der *carbohydrate-recognition domain* (CRD) entspricht (Barondes *et al.*, 1994a; Barondes *et al.*, 1994b). Die CRDs binden β -Galaktoside, meist Glukokonjugate, die Reste von N-Azetyl-Laktosamin enthalten (Cooper, 2002; Lahm *et al.*, 2004; Liu und Rabinovich, 2005). Jedes Galektin bindet jedoch spezifisch ein anderes Kohlenhydrat (Brewer, 2002).

Galektine können eine oder 2 CRDs aufweisen und werden anhand ihrer Struktur in 3 Gruppen eingeteilt (Abbildung 1.5). Die erste Gruppe bilden die prototypischen Galektine mit nur einer CRD. Biologisch aktiv können sie als Monomere (Galektin-5, -7, -10) oder als Homodimere (Galektin-1, -2, -11, -14, -15) vorliegen. In die zweite Gruppe wurde nur Galektin-3 als chimäres Galektin eingeordnet. Dabei handelt es sich um ein Galektin mit nur einer CRD, an die eine kurze Prolin-, Glyzin- und Tyrosin-reiche N-terminale Domäne von etwa 120 Aminosäuren anschließt. Dadurch können Galektin-Oligomere entstehen. Die dritte Gruppe umfasst die *tandem repeat* Galektine (Galektin-4, -6, -8, -9 und -12). Diese bestehen

aus 2 CRDs die durch eine Polypeptidkette (*hinge region*) miteinander verbunden sind. Sie sind sowohl als Monomere als auch als Oligomere aktiv (Leffler, 2001; Leffler *et al.*, 2004). Die CRDs bestehen aus 135-150 Aminosäuren, die eine β -Sandwichstruktur aus 2 antiparallelen β -Faltblättern bilden. Die CRDs der Dimere sind durch eine zweifache axiale Rotation senkrecht zur planaren Seite der β -Faltblätter angeordnet (Barondes *et al.*, 1994; Leffler *et al.*, 2001).

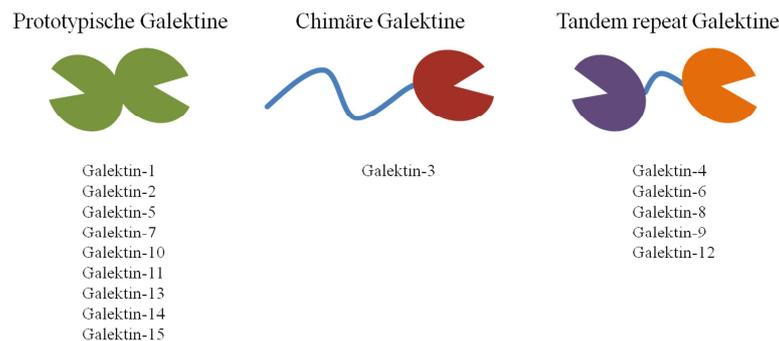


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Gruppeneinteilung der Galektine. Galektine werden anhand ihrer strukturellen Eigenschaften und der Anzahl ihrer CRDs in 3 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe beinhaltet die prototypischen Galektine mit nur einer CRD (Galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, und -15). Die Gruppe der chimären Galektine umfasst als einziges Mitglied nur Galektin-3, das eine 120 Aminosäuren lange N-terminale Domäne enthält. Die Gruppe der *tandem repeat* Galektine zeichnet sich durch 2 CRDs aus, die durch eine kurze Polypeptidkette, die sogenannte *hinge region*, miteinander verbunden sind (Galektin-4, -6, -8, -9 und -12) (verändert nach Cummings R.D. und Liu F.T. (2009): Galectins. *Essentials of Glycobiology*, 2end Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 33).

Galektine wurden in verschiedenen zellulären Kompartimenten, wie Zytoplasma, Plasmamembran, Nukleus oder aber in der extrazellulären Matrix gefunden. Innerhalb der Familie der Galektine konnte weder eine Membranankerdomäne noch eine klassische N-terminale Signalsequenz, die die Translokalisierung der Proteine vom Zytoplasma zum Lumen des ER reguliert, nachgewiesen werden (Cooper und Barondes, 1990). Die Synthese der Galektine findet an freien Polysomen im Zytoplasma statt und deren Export aus der Zelle erfolgt über den nicht-klassischen und einen noch nicht geklärten apokrinen Sekretionsmechanismus, bei dem sich extrazelluläre Vesikel von der Zellmembran abschnüren und so Galektin aus der Zelle transportieren (Hughes, 1999; Cummings und Liu, 2009). Extrazelluläre Galektine binden an ihren CRDs β -Galaktoside und können sowohl zur Zell-Zell- als auch zur Zell-Matrix-Interaktion beitragen (He und Baum, 2006; Cummings und Liu, 2009).

Intrazellulär interagieren Galektine mit zytoplasmatischen und nukleären Proteinen und steuern eine große Anzahl an Prozessen wie z.B. Regulierung des Zellwachstums, der Apoptose, der embryonale Entwicklung und der Inflammation (Perillo *et al.*, 1998; Hernandez

und Baum, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002; Liu und Rabinovich, 2005; Nakahara *et al.*, 2005; Camby *et al.*, 2006; Elola *et al.*, 2007).

Galektin-3 wird in immunkompetenten Zellen, wie z.B. Makrophagen, dendritischen Zellen, Eosinophilen, Mastzellen oder aktivierte T- und B-Zellen exprimiert und reguliert die Aktivierung, Proliferation und Apoptose von T-Zellen (Dumic *et al.*, 2006; Radosavljevic *et al.*, 2012). Für Galektin-1 wurden anti-inflammatorische und immunregulatorische Effekte gezeigt (Ilarregui *et al.*, 2010).

1.2.1. Galektine in der Tumorbilogie

Galektine spielen eine bedeutende Rolle in der Tumorbilogie. Sie fördern die Tumorangio-genese, die Apoptose von Immunzellen und die Tumorzellmigration (Perillo *et al.*, 1995; Nagy *et al.*, 2002; Hittelet *et al.*, 2003; Thijssen *et al.*, 2006; Le Mercier *et al.*, 2008). Expressionsstudien belegen, dass z.B. Galektin-1/-3/-4 und -8 in malignen Gliomen überexprimiert vorliegen (Strik *et al.*, 2012). Die Galektin-9 mRNA Expression in Magenkarzinomen ist jedoch signifikant reduziert (Yang *et al.*, 2014). Während der Transformation einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle verändert sich außerdem die Lokalisierung einzelner Galektin Isoformen innerhalb der Zelle. Galektin-3 z.B. wird u.a. aus dem Nukleus ins Zytosol transportiert (van den Brule *et al.*, 2004). Die gesteigerte oder verminderte Expression sowie die Lokalisation einzelner Galektine könnten als Marker in der Tumorgenese verwendet werden.

Eine Galektin-3 Überexpression geht einher mit einer schlechten Prognose in Karzinomen der Leber, Niere und Blase (Hsu *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 2008; Canesin *et al.*, 2010; Dancer *et al.*, 2010; Sakaki *et al.*, 2010). Eine verminderte Galektin-3 Expression zeigen Eierstockkarzinome, Uterusadenokarzinome, Brustkarzinome und Zervixkarzinome (van den Brule *et al.*, 1994; Castronovo *et al.*, 1996; van den Brule *et al.*, 1996; Idikio, 1998; Lee *et al.*, 2006). Im Vergleich zu normalen Pankreaszellen ist Galektin-3 in Pankreaskarzinomzellen beständig überexprimiert (Schaffert *et al.*, 1998; Berberat *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2004). Ein Galektin-3 *knock down* durch shRNA in mehreren Pankreaskarzinomzelllinien resultiert *in vitro* in einer verringerten Zellproliferation und Invasion und *in vivo* in einer verminderter TumorgroÙe und -volumen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine erhöhte Galektin-3 Expression in Tumorzellen eine entscheidende Rolle in der Regulation von Tumorzellwachstum und der Invasion spielt (Song *et al.*, 2012).

Im Gewebe von Kolonkarzinomen und in Kolonkarzinomzelllinien wurde mittels immunohistologischer Untersuchungen und RNA Expressionsanalysen gezeigt, dass je

aggressiver der Tumor war, desto weniger Galektin-8 Protein bzw. mRNA wurde exprimiert. Die Galektin-8 Expression korreliert invers mit der Tumorstadiumsrate (Nagy *et al.*, 2002). Galektin-8 wird stark in Plattenepithelkarzinomen und schwach in Adenokarzinomen exprimiert (Henno *et al.*, 2002). Diese Erkenntnisse könnten dazu beitragen, dass die Stärke oder das Fehlen einer Galektin-8 Expression als Tumormarker eingesetzt werden kann.

1.2.2. Galektin-1 und Galektin-3

Galektin-1 (135 AS, 14 kDa), wird ubiquitär exprimiert und ist in zahlreiche pathologische Prozesse wie Tumorzellproliferation, Aggregation, Adhäsion, Migration, Zytoskelettorganisation und Apoptose involviert (Perillo *et al.*, 1995; van den Brule *et al.*, 1995; Kopitz *et al.*, 2001; Tinari *et al.*, 2001; Yang und Liu, 2003; Wu *et al.*, 2009). Galektin-1 ko-immunpräzipitierte in HEK293 Zellen mit H-Ras.GTP und K-Ras.GTP. Die Expression von Galektin-1 hielt eine EGF-induzierte Erhöhung von GFP-Ras.GTP etwa 1 h auf dem gesteigerten Niveau, während die Kontrollen einen Abfall des GFP-Ras.GTP Gehalts nach 10-15 min zeigten. Galektin-1 erhöht die Aktivität von Raf-1 und den Anteil der aktiven *extracellular signal-regulated kinase1/2* (ERK1/2). Im Gegensatz dazu inhibiert Galektin-1 die EGF-vermittelte Stimulation der PI3K Aktivität (Elad-Sfadia *et al.*, 2002).

Bei Galektin-3 (250 AS, 30 kDa) handelt es sich um ein Protein, welches Zellwachstum, Differenzierung, Adhäsion und RNA Prozessierung reguliert (Liu und Rabinovich, 2005; Song *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). In Ko-Immünpräzipitationsstudien konnte belegt werden, dass Galektin-3 ein spezifischer Bindungspartner von K-Ras ist. Galektin-3 ko-immunpräzipitierte deutlich stärker mit K-Ras(G12V) als mit K-Ras wt, H-Ras(G12V), H-Ras wt, N-Ras(G13V) oder N-Ras wt und steigerte den EGF-induzierten Gehalt an endogenem K-Ras.GTP. Die Zugabe von EGF steigerte die PI3K und Raf-1 Aktivität in Zellen, die mit K-Ras und Galektin-3 ko-transfiziert wurden. Galektin-3 schwächte hingegen die EGF-stimulierte Aktivierung von ERK1/2 ab. Durch die spezifische Bindung von Galektin-3 an K-Ras.GTP wird die Aktivität von K-Ras und PI3K verlängert und es kommt zu einer Signalverstärkung (Elad-Sfadia *et al.*, 2004).

1.2.3. Galektin-8

Das humane *LGALS8* Gen ist auf dem Chromosom 1 (1q42.11) lokalisiert und umfasst 33 kbp genomische DNA. Durch alternatives Spleißen können 14 unterschiedliche Transkripte entstehen, die für 6 Proteinisoformen kodieren (Zick *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Isoformen Galektin-8 *long* und Galektin-8 *short* verwendet. Galektin-8

long besteht aus 359 Aminosäuren (40,4 kDa) und Galektin-8 *short*, aufgrund der fehlenden Expression von Exon 11 (bp 550-698), aus nur 317 AS (35,8 kDa), was zu einer verkürzten *hinge region* von Galektin-8 *short* führt („Expression und Lokalisation von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 in Pankreaskarzinomzelllinien“, Dissertation Dr. med. Andreea Porr, Universität Ulm, 2010).

Die N-terminale und C-terminale CRD (N-CRD: AS 1-155 und C-CRD: AS 184-317 bzw. AS 226-359) bilden jeweils eine β -Sandwichstruktur, die aus 2 antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut ist. Das erste β -Faltblatt besteht aus den 6 β -Strängen S1-S6, das zweite aus den 5 β -Strängen F1-F5. Zwischen F5 und S2 ist eine kurze α -Helix lokalisiert (Yoshida *et al.*, 2012). Sie weisen eine 36 %ige Aminosäuresequenzhomologie auf und binden unterschiedliche Oligosaccharide (Hadari *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2013). Die N-CRD bindet mit hoher Präferenz an Oligosaccharide, welche Sialinsäure- und Sulfat-Reste enthalten. Die C-CRD hingegen bevorzugt die Bindung an nicht-sialysierte Galaktoside und an Glycanstrukturen der Blutgruppen A und B (Carlsson *et al.*, 2007; Stowell *et al.*, 2008; Ideo *et al.*, 2011; Vokhmyanina *et al.*, 2011, Vokhmyanina *et al.*, 2012). Durch eine Überlagerung der CRDs konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Bindungspräferenzen durch unterschiedliche Längen des S3-S4 *loops* zustande kommen. In der N-CRD erstreckt sich der S3-S4 *loop* von Aminosäure 53-61 (Kumar *et al.*, 2013). Dieser Bereich enthält die kritische Aminosäure Arginin an Position 59, die für die spezifische Erkennung der Sialinsäure und Sulfatgruppen durch die N-CRD verantwortlich ist (Ideo *et al.*, 2011). Der S3-S4 *loop* der C-CRD beinhaltet die Aminosäuren 220-224 (Yoshida *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013).

Galektin-8 tritt sowohl intra- als auch extrazellulär auf. Innerhalb der Zelle reguliert es Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Migration und ferner auch Differenzierung, Immunantwort, Inflammation und Tumorentwicklung (Leffler *et al.*, 2004; Schwartz-Albiez, 2009). Nach der Sekretion wirkt Galektin-8 durch die Interaktion mit Integrinen als physiologischer Modulator der Zelladhäsion. Dazu müssen jedoch beide CRDs aktiv sein (Hadari *et al.*, 2000; Levy *et al.*, 2001). Diese Interaktion aktiviert Integrin-vermittelte Signalwege, die ihrerseits den Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)- und PI3K-Signalweg aktiviert, wodurch die Zellproliferation und Migration gesteuert wird (Levy *et al.*, 2006; Diskin *et al.*, 2012).

1.2.4. Bedeutung der Farnesyl-Bindungstaschen für die Galektin/Ras-Interaktion

In einigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass H-Ras.GTP Galektin-1 aus dem Zytosol hin zur Plasmamembran rekrutiert und dadurch das aktive H-Ras.GTP in der Plasmamembran stabilisiert (Paz *et al.*, 2001). Weiterführende Studien belegten, dass Galektin-1 eine hydrophobe Tasche aufweist, die mit der Farnesylgruppe des H-Ras interagiert (Rotblat *et al.*, 2004a). Zur Identifizierung dieser möglichen Farnesylbindungstasche mittels Strukturanalysen diente der Cdc42/RhoGDI-Komplex als Vorlage. Cdc42 ist eine kleine GTPase der Rho-Familie und spielt bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts, des vesikulären Verkehrs im Golgi, der Rezeptorendozytose und im Zellzyklus eine Rolle. RhoGDI inhibiert die Aktivierung von Cdc42 und stimuliert dessen Freisetzung von der Plasmamembran. Die Interaktion von aktiviertem Cdc42 mit RhoGDI ist für die Cdc42-vermittelte zelluläre Transformation essentiell (Lin *et al.*, 2003). Im Falle von RhoGDI wird durch die Aminosäuren Leu75, Leu77, Leu88, Phe102, Leu104, Gln130, Thr142, Tyr144, Glu163, Glu164, Ile177 und Trp194 eine hydrophobe Aushöhlung geformt, in die das Geranylgeranymotiv des Cdc42 bindet (Hoffman *et al.*, 2000). RhoGDI und Galektin-1 zeigen Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer Sekundärstrukturen (Abbildung 1.6).

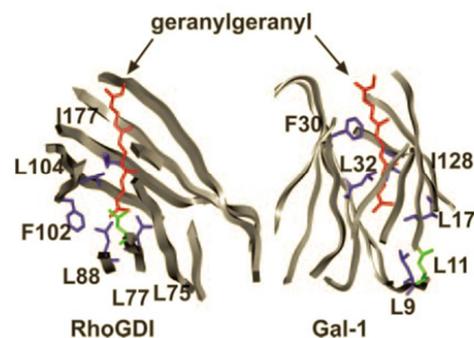


Abb. 1.6: Vergleich der Sekundärstrukturen von RhoGDI und Galektin-1. Es wurden homologe Aminosäuresequenzen der RhoGDI Immunglobulindomäne in der Cdc42-gebundenen Form und Galektin-1 im Bereich der Innenseite der β -Sandwich Strukturen miteinander verglichen. In beiden Strukturen wurde eine Geranylgeranylgruppe eingefügt und die für die Interaktion von RhoGDI bzw. Galektin-1 mit der Geranylgeranylgruppe wichtigen Aminosäuren markiert (Rotblat *et al.*, 2004a: Galectin-1(L11A) Predicted from a Computed Galectin-1 Farnesyl-Binding Pocket Selectively Inhibits Ras-GTP. *Cancer. Res.* 64, 3112-3118).

Die in Abbildung 1.6 aufgeführten Aminosäuren befinden sich in einer Region zwischen 2 β -Faltblättern des Galektin-1 Proteins bzw. in der Immunglobulindomäne des RhoGDI. Ein Sequenzvergleich zwischen RhoGDI und Galektin-1 ergab, dass 6 der von Hoffman *et al.* gefundenen Aminosäuren, die für die Interaktion von RhoGDI mit Cdc42 verantwortlich sind, identisch sind (Abbildung 1.6 und Tabelle 1.1). Dies legt nahe, dass auch Galektin-1 vermutlich eine Isoprenoid-Bindungstasche besitzt (Rotblat *et al.*, 2004a).

Eine Punktmutation an Position 185 des onkogenen K-Ras(G12V,S185C) führt dazu, dass K-Ras nicht mehr farnesyliert werden kann und nicht mehr in der Lage ist mit Galektin-3 zu interagieren (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). In einem weiteren Aminosäuresequenzvergleich zwischen RhoGDI und Galektin-3 konnten 6 Aminosäuren gefunden werden, die mit den für die Interaktion wichtigen Aminosäuren identisch oder homolog sind (Tabelle 1.1) (Ashery *et al.*, 2006).

Tabelle 1.1: Ergebnisse des Aminosäuresequenzvergleichs zwischen RhoGDI und Galektin-1 bzw. RhoGDI und Galektin-3. Angegeben sind die Aminosäuren und deren Positionen, die in den Sequenzen identisch (schwarz) oder homolog (blau) sind und zur Ausbildung einer hydrophoben Bindungstasche beitragen (Rotblat *et al.*, 2004a; Ashery *et al.*, 2006).

RhoGDI	Galektin-1	Galektin-3
Leu75	Leu9	Leu119
Leu77	Leu11	Leu121
Leu88	Leu17	Leu131
Phe102	Phe30	Ile144
Leu104	Leu32	Leu146
Ile177	Ile128	Leu241

In einer Überlagerung der Galektin-3 Sekundärstruktur (AS 114-250) mit der Geranylgeranylgruppe des Cdc42 wird deutlich, dass auch Galektin-3 eine hydrophobe Farnesylbindungstasche ausbildet. Somit fungiert die Farnesylgruppe von H- bzw. K-Ras als spezifische Erkennungseinheit für Galektin-1 bzw. Galektin-3 und trägt zur Verlängerung des Ras-Signals an der Plasmamembran bei (Ashery *et al.*, 2006).

Da humane Galektine aufgrund ihrer CRDs identische Domänen aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass auch Galektin-8 eine hydrophobe Tasche für die Farnesylgruppe des Ras besitzt.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Frau Dr. Monika Unger identifizierte im Rahmen ihrer Promotion Galektin-8 als einen neuen Interaktionspartner von K-Ras und Frau Dr. Andreea Porr untersuchte die Spezifität von Galektin-8 zu den Ras Isoformen genauer. Aufbauend auf diesen Ergebnissen war das Ziel der vorliegenden Arbeit die weitere Charakterisierung der Galektin-8/K-Ras Interaktion.

Neben der Relevanz von Galektin-8 für die Interaktion mit K-Ras ist auch die Bindung von K-Ras an Galektin-8 noch ungeklärt. Ein Ziel dieser Arbeit war zunächst die Untersuchung der Lokalisierung von Galektin-8 und K-Ras(G12V) in der Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie und Immunoblotanalysen von PANC-1 Zellen.

Zur Weiteren Charakterisierung der direkten Interaktion, wie sie bereits für Galektin-3 und K-Ras beschrieben ist, sollte durch Ko-Immünpräzipitationsstudien die Bedeutung der Farnesylierung von K-Ras für die Bindung an Galektin-8 analysiert werden. Darüber hinaus sollte die Galektin-8 Sekundärstruktur *in silico* durch Strukturmodellierung auf eine mögliche hydrophobe Bindungstasche für die Farnesylgruppe des K-Ras untersucht werden.

Aufgrund dessen, dass der K-Ras-induzierte PI3K/Akt- und Raf/MEK/ERK-Signalweg eine große Rolle in der Tumorgense spielt, bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, den Einfluss von Galektin-8 auf die Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2 in der pankreatischen Adenokarzinomzelllinie PANC-1, die eine heterozygote K-*ras* Mutation aufweist, zu analysieren. Analog dazu wurde der Einfluss von Galektin-8 auf die Phosphorylierung von Akt1 und ERK1/2 in den Adenokarzinomzelllinien A549 bzw. A427 der Lunge durchgeführt. Dabei handelt es sich um Zelllinien mit einer heterozygoten bzw. homozygoten K-*ras* Mutation, die beide Galektin-8, aber nicht Galektin-3 exprimieren und somit keine Konkurrenz der Galektine um die Bindung an K-Ras aufweisen können.

Ferner sollten durch die Anwendung pharmakologischer Inhibitoren Signalwege identifiziert werden, die die Proteinexpression von Galektin-8 in PANC-1 Zellen beeinflussen. Des Weiteren sollte mittels *Wounding-Assays* der funktionelle Einfluss von Galektin-8 auf die Migration von PANC-1 Zellen analysiert werden.

2. Material

2.1. Chemikalien

0,05 % Trypsin-EDTA (1x), Phenol-Rot	Invitrogen, Groningen, Niederlande
1,4-Dithio-DL-threit(ol) (DTT)	AppliChem, Darmstadt
2 % Bisacrylamid (Rotiphorese [®] Gel B)	Roth, Karlsruhe
30 % Acrylamid (Rotiphorese [®] Gel A)	Roth, Karlsruhe
4-Nitroblau Tetrazolium Chlorid (NBT)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Fluka Biochemika, Basel, Schweiz
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampizillin, Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Bacto tryptone</i>	Amresco, Darmstadt
<i>Bacto yeast extract</i>	Amresco, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA), pH 7,0	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue R 250	Merck Millipore, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Dulbecco 's-Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt
<i>ECLTM blocking agent</i>	GE Healthcare, Freiburg
Essigsäure (100 %, glazial)	Merck Millipore, Darmstadt
Ethanol (<i>molecular biology grade</i>)	Merck Millipore, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Fötales Bovines Serum (FCS)	PAA, Cölbe
Genitizin 418-Sulfat (G418)	PAA, Cölbe
GlutaMAX TM (200 mM L-alanyl-L-Glutamin)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Glutathione Sepharose <i>BeadsTM 4B</i>	GE Healthcare, Freiburg
Glyzerin (<i>molecular biology grade</i>)	VWR, Darmstadt

Glyzin	Fisher Scientific, Schwerte
Hefeextrakt (<i>bacteriological grade</i>)	Amresco, Darmstadt
Immobilon™ <i>Western Chemiluminescent HRP Substrate</i>	Merck Millipore, Darmstadt
Isobutanol	Merck Millipore, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Millipore, Darmstadt
Kupfer(II)-Sulfat	Riedel-de Haen, Seelze
LB-Agar-Medium	Q-Biogene, Heidelberg
Leupeptin	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
MEM <i>Non-Essential Amino Acids</i> , 100x	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mitomyzin-C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Merck Millipore, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40 (NP40)	Roche, Mannheim
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pierce <i>BCA Protein Assay Reagent A</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Polyoxymethylensorbitan-monolaurat (<i>Tween</i> ®20)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
Salzsäure 37 % (m/V)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SuperSignal® <i>West Pico Chemiluminescent Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

Trichloressigsäure (TCA)	Applichem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trisma [®] base)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton [™] X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypton (<i>bacteriological grade</i>)	Amresco, Darmstadt

2.2. Verbrauchsmaterialien

<i>μ</i> Column	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
6-Lochzellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
96-Lochmikrotiterplatte	Sarstedt, Nümbrecht
Deckglas (24 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Kanülen 25 G (0,5 x 25 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen 2 ml	Nunc, Kamstrup, Dänemark
Millex-GS Sterilfilter (0,22 μm)	Merck Millipore, Darmstadt
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	LLG Labware, Meckenheim
Petrischalen (10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000 μl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (200 μl, 10 μl)	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Protran BA 85 <i>Nitrocellulose Transfer Membrane</i>	GE Healthcare, Freiburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Tuberkulin-Spritzen (1 ml)	Dispomed, Gelnhausen
Whatman [®] -Papier	GE Healthcare, Freiburg
Zellkulturschalen (10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (6 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber (30 cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.3. Geräte

<i>μ</i> MACS Separator und Multi Stand	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
BioRad SmartSpec™ 3000	Bio-Rad Laboratories, München
Blotkammer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Elmi Shaker DRS-12	Miliot Science, Porvoo, Finnland
ELx800 Absorbance Microplate Reader	Biotek, Bad Friedrichshall
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Function line Bakterieninkubator	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Fusion SL4-3500.WL	Vilber Lourmat, Eberhardzell
<i>Chemiluminescence Imagingsystem</i>	
Gelgießständer (4 Gele)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gilson-Pipetten (1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l)	Gilson, Limburg-Offheim
HERAcell 150i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Horizontal-Elektrophoresekammer	MBT-Brand, Heidelberg
Inverses Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81	Olympus, Hamburg
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
Inverses Lichtmikroskop Primo Vert	Carl Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Licor Odyssey SA	Biosciences, Bad Homburg
MaxQ 400 Bakterienschüttler	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Optima™ MAX-E Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
pH Meter FiveEasy	Mettler Toledo, Gießen
Rotator für Reaktionsgefäße	VWR International GmbH, Darmstadt
Sicherheitslaborbrenner Fuego SCS basic	WLD-Tec, Göttingen
Sicherheitswerkbank MSC-Adavantage	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Thermomixer® compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415-R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417-C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge CompactStar CS 4	VWR International GmbH, Darmstadt
UV-Transilluminator GeneFlash	Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK
Vakuumpumpe Vacusafe	Integra Biosciences, Fernwald
Vertikal-Elektrophoresekammer (10 x 8 cm)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vertikal-Elektrophoresekammer (14,5 x 9 cm)	Biometra, Göttingen

Wippe Duomax 130	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
X-Cite 120PC Q (Fluoreszenz-Lichtquelle)	Olympus, Hamburg

2.4. Software

AnalySIS 3.2	Imaging System Soft Imaging System, Münster
CellSens Dimension	Olympus, Hamburg
Fusion (Version 15.18)	Vilber Lormat, Eberhardzell
Gen5 2.00	Biotek, Bad Friedrichshall
GraphPad Prism Version 5.0	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
ImageQuant 5.0	GE Healthcare, Freiburg
Microsoft Excel 2010	Microsoft, Unterschleißheim
Microsoft PowerPoint 2010	Microsoft, Unterschleißheim
Microsoft Word 2010	Microsoft, Unterschleißheim
<i>RCSB PDB - jCE/JFATCAT Structure Alignment Server V2.6</i>	http://cl.sdsc.edu/jfatcatserver/

2.5. Enzyme und molekularbiologische Kits

μ MACS TM <i>anti-GFP Epitope Tagged Protein Isolation Kit</i>	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
NucleoBond [®] Finalizer	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin [®] <i>Gel and PCR Clean-Up Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
QIAprep [®] <i>Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden
QIAGEN [®] <i>Plasmid Midi Kit</i>	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase und Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot

2.6. Rekombinante Proteine

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

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

2.7. Marker für die Agarose-Gelelektrophorese

Lambda-DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker #3 von Fermentas, St. Leon-Rot

Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp):

21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 974, 831, 564, 125

2.8. Marker für die SDS-PAGE

Abkürzungen: kDa: Kilodalton

Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Best.-Nr. 26616)

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

2.9. Prokaryontische und eukaryontische Zellen

2.9.1. *Escherichia coli* Stämme

Escherichia coli BL21 (DE3) New England Biolabs, Frankfurt am Main
One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.9.2. Eukaryontische Zelllinien

Die Herkunft und Beschreibung der im Folgenden aufgelisteten eukaryotischen Zelllinien wurde der ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, USA) entnommen.

Zelllinie	Herkunft und Beschreibung	ATCC- Nr.
HEK-293	Humane, embryonale Nierenzelllinie mit epithelialer Morphologie, die durch Adenovirus 5 (Ad 5) transformiert wurde (Graham <i>et al.</i> , 1977).	CRL-1573
PANC-1	Humane, Pankreaskarzinomzelllinie epithelialer Morphologie (Lieber <i>et al.</i> , 1976), bei der eine mono-allelische Punktmutation im Kodon 12 des K- <i>ras</i> -Gens (GGT→GAT) zum Austausch von Glyzin gegen Asparaginsäure und damit zu einem konstitutiv-aktiven K-Ras-Protein führt (Giehl <i>et al.</i> , 2000).	CRL-1469
A549	Humane, Lungenkarzinomzelllinie epithelialer Morphologie (Lieber <i>et al.</i> , 1976), bei der eine homozygote Punktmutation im Kodon 12 des K- <i>ras</i> -Gens (GGT→AGT) zum Austausch von Glyzin gegen Serin und damit zu einem konstitutiv-aktiven K-Ras-Protein führt (Valenzuela und Groffen, 1986).	CCL-185
A427	Humane, Lungenkarzinomzelllinie epithelialer Morphologie (Giard <i>et al.</i> , 1973), bei der eine heterozygote Punktmutation im Kodon 12 des K- <i>ras</i> -Gens (GGT→GAT) zum Austausch von Glyzin gegen Asparaginsäure und damit zu einem konstitutiv-aktiven K-Ras-Protein führt (Valenzuela und Groffen, 1986).	HTB-53

stabil exprimierende Zelllinien

Stabil exprimierende Zelllinie	Vektor
PANC-1/EGFP Klon 21	pEGFP-C3
PANC-1/K-Ras(G12V) Klon 4.1	pEGFP-C3/K-Ras(G12V)
PANC-1/K-Ras(G12V) Klon 4.4	pEGFP-C3/K-Ras(G12V)

Alle stabil exprimierenden Zelllinien wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl hergestellt (Dreissigacker *et al.*, 2005; Fensterer *et al.*, 2004).

2.10. Primäre Antikörper

Abkürzungen: mk: monoklonal; pk: polyklonal; kDa: Kilodalton

Antigen	Verdünnung WB	aus Spezies	Hersteller und Bestellnummer	Größe
Akt (pan) (40D4)	1:2000 in (4)	Maus (mk)	Cell Signaling Best.-Nr. 2920	60 kDa
Caveolin 1	1:2000 in (3)	Maus (mk)	BD Transduction Best.-Nr. 610406	21/24 kDa
ERK 2 (C-14)	1:2000 in (3)	Rabbit (pk)	Santa Cruz Best.-Nr. sc-154	42 kDa

GAPDH (FL-335)	1:4000 in (3)	Rabbit (pk)	Santa Cruz Best.-Nr. sc-25778	38 kDa
GFP	1:1000 in (3)	Rabbit (pk)	Cell Signaling Best.-Nr. 2555	27 kDa
GFP	1:1000 in (3)	Maus (mk)	Roche Best.-Nr. 11814460001	27 kDa
GFP-HRP	1:3000 in (4)	Maus (mk)	Miltenyi-Biotec Best.-Nr. 130-091-833	27 kDa
HA (12CA5)	1:10 in (4)	Maus (mk)	Hybridomaüberstand	
HA-HRP	1:3000 in (4)	Maus (mk)	Miltenyi-Biotec Best.-Nr. 130-091-972	
Human Gal-1	1:1000 in (2)	Ziege (pk)	R&D Systems Best.-Nr. AF1152	14,5 kDa
Human Gal-3	1:1000 in (2)	Ziege (pk)	R&D Systems Best.-Nr. AF1154	29 kDa
Human Gal-8	1:1000 in (2)	Maus (mk)	R&D Systems Best.-Nr. MAB1305	36/40 kDa
human JNK1	1:500 in (4)	Maus (mk)	Cell Signaling Best.-Nr. 3708	46 kDa
K-Ras-2B (C-19)	1:500 in (4)	Rabbit (pk)	Santa Cruz Best.-Nr. sc-521	21 kDa
MDM2 (3G9)	1:1000 in (4)	Maus (mk)	Millipore Best.-Nr. 04-1530	75/90 kDa
MDM2 (SMP14)	1:100 in (4)	Maus (mk)	Santa Cruz Best.-Nr. sc-965	90 kDa
p38 α	1 :1000 in (4)	Maus (mk)	BD Transduction Best.-Nr. 612168	42 kDa
p53 (DO1)	1:100 in (4)	Maus (mk)	Hybridomaüberstand	53 kDa
pan ERK	1:2000 in (4)	Maus (mk)	BD Transduction Best.-Nr. 610124	42/44 kDa
Pan-Ras (Ab-3)	1:1000 in (3)	Maus (mk)	Calbiochem Best.-Nr. OP40	21 kDa
Phospho-Akt (S473)	1:2000 in (4)	Rabbit (pk)	Cell Signaling Best.-Nr. 9271	60 kDa
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP [®]	1:2000 in (4)	Rabbit (mk)	Cell Signaling Best.-Nr. 4060	60 kDa
Phospho-MDM2 (Ser166)	1 :1000 in (4)	Rabbit (pk)	Cell Signaling Best.-Nr. 3521	90 kDa
Phospho-p38 MAPK (T180/Y182) (D3F9) XP [®]	1 :2000 in (4)	Rabbit (mk)	Cell Signaling Best.-Nr. 4511	43 kDa
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (3D7)	1:1000 in (4)	Rabbit (mk)	Cell Signaling Best.-Nr. 9215	43 kDa

Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP [®]	1:2000 in (4)	Rabbit (mk)	Cell Signaling Best.-Nr. 4370	42/44 kDa
Phospho-p53 (Ser15)	1:1000 in (4)	Rabbit (pk)	Cell Signaling Best.-Nr. 9284	53 kDa
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)	1:1000 in (4)	Rabbit (pk)	Cell Signaling Best.-Nr. 2211	32 kDa
Phospho-SAPK/ JNK (Thr183/Tyr185)	1:1000 in (4)	Rabbit (mk)	Cell Signaling Best.-Nr. 4671	46/54 kDa
Rho GDI α (K-21)	1:500 in (3)	Rabbit (pk)	Santa Cruz Best.-Nr. sc-359	30 kDa
S6 Ribosomal Protein (54D2)	1:2000 in (4)	Maus (mk)	Cell Signaling Best.-Nr. 2317	32 kDa
α -Tubulin (B-5-1- 2)	1:5000 in (3)	Maus (mk)	Sigma-Aldrich Best.-Nr. T5168	50 kDa
β -Aktin (AC-15)	1:5000 in (3)	Maus (mk)	Sigma-Aldrich Best.-Nr. A5441	42 kDa

(1): 0,5 % (m/V) Milchpulver in TBS

(2): 2 % (m/V) *ECLTM Blocking Agent* (GE Healthcare, Freiburg) in TBS

(3): 0,3 % (m/V) BSA in TBS

(4): 3 % (m/V) BSA in TBST

2.11. Sekundäre Antikörper

Alle Sekundärantikörper wurden in TBS verdünnt.

2.11.1. 680LT-gekoppelte Antikörper

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G

Antikörper und Verdünnung	Eigenschaften	Hersteller und Bestellnummer
anti-Maus IgG 680LT Verdünnung: 1:150000	IgG-Fraktion aus Ziegen-Antiserum	LI-COR GmbH, Bad Homburg vor der Höhe Best.-Nr. 926-68020
anti-Rabbit IgG 680LT Verdünnung: 1:200000	IgG-Fraktion aus Ziegen-Antiserum	LI-COR GmbH, Bad Homburg vor der Höhe Best.-Nr. 926-68021

2.11.2. 800CW-gekoppelte Antikörper

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G

Antikörper und Verdünnung	Eigenschaften	Hersteller und Bestellnummer
anti-Maus IgG 800CW Verdünnung: 1:150000	IgG-Fraktion aus Ziegen-Antiserum	LI-COR GmbH, Bad Homburg vor der Höhe Best.-Nr. 926-32210
anti-Rabbit IgG 800CW Verdünnung: 1:150000	IgG-Fraktion aus Ziegen-Antiserum	LI-COR GmbH, Bad Homburg vor der Höhe Best.-Nr. 926-32211

2.11.3. Peroxidase (-HRP) gekoppelte Antikörper

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

Antikörper und Verdünnung	Eigenschaften	Hersteller und Bestellnummer
anti-Maus IgG, HRP- <i>linked</i> Verdünnung: 1:5000	IgG-Fraktion aus Pferde-Antiserum	New England Biolabs, Frankfurt am Main Best.-Nr. 7076
anti-Rabbit IgG, HRP- <i>linked</i> Verdünnung: 1:5000	IgG-Fraktion aus Ziegen-Antiserum	New England Biolabs, Frankfurt am Main Best.-Nr. 7074
Anti-Ziege IgG, HRP	IgG-Fraktion aus Kaninchen-Antiserum	Pierce Biotechnology, Rockford, USA

2.11.4. Alkalische Phosphatase-gekoppelte Antikörper

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G

Antikörper und Verdünnung	Eigenschaften	Hersteller und Bestellnummer
anti-Maus IgG, Verdünnung: 1:1000	affinitätsgereinigt aus Ziegen-Antiserum	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. A 5278
anti-Rabbit IgG, Verdünnung: 1:1000	affinitätsgereinigt aus Ziegen-Antiserum	Sigma, Taufkirchen Best.-Nr. A 6154

2.12. Inhibitoren

Inhibitor	(1) Stammlösung (2) Endkonzentration	Hersteller und Bestellnummer
FTS (Farnesylthiosalicylsäure), Inhibitor der Membran- bindung von farnesyliertem Ras	(1) 50 mM in DMSO (2) 75 μ M	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA Best.-Nr. 10010501
LY294002, PI3-Kinase- Inhibitor	(1) 10 mM in Methanol (2) 20 μ M	Alexis Biochemicals, Grünberg Best.-Nr. 270-038-M005
PD98059, MEK1-Inhibitor	(1) 50 mM in DMSO (2) 25 μ M	New England Biolabs, Beverly, USA Best.-Nr. 9900
Pifithrin- α , p53-Inhibitor	(1) 100 mM in DMSO (2) 25 μ M	Alexis Biochemicals, Grünberg Best.-Nr. 270-287-M010
Rapamyzin, mTOR-Inhibitor	(1) 100 μ M in Methanol (2) 1 nM	Alexis Biochemicals, Grünberg Best.-Nr. 380-004-C100

SB203580, p38-Inhibitor	(1) 10 mM in DMSO (2) 4 µM	Alexis Biochemicals, Grünberg Best.-Nr. 270-179-M005
SP600125, JNK-Inhibitor	(1) 50 mM in DMSO (2) 25 µM	New England Biolabs, Beverly, USA Best.-Nr. 8177
U0126, MEK1/2-Inhibitor	(1) 1 mM in DMSO (2) 10 µM	Tocris Cookson, Ellisville, USA Best.-Nr. 1144

2.13. siRNA

siRNA	Sequenz	Hersteller und Bestellnummer
Gal-3 si-7	FlexiTube siRNA (Hs_LGALS3_7) <i>sense</i> 5'-CAUCAAUAUCCCUCUUGUATT-3' <i>antisense</i> 3'-UACAAGAGGGGAUUAUGAUGAA-5'	Qiagen, Hilden Best.-Nr. SI04250799
Gal-3 si-8	FlexiTube siRNA (Hs_LGALS3_8) <i>sense</i> 5'-CGCUUCAUGAGAACAACATT-3' <i>antisense</i> 3'-UGUUGUUCUCAUUGAAGCGTG-5'	Qiagen, Hilden Best.-Nr. SI04366124
Gal-8 si-5	FlexiTube siRNA (Hs_LGALS8_5) <i>sense</i> 5'-GACGAACUGUCGUCGUUAATT-3' <i>antisense</i> 3'-UUAACGACGACAGUUCGUCCA-5'	Qiagen, Hilden Best.-Nr. SI03237339
Gal-8 si-8	FlexiTube siRNA (Hs_LGALS8_8) <i>sense</i> 5'-GGUUGCAGUAAAUGGCGUATT-3' <i>antisense</i> 3'-UACGCCAUUUACUGCAACCTT-5'	Qiagen, Hilden Best.-Nr. SI04356506
Kontroll-siRNA	<i>AllStars Neg. siRNA Rhodamine</i> Sequenz geschützt	Qiagen, Hilden Best.-Nr. 1027291

2.14. Transfektionsreagenzien

Transfektionsreagenz	Geeignete Zelllinien	Hersteller und Bestellnummer
JetPEI	HEK-293	Polyplus-transfection SA, Illkirch, Frankreich Best.-Nr. 101-40N
DMRIE-C	PANC-1	Invitrogen, Groningen, Niederlande Best.-Nr. 10459014
peqFECT DNA	PANC-1	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen Best.-Nr. 13-8010
peqFECT siRNA	PANC-1 A549	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen Best.-Nr. 13-8110
Lipofectamine [®] RNAiMAX	A427	Life Technologies, Darmstadt Best.-Nr. 13778030

2.15. Plasmide

2.15.1. Eukaryotische Expressionsvektoren

Plasmid	Herkunft
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3/Galektin-3	Arbeitsgruppe Prof. Klaudia Giehl
pcDNA3/Galektin-8 long	Arbeitsgruppe Prof. Klaudia Giehl
pcDNA3/Galektin-8 short	Arbeitsgruppe Prof. Klaudia Giehl
pcDNA3/HA-ERK2	Arbeitsgruppe Prof. Klaudia Giehl
pEGFP-C1	Clontech, Heidelberg
pEGFP-C1/Galektin-8 long Kon 2	generiert im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C1/Galektin-8 short Kon 4	generiert im Rahmen dieser Arbeit
pEGFP-C1	Clontech, Heidelberg
pEGFP-C1/K-Ras(G12V)	Arbeitsgruppe Prof. Klaudia Giehl
pEGFP-C1/K-Ras(G12V,C185S)	Arbeitsgruppe Prof. Klaudia Giehl
pEGFP-C1/K-Ras(S17N)	Arbeitsgruppe Prof. Klaudia Giehl
pEGFP-C1/K-Ras(S17N,C185S)	Arbeitsgruppe Prof. Klaudia Giehl
pmCherry-C1	Clontech, Heidelberg
pmCherry-C1/Galektin-8 long Kon 1	generiert im Rahmen dieser Arbeit
pmCherry-C1/Galektin-8 short Kon 1	generiert im Rahmen dieser Arbeit

3. Methoden

3.1. Mikrobiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung, Anzucht und Selektion von Bakterien

Bei den für diese Arbeit verwendeten Bakterien handelt es sich um die Derivate TOP10 und BL21 (DE3) des *Escherichia coli* K12 Sicherheitsstammes. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in Lysogeny-Broth (LB)-Medium.

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

Zur Anzucht einer Übernacht- (ÜN-) Kultur wurden 4 ml autoklaviertes LB-Medium in ein Bakterienröhrchen vorgelegt. Zur Selektion wurde dem Medium entsprechend der Plasmidresistenz ein Antibiotikum zugesetzt. Aufgrund der Hitzeinstabilität von Antibiotika sollte das Medium vor dessen Zugabe eine Temperatur von weniger als 50 °C erreicht haben. Die Endkonzentration für Ampizillin betrug 100 µg/ml, die für Kanamycin 50 µg/ml. Die Überimpfung des Bakterienzellmaterials von einer Agarplatte in das Bakterienröhrchen erfolgte mittels einer sterilen Impföse oder einer sterilen Pipettenspitze. Im Anschluss wurde die Bakterienkultur ÜN auf einem Schüttler bei 200 Umdrehungen pro Minute (Upm) bei 37 °C inkubiert. Danach konnte die Bakteriensuspension etwa eine Woche bei 4 °C gelagert werden oder in ein größeres Volumen überimpft werden.

Eine längerfristige Art der Bakterienlagerung bieten die Agarplatten. Dazu wurde dem LB-Medium Agar (0,5 % Agar-Agar) beigemischt, welcher zu einem festen Nährboden wurde, auf dem die Bakterien mit Hilfe eines Drygalsky-Spatels ausgestrichen wurden. Die Inkubation erfolgte ebenfalls ÜN bei 37 °C in einem Brutschrank.

3.1.2. Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien des Stammes *E. coli* TOP10 oder BL21 (DE3) wurde eine Einzelkolonie in 3 ml LB-Medium (Vorkultur) überimpft und ÜN unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit der Vorkultur angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 inkubiert und im Anschluss bei 3000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml eisgekühlter und steriler 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten zehnmündigen Zentrifugation bei 3000 x g und 4 °C wurde das Pellet in

5 ml eisgekühlter und steriler 100 mM CaCl₂-Lösung mit 30 % (V/V) Glycerin resuspendiert. Die nun kompetenten Zellen wurden in 600 µl Aliquots in einem Ethanol-Trockeneisbad schock gefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Lösungen

100 mM CaCl₂
100 mM CaCl₂ mit 30 % (V/V) Glycerin

3.1.3. Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation wurden zunächst 200 µl der bei -80 °C gelagerten kompetenten *E. coli* Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 0,2- 0,4 µg der zu transformierenden DNA sowie 100 µl eiskaltem TCM-Puffer versetzt. Die Bakteriensuspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42 °C für 1 min ausgesetzt. Durch den Hitzeschock wird die Bakterienmembran permeabilisiert. Um den Bakterien die Aufnahme der Plasmid-DNA zu ermöglichen, wurde der Ansatz 1 min auf Eis inkubiert, dann mit 700 µl LB-Medium versetzt und für 45 min bei 37 °C und 200 Upm inkubiert.

Abschließend wurden 100-300 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen und ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

TCM-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 7,5
10 mM CaCl₂
10 mM MgCl₂

3.1.4. Plasmidisolierung

Nach der Vermehrung der Plasmid-DNA in Bakterienkulturen wurden diese mittels alkalischer Lyse wieder isoliert (Birnboim und Doly, 1979). In der vorliegenden Arbeit wurde zur DNA-Isolierung das QIAGEN[®] *Plasmid Midi Kit* (Qiagen, Hilden) und zur Aufkonzentrierung das NucleoBond[®] *Finalizer Kit* (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgten nach Herstellerangaben.

3.1.5. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration einer 1:100 in ddH₂O verdünnten DNA Lösung wurde photometrisch in einer Quarzküvette am BioRad SmartSpec[™] 3000-DNA-Photometer bestimmt. Als Referenzlösung diente ebenfalls ddH₂O. Die DNA-Konzentration errechnet sich aus der gemessenen Extinktion bei 260 nm wie folgt:

$$c_{\text{dsDNA}} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260 \text{ nm}} \times 50 \mu\text{g} \times \text{VF} / 1000 \text{ ml}$$

(c_{dsDNA} : Konzentration der doppelsträngigen DNA; VF: Verdünnungsfaktor; $\text{OD}_{260\text{nm}}$: Optische Dichte bei 260 nm)

Die Reinheit der DNA-Lösung wird durch den 260 nm/280 nm-Quotienten bestimmt. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0, so handelt es sich um eine reine DNA-Lösung.

3.1.6. Klonierung von Plasmidkonstrukten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Galektin cDNAs (Inserts) aus pcDNA3/Galektin-8 short und pcDNA3/Galektin-8 long in die Vektoren pECFP-C1 und pmCherry-C1 eingefügt. Dazu wurden die Insert-DNAs mittels der Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *EcoRV* aus den Ursprungsvektoren restringiert. Die Zielvektoren wurden mit *KpnI* und *SmaI* verdaut.

3.1.7. DNA-Restriktion

Alle hier verwendeten Restriktionsendonukleasen des Typs II sind bakteriellen Ursprungs. Sie heften sich an eine meist 4-6 Nukleotide lange spezifische Erkennungsstelle und spalten hydrolytisch die DNA-Phosphodiesterbindungen. Es entstehen Fragmente mit klebrigen (*sticky ends*; durch Restriktion mit *KpnI*) oder glatten (*blunt ends*; durch Restriktion mit *SmaI* und *EcoRV*) Enden. Die Enzymaktivität ist von der Temperatur, dem pH-Wert und der Salzkonzentration abhängig. Für optimale Bedingungen wurden in der Restriktion die empfohlenen 10fach Puffer der Hersteller eingesetzt. Die Restriktion erfolgte bei 37 °C für 1 h.

Restriktionsansatz	
DNA	1 μg
Restriktionsendonuklease 1	1 U
Restriktionsendonuklease 2	1 U
10fach Reaktionspuffer	2 μl
ddH ₂ O	ad. 20 μl

Im Anschluss wurde der Restriktionsansatz in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.1.8. Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich ein DNA-Gemisch anhand der Fragmentgrößen aufzutrennen. Mit steigender Agarosekonzentration wird das Gel immer feinporiger. Kleinere Fragmente wandern wegen ihres geringeren Widerstandes schneller zur Anode als größere Fragmente. Ebenso verantwortlich für die Laufgeschwindigkeit der Plasmid-DNA ist ihr Kondensationszustand. Im *supercoiled* Zustand sind die Plasmide am dichtesten und wandern deshalb am schnellsten. Linearisierte Plasmide zeigen das langsamste und *open circle* Plasmide ein moderates Laufverhalten.

50x TAE- (Trisacetat-) Puffer
40 mM Tris/HCl, pH 8,0
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA

Es wurden 1 %ige Agarosegele verwendet zu dessen Herstellung 1 % (m/V) Agarose in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst wurden. Nach Abkühlung der Lösung auf etwa 50 °C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 % hinzugegeben. Die noch warme Lösung wurde luftblasenfrei in einen Gelschlitten gegossen und ein Probenkamm wurde eingesetzt. Nach dem Polymerisieren wurde das Gel in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und die zu trennenden Proben mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt.

6x DNA-Ladepuffer
0,25 % (m/V) Orange G
50 % (V/V) Glycerin
1 mM EDTA

Durch das Mitführen des Lambda *EcoRI/HindIII* Markers entstanden bei der Auftrennung Banden mit definierten DNA-Mengen, anhand derer die DNA-Menge der Probe abgeschätzt werden konnte. Die konstante Spannung für einen Gellauf betrug 80 V. Im Anschluss wurde die aufgetrennte DNA bei 254 nm sichtbar gemacht.

3.1.9. Gelextraktion

Die DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA-Fragmente aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits* (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben. Darauf folgend wurde die Konzentration der eluierten DNA gemessen und konnte in der Ligation eingesetzt werden.

3.1.10. Ligation

Während der Ligation wurden die zuvor eluierten Inserts und Vektoren mittels der T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft. Das dafür erforderliche ATP und Mg^{2+} stammt aus dem 10fach T4-Ligasepuffer.

Ligationsansatz	
restringiertes Akzeptorplasmid	50 ng
restringiertes Insert	3-5facher molarer Überschuss
T4-DNA-Ligase	1 U
10fach T4-Ligasepuffer	1 μ l
ddH ₂ O	ad. 10 μ l

Die Ligation erfolgte bei 16 °C ÜN. Am folgenden Tag wurden die Ligationsansätze in *E. coli* TOP10 transformiert und auf Agarplatten ausgestrichen.

Um zu überprüfen, ob die gewünschte cDNA tatsächlich mit dem Vektor verknüpft wurde, wurden von den Agarselektionsplatten einzelne Kolonien der mit den Ligationsansätzen transformierten *E. coli* TOP10 in eine Schüttelkultur überimpft und ÜN bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mittels des *QIAprep® Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt, mit dem Restriktionsenzymen *EcoRI* restringiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Stimmt die im Agarosegel erhaltenen Fragmentgrößen mit der errechneten Größe überein, so wurde die Plasmid-DNA zur weiteren Überprüfung durch die Firma GATC Biotech sequenziert.

3.2. Zellbiologische und proteinbiochemische Methoden

3.2.1. Anzucht, Kultivierung und Lagerung eukaryotischer Zellen

Alle hier verwendeten Zellen wurden bei 37 °C, 90 % relativer Luftfeuchtigkeit und 8 % CO₂ inkubiert. Damit die Zellen optimal mit Nährstoffen versorgt wurden, wurde bis zum Erreichen der Konfluenz das Wachstumsmedium etwa alle zwei Tage erneuert.

Wachstumsmedium	
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, high glucose)</i>	
10 % (V/V) fötales Kälberserum (FCS)	
1 % (V/V) MEM <i>Non-essential Amino Acids</i> (100x)	
1% (V/V) GlutaMAX™ (200 mM L-alanyl-L-Glutamin)	

Für die verwendeten stabil transfizierten Zelllinien PANC-1/EGFP-21, PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Klon 4.1 und PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Klon 4.4 wurde dem Wachstumsmedium zusätzlich das Antibiotikum Genetizin (G-418) beigemischt.

3.2.2. Auftauen eukaryotischer Zellen

Zur längerfristigen Lagerung der Zellen, können diese in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert werden. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen wurden diese rasch bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit etwa 3 ml Wachstumsmedium versetzt. Die Zellsuspension wurde für 3 min bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 5 ml Wachstumsmedium aufgenommen. Schließlich wurde die Zellsuspension zur Kultivierung in einer geeigneten Verdünnung in eine Kulturschale mit Wachstumsmedium überführt und inkubiert.

3.2.3. Passagieren eukaryotischer Zellen

Damit Zellen, die bis zur Konfluenz gewachsen sind nicht das Wachstum einstellen oder absterben, wird die Kultur passagiert, d. h. in neue Kulturgefäße ungesetzt. Dafür wurden die Zellen mit 10 ml 1x CMF-PBS gewaschen, um letzte Medienreste zu entfernen, da das darin enthaltene FCS die folgende Trypsinierung beeinträchtigen kann.

<p>1 x CMF-PBS (Calcium- und Magnesium-freie Phosphat-gepufferte Saline)</p> <p>140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O 15 mM KH₂PO₄ pH 7,4</p>

<p>Trypsinlösung</p> <p>0,05 % (m/V) Trypsin 0,25 % EDTA</p>

Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Wachstumsmedium bzw. des darin enthaltenen FCS gestoppt. Zur Entfernung der EDTA-Reste wurde die Zellsuspension für 3 min bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in ca. 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert und in einer geeigneten Verdünnung in ein neues Kulturgefäß ausgesät. Um die Zellen gleichmäßig zu verteilen wurde das Kulturgefäß kreuzförmig geschwenkt.

3.2.4. Einfrieren eukaryotischer Zellen

Zur längerfristigen Lagerung wurden von den verwendeten Zelllinien Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden die Zellen abtrypsiniert (s. 3.2.3.) und das Zellpellet in 1,6 ml Wachstumsmedium mit 20 % FCS resuspendiert. Anschließend wurde langsam und

tropfenweise unter Schwenken der Suspension DMSO in einer Endkonzentration von 10 % (V/V) zugegeben. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen gegeben und dieses in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriercontainer langsam auf -80 °C gekühlt. Zur Langzeitlagerung wurden die Kulturen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.5. Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen abtrypsiniert (s. 3.2.3.), 10 µl der Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer überführt und die Anzahl der Zellen aus vier Großquadraten ermittelt. Die Anzahl der Zellen pro ml ergibt sich aus dem Mittelwert der gezählten Zellen multipliziert mit 10^4 .

3.2.6. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eukaryotische Zellen transient mit peqFECT DNA (PEQLAB Biotechnology, Erlangen), peqFECT siRNA (PEQLAB Biotechnology, Erlangen), DMRIE-C (Invitrogen, Groningen), JetPEI (Polyplus-transfection SA, Illkirchen) oder Lipofectamine[®] RNAiMAX (Life Technologies, Darmstadt) nach den folgenden Kurzprotokollen und Herstellerangaben transfiziert:

Zellen	Zellzahl	DNA	Reagenz	Lösungsmittel	Wachstumsmedium
PANC-1	4 x 10 ⁵ /Loch (6-Loch-zellkulturplatte)	4 µg	6 µl peqFECT DNA	400 µl DMEM	1 ml
PANC-1	3 x 10 ⁶ /Loch (10 cm Zellkulturschale)	10 µg	16 µl peqFECT DNA	800 µl DMEM	5 ml
PANC-1	4 x 10 ⁵ /Loch (6-Loch-zellkulturplatte)	2 µg	5 µl DMRIE-C	200 µl OptiMEM I	1 ml
HEK293	4 x 10 ⁵ /Loch (6-Loch-zellkulturplatte)	2,5 µg	4,5 µl JetPEI	200 µl 150 mM NaCl	1 ml
HEK293	3 x 10 ⁶ /Loch (10 cm Zellkulturschale)	10 µg	16 µl JetPEI	1 ml 150 mM NaCl	1 ml

Zellen	Zellzahl	siRNA	Reagenz	Lösungsmittel	Wachstumsmedium
PANC-1	4 x 10 ⁵ /Loch (6-Loch-zellkulturplatte)	50-100 nM	5 µl peqFECT siRNA	400 µl DMEM	1 ml
A549	4 x 10 ⁵ /Loch (6-Loch-zellkulturplatte)	50 nM	4 µl peqFECT siRNA	400 µl DMEM	2 ml
A427	4 x 10 ⁵ /Loch (6-Loch-zellkulturplatte)	50 nM	5 µl Lipofectamine® RNAiMAX	500 µl OptiMEM I	1,5 ml

3.2.7. Herstellung von Zelllysaten

Zur Isolierung der zellulären Proteine wurden die Zellen lysiert. Zunächst wurden die Zellen mit kaltem TBS gewaschen. Die Lyse erfolgte durch die Zugabe von 75 µl bzw. 400 µl *radioimmunoprecipitation assay* (RIPA)-Puffer pro 6-Lochzellkulturplatte bzw. 10 cm Kulturschale.

TBS (*Tris buffered saline*)
 10 mM Tris/HCl
 150 mM NaCl
 pH 7,5

1x RIPA-Puffer
 50 mM Tris/HCl, pH 7,0
 150 mM NaCl
 0,1 % (V/V) SDS
 1 % (V/V) Triton® X-100
 0,5 % (m/V) Na-Deoxycholat
 1,39 mM Pefabloc
 15 µM Aprotinin
 21 µM Leupeptin
 50 µM Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)

Die Zellen wurden mittels eines Zellschabers von Boden gelöst und in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden die Zellen durch mehrmaliges aufziehen mit einer Tuberkulinspritze (Kanüle: 25 G) homogenisiert und für 10 min bei 4 °C und 16100 x g pelletiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen löslichen Proteinen wurde in ein ebenfalls vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, während das Pellet, bestehend aus den unlöslichen Zellbestandteilen verworfen wurde. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein *Bicinchoninic-Acid Protein Assay* (BCA) durchgeführt (s. 3.2.8). Die so hergestellten Zelllysate wurden entweder sofort in der SDS-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese analysiert oder in flüssigem Stickstoff schock gefroren und für spätere Versuche bei -80 °C gelagert.

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

Bei dieser Methode macht man sich die quantitative Reduktion von zweiwertigen (Cu^{2+}) zu einwertigen (Cu^+) Kupferionen in Anwesenheit von Proteinen zu nutze. Bei der Chelatbildung von zwei Molekülen der Bicinchoninsäure mit einem Cu^+ -Ion entsteht ein violette Reaktionsprodukt, dessen Absorption bei 562 nm photometrisch erfasst werden kann. Die Intensität der Färbung verläuft nahezu linear mit der Proteinkonzentration in der Probe. Um diese zu ermitteln wurde eine Eichreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) in einer 96-Lochmikrotiterplatte erstellt. Es wurden 0 μl , 2 μl , 4 μl , 6 μl , 8 μl , 10 μl und 12,5 μl einer 2 mg/ml BSA-Lösung mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 μl aufgefüllt. Die Proben wurden zur Messung 1:10 mit ddH₂O verdünnt und jeweils 20 μl in die 96-Lochmikrotiterplatte pipettiert. Sowohl zur Eichreihe als auch zu den Proben wurden 180 μl der BCA-Arbeitslösung zugegeben. Zur Herstellung der BCA-Arbeitsreagenz wurden 50 Volumenteile der *Pierce BCA Protein Assay Reagent A* (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) und ein Volumenteil 4 % (m/V) Kupfer-II-Sulfat-Lösung vermengt. Es folgte eine Inkubation der 96-Lochmikrotiterplatte bei 37 °C für 30 min. Die Messung der Absorption erfolgte im ELx800 *Absorbance Microplate Reader*. Anhand der Berechnung einer Geradengleichung aus den Eichwerten konnte die Proteinkonzentration in den Proben ermittelt werden.

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

Hierbei handelt es sich um eine Methode zur Trennung von Proteingemischen (Laemmli, 1970). Die hier zum Einsatz gekommenen Gele bestehen aus einem Trenn- und einem Sammelgel mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen, wodurch die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine beeinflusst wird. Die Angaben in Tabelle 1 beziehen sich jeweils auf vier Trenn- bzw. Sammelgele:

Tab. 3.1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE.

	Trenngel 10 %	Trenngel 12,5 %	Sammelgel
30 % (m/V) Acrylamidlösung	13 ml	16,25 ml	0,76 ml
2 % (m/V) Bisacrylamidlösung	5 ml	6 ml	0,3 ml
3 M Tris/HCl, pH 8,8	5 ml	5 ml	-
1 M Tris/HCl, pH 6,8	-	-	0,76 ml
10 % (m/V) SDS	0,4 ml	0,4 ml	0,06 ml
60 % (m/V) Saccharose	-	-	1,5 ml
ddH ₂ O	16,5 ml	12,25	2,6 ml
TEMED	40 µl	40 µl	8 µl
10 % (m/V) Ammoniumpersulfat (APS)	250 µl	250 µl	80 µl
Trennbereich	30-130 kDa	20-100 kDa	-

Damit die zu analysierenden Proben im Gel aufgetrennt werden konnten, wurden sie zunächst in 5x Probenpuffer aufgenommen (Endkonzentration 1x).

<p style="text-align: center;">5x SDS-Probenpuffer</p> <p>200 mM Tris/HCl, pH 8,8 5 mM EDTA 1 M Saccharose 1 mM DTT 2 % (m/V) SDS 0,1 % (m/V) Bromphenolblau</p>
--

Die Proben wurden 5 min bei 95 °C erhitzt, was zur Denaturierung der Sekundär- und Tertiärstrukturen führte.

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde in eine vertikale Laufkammer eingespannt und diese mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Für die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist ausschließlich ihre Größe ausschlaggebend.

<p style="text-align: center;">1x SDS-Laufpuffer</p> <p>50 mM Tris 0,5 M Glyzin 0,1 % (m/V) SDS</p>
--

3.2.10. Coomassie-Färbung

Der anionischen Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue R-250* bindet an kationische, hydrophobe Bereiche von Proteinen. Mit dieser Methode können Proteine in SDS-Gelen gefärbt werden.

Coomassie-Färbelösung
10 % (V/V) Essigsäure
25 % (V/V) Isopropanol
0,025 % (m/V) <i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>

Die Gele wurden ÜN in der Färbelösung bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Gel unter den gleichen Bedingungen mit der Entfärbelösung so lange inkubiert, bis der Hintergrund vollständig entfärbt war.

Coomassie-Entfärbelösung
10 % (V/V) Eisessig
12,5 % (V/V) Isopropanol

3.2.11. Immunoblotting von Proteinen

Zur Immundetektion der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mussten diese zunächst auf eine Nitrozellulosemembran (*Protran BA85 Nitrocellulose Transfer Membrane*) transferiert werden. Dazu wurden das Trenngel, vier Whatman[®]-Papiere, die Membran sowie acht dünne Schwammtücher in Transferpuffer äquilibriert.

Transferpuffer
25 mM Tris/HCl
0,1 % (m/V) SDS
1,5 % (m/V) Glycin
20 % (V/V) Methanol

Die Aufschichtung der einzelnen Lagen im *Blotting*-Gitter war wie folgt: 4 Schwammtücher, 2 Whatman[®]-Papiere, Nitrozellulosemembran, Gel, 2 Whatman[®]-Papiere, 4 Schwammtücher. Dabei war darauf zu achten, dass das Gel luftblasenfrei auf die Nitrozellulosemembran gebracht wurde, um einen gleichmäßigen Proteintransfer zu gewährleisten. Das *Blotting*-Gitter wurde so in eine mit Transferpuffer befüllte Miniblottkammer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingespannt, dass die Nitrozellulosemembran auf der Seite der Anode liegt. Es wurde nun eine konstante Spannung von 100 V angelegt, die die durch das SDS negativ geladenen Proteine auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Die zeitliche Länge des Transfers richtete sich nach der Größe der Proteine. Bei Proteinen mit einer Größe von bis zu

60 kDa erfolgte der Transfer für 1 h, bei Proteinen, die größer als 60 kDa waren erfolgte die Übertragung für 2,5 h.

3.2.12. Proteindetektion mit spezifischen Antikörpern

Zur Kontrolle des Proteintransfers und zum Anzeichnen des Proteinstandards wurde die Membran mit den nun immobilisierten Proteinen reversibel mit einer Ponceau S-Lösung angefärbt.

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

Die vollständige Entfärbung erfolgte in 1x TBS. Zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen wurde die Membran für 1 h in 5 % (m/V) Magermilchpulver in 1x TBS bei Raumtemperatur inkubiert. Im Falle der Galektin-Detektion erfolgte dieser Inkubationsschritt in 2 % (m/V) *ECLTM Blocking Agent* (GE Healthcare, Freiburg) in 1x TBS. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Primärantikörper. Die verwendeten Antikörperverdünnungen und -lösungen sind dem Kapitel 2.10 zu entnehmen. Die Inkubation der entsprechenden Primärantikörper erfolgte ÜN bei 4 °C unter Schütteln auf einer Wippe. Der Primärantikörper wurde durch einmaliges Waschen mit 1x TBS-T (1x TBS versetzt mit 0,1 % Tween[®] 20) und zweimaliges Waschen mit 1x TBS für jeweils 10 min unter Schütteln entfernt. Die Inkubation der Sekundärantikörper, deren Verdünnungen dem Kapitel 2.11 entnommen werden können, erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h und ebenfalls unter Schütteln. Der Sekundärantikörper wurde, wie schon für den Primärantikörper beschrieben, durch dreimaliges Waschen entfernt. Die Detektion der Proteine richtete sich nach der Modifikation des Sekundärantikörpers. Ist dieser an eine Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, so wurde das SuperSignal[®] *West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) verwendet. Die *Luminol/Enhancer Solution* und die *Stable Peroxide Solution* wurden entsprechend den Herstellerangaben 1:1 gemischt und die Membran darin ca. 2 min inkubiert. Dabei setzt die HRP das in der Entwicklerlösung enthaltene Luminol in einer Oxidationsreaktion zu Licht um, was in einer Schwärzung der Banden im Fusion SL4-3500.WL *Chemiluminescence Imagingsystem* (Vilber Lourmat) sichtbar wird. War die Sensitivität des SuperSignal[®] *West Pico Chemiluminescent Substrate* nicht ausreichend, so wurde das *ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Merck Millipore, Darmstadt) verwendet. Das *HRP Substrate Luminol Reagent* und die *HRP*

Substrate Peroxide Solution wurden ebenfalls 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Die Detektion der Proteine erfolgte ohne weitere Inkubation ebenfalls im Fusion SL4-3500.WL *Chemiluminescence Imagingsystem* (Vilber Lourmat).

Ist der Sekundärantikörper an eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt, so wurde die Membran nach dessen Inkubation 3 x für je 10 min mit AP-Puffer gewaschen.

<p style="text-align: center;">AP-Puffer 50 mM Tris/HCl pH 9,4 50 mM MgCl₂</p>
--

<p style="text-align: center;">NBT-Lösung 1 % (m/V) NBT (4-Nitroblautetrazoliumchlorid) in H₂O</p>
--

<p style="text-align: center;">BCIP-Lösung 0,5 % (m/V) BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) in H₂O</p>

Zur Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe wurden sowohl 1 Volumenteil (VT) NBT- als auch 1 VT BCIP-Lösung zu 25 VT AP-Puffer gegeben. Das Gemisch wurde auf die Membran gegeben und lichtgeschützt so lange inkubiert, bis die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase-Antikörper-Komplexe zu einer Anfärbung der Proteine auf der Membran führte. Die Reaktion wurde durch Abspülen der Entwicklerlösung mit H₂O gestoppt. Die Inkubation sollte die Dauer von 30 min nicht überschreiten.

Eine weitere Modifikation der Sekundärantikörper ist die Kopplung an Fluoreszenzfarbstoffe. Die Inkubation dieser Antikörper erfolgte ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur und unter schütteln. Nach bereits beschriebenem dreimaligem Waschen mit TBS-T bzw. TBS kann die Membran direkt in das *Odyssey[®] Sa Infrared Imaging System* (LI-COR) eingelegt werden. Die an die Antikörper gekoppelten Fluorophore wurden durch Licht eines Infrarotlasers angeregt und die Banden in den Fluoreszenzdetektionskanälen angezeigt. Da in diesem System mit zwei verschiedenen Wellenlängen (700 nm und/oder 800 nm) gearbeitet wurde, konnten z. B. verschiedene Proteine gleichzeitig detektiert werden, sofern die Primärantikörper unterschiedlicher Spezies entstammten.

3.2.13. Elution gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran

Für die erneute Inkubation der Nitrozellulosemembran mit weiteren Antikörpern mussten die zuvor an die Proteine gebundenen Antikörper entfernt werden. Dazu wurde die Membran 5 min in Elutionspuffer unter Schütteln inkubiert.

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

Folgend wurde die Membran jeweils für 10 min zweimal in einem großen Volumen H₂O und einmal mit TBS gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen des Immunblots konnten erneut abgesättigt werden und die Inkubation mit weiteren Primär- und Sekundärantikörpern folgte.

3.2.14. Immunpräzipitation

Mittels spezifischer Antikörper können Proteine (Antigene) aus Zelllysaten in der Immunpräzipitation (IP) angereichert werden. Zunächst wurde die Zelllinie PANC-1 transient mit pEGFP/K-Ras(G12V), pEGFP/Gal-8 short bzw. long und pcDNA3/HA-ERK2 transfiziert und nach 24 h in RIPA-Puffer lysiert. Zur Präzipitation wurden 2,5 µg des spezifisch gegen das HA-tag gerichteten Antikörpers 12CA5 mit 25 µl Protein G-Agarose *beads* und 0,5-0,7 mg des RIPA-Zelllysates zusammengegeben. Um zu zeigen, dass in allen Ansätzen die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde, wurde für spätere Kontrollen jeweils 1/10 des eingesetzten Zelllysates abgenommen und direkt mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Der IP-Ansatz wurde mit RIPA-Puffer auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt und für 1 h bei 4 °C und *end-over-end* Rotation inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte bei 4 °C. Um nichtgebundene Antikörper und Proteine zu entfernen wurden die Protein G-Agarose *beads* dreimal durch Zugabe von je 300 µl RIPA-Puffer und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 2500 x g gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die *beads* mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt, 20-40 µl SDS-Probenpuffer zugegeben und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Um die Präzipitation von HA-ERK2 und eine erhöhte Phosphorylierung von ERK nachzuweisen, wurde das Präzipitat in einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel analysiert. HA-ERK2 wurde mittels eines panERK Antikörpers und die ERK-Phosphorylierung mittels eines phosphospezifischen ERK-Antikörpers nachgewiesen.

3.2.15. Ko-Immunpräzipitation von Proteinkomplexen mittels des μ MACS™ GFP

Isolation Kits

Im Vergleich zur Immunpräzipitation wird bei der Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) nicht nur ein Protein, welches an die Matrix bindet, präzipitiert, sondern auch dessen Interaktionspartner. In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen und zum anderen HEK293 Zellen verwendet. Die Zellen wurden nach 24-48 h in Gold-Lyse-Puffer (für die Ko-IP von EGFP-Proteinen mit Galektin-8) oder IP-Puffer (für die Ko-IP von EGFP-Proteinen mit Galektin-3) lysiert.

Aus den Zelllysaten der PANC-1/EGFP und PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Zellen wurden EGFP bzw. EGFP-K-Ras(G12V), endogenes Galektin-8 und endogenes Galektin-3 ko-präzipitiert. EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierende PANC-1 Zellen wurden des Weiteren mit siRNAs (Gal-8 si-5, Gal-8 si-8, Gal-3 si-7 oder Gale-3 si-8) transfiziert und nach 48 h lysiert. Aus diesen Zelllysaten wurden ebenfalls EGFP bzw. EGFP-K-Ras(G12V), Galektin-8 und Galektin-3 ko-präzipitiert.

HEK293 Zellen wurden transient mit Plasmiden ko-transfiziert, die für verschiedene EGFP-K-Ras-Fusionsproteine und Galektin-8 bzw. Galektin-3 kodieren. Die Zelllyse erfolgte nach 24 h. EGFP-K-Ras und Galektin-8 bzw. Galektin-3 wurden ko-präzipitiert.

Gold-Lyse-Puffer

20 mM Tris pH 7,9
50 mM NaCl
10 % (V/V) Glyzerin
1 % (V/V) Triton™ X-100
0,5 % (m/V) Na-Deoxycholat
1,39 mM Pefabloc
15 μ M Aprotinin
21 μ M Leupeptin
50 μ M Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)

IP-Puffer (Shalom-Feuerstein *et al.*, 2008)

50 mM Tris pH 7,6
20 mM MgCl₂
200 mM NaCl
0,5 % (V/V) NP-40
1 mM DTT
0,5 % (m/V) Na-Deoxycholat
1,39 mM Pefabloc
15 μ M Aprotinin
21 μ M Leupeptin
50 μ M Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)

Zur Präzipitation wurden pro 0,5-3 mg Zelllysat 30 μ l magnetische Mikrobeads, konjugiert mit GFP-spezifischen Antikörpern, gegeben. Die Ansätze wurden mit dem entsprechenden Lysepuffer auf 1 ml aufgefüllt und für 2 h bei 4 °C *end-over-end* rotiert. An die GFP-spezifischen Antikörper der *beads* banden die EGFP-K-Ras Fusionsproteine, welche ihrerseits mit den Galektinen interagierten. Nach der Inkubation wurden die Proben mit den bereitgestellten Puffern des μ MACS™ GFP Isolation Kits (Miltenyi-Biotec) wie folgt behandelt. Die μ MACS Säulen wurden in einem magnetischen Feld eines μ MACS Separators platziert und mit 200 μ l Lyse-Puffer vorbereitet. Die Proben wurden auf die Säulen gegeben. Durch viermaliges Waschen der Präzipitate mit je 200 μ l Waschpuffer 1 wurden nicht-gebundene Proteine entfernt. Durch zweimaliges Waschen mit je 100 μ l Waschpuffer 2 wurden Salze und Detergenzien entfernt. Im Anschluss wurden je 25 μ l Elutionspuffer (vorgeheizt auf 95 °C) auf die Säulen gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präzipitate wurden schließlich in 50 μ l Elutionspuffer (vorgeheizt auf 95 °C) eluiert und für 10 min bei 95 °C inkubiert.

Lyse-Puffer

150 mM NaCl
1 % Triton® X-100
50 mM Tris/HCl pH 8,0

Waschpuffer 1

150 mM NaCl
1 % Igepal CA-630 (NP-40)
0,5 % Natriumdeoxycholat
0,1 % SDS
50 mM Tris/HCl pH 8,0

Waschpuffer 2

20 mM Tris/HCl pH 7,5

Elutionspuffer

50 mM Tris/HCl pH 6,8
50 mM DTT
1 % SDS
1 mM EDTA
0,005 % Bromphenolblau
10 % Glycerin

Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras(G12V) und Galektin in den Ko-IPs dienten 1/10-1/100 der im Experiment eingesetzten Proteinmenge. Die Eluate und Kontrollen wurden in einer 12,5 % SDS-Polyacrylamidelektrophorese analysiert. Zur Detektion der

EGFP-K-Ras Proteine wurde ein GFP Antikörper verwendet. Die Galektine wurden mittels spezifischer Galektin-Antikörper nachgewiesen.

3.2.16. Präparation von partikulären und löslichen Proteinen

Zur Fraktionierung von Zelllysaten in eine partikuläre und eine zytosolische Fraktion wurden sowohl PANC-1 Zellen als auch PANC-1 Zellen stabil transfiziert mit EGFP oder EGFP-K-Ras(G12V) in 10 cm Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit eiskaltem CMF-PBS gewaschen und in 250 µl HEPES-Puffer aufgenommen.

HEPES-Puffer

50 mM HEPES pH 7,6 bei 4 °C
8,6 % (m/V) Sucrose
10 mM EDTA
10 mM EGTA
1 mM PMSF
40 µg/ml Leupeptin
0,4 mg/ml Trypsin-Inhibitor
40 µg/ml Pepstatin

Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mittels einer 1 ml Tuberkulinspritze mit einer Kanüle Nr. 18 mehrmals homogenisiert. In der folgenden zehnminütigen Zentrifugation bei 600 x g und 4 °C sedimentierten die Zellkerne und Organellen. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugationsreaktionsgefäß transferiert. Zur Trennung der partikulären Bestandteile von den löslichen Proteinen wurde bei 100000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Der Überstand stellte die zytosolische S100 Fraktion dar, welche in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert wurde. Das Pellet wurde mit 250 µl HEPES-Puffer gewaschen und die Suspension erneut bei 100000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, welches die partikuläre P100 Fraktion bildete, wurde in 80 µl RIPA-Puffer mit Hilfe eines Teflon-Mörsers resuspendiert. Die Proteinkonzentration beider Fraktionen wurde im *Bicinchoninic-Acid Protein Assay* (s. 3.2.8) bestimmt und die Lysate anschließend in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.17. *Wounding-Assay*

Um zu klären, ob die Inhibierung der Proteinexpression von Galektin-8 einen Einfluss auf die K-Ras-induzierte Migration hat wurden 1×10^5 PANC-1 Zellen/Loch in einer 6-Lochzellkulturplatte ausgesät und in Wachstumsmedium bei 37 °C, 8 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in Doppelansätzen transient mit 50-100 nM siRNAs gegen Galektin-8 transfiziert. 46 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 2 h mit 2 µg/ml Mitomycin behandelt. Mitomycin inhibiert die DNA-Synthese, indem es zwischen zwei DNA-Strängen interkaliert. Die Stränge werden kovalent miteinander verbunden und können nicht mehr dissoziieren. Die DNA kann nicht mehr repliziert und transkribiert werden. Somit kann eine erhöhte Migration durch Zellproliferation ausgeschlossen werden.

Durch den konfluenten Zellrasen wurden mit Hilfe einer sterilen 1 ml Pipettenspitze je drei vertikale Striche gezogen (*wounding*). Auf der Rückseite eines jeden Lochs wurden mit einem Fasermaler je drei horizontale Striche angezeichnet. Diese dienten als Orientierungshilfe bei der späteren Dokumentation. Um zu verhindern, dass die beim *wounding* abgelösten Zellen sich wieder in den gekratzten Spalt absetzten, wurde die Kultur einmal mit CMF-PBS gewaschen. Ein Doppelansatz wurde mit Wachstumsmedium, welches 10 % FCS enthält überschichtet, der andere mit DMEM ohne FCS. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C, 8 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit wurden die Spalten bei 10facher Vergrößerung am inversen Lichtmikroskop Axiovert 25 (Zeiss) fotografiert (t_0). Pro Spalt wurden drei Ausschnitte fotografiert, so dass pro Transfektionsansatz und Zeitpunkt neun Bilder für die Auswertung zur Verfügung standen. Die Spaltbreiten wurden nach 14 h (t_{14}), 24 h (t_{24}), 38 h (t_{38}) und 48 h (t_{48}) dokumentiert. Mittels des AnalySIS Programms wurden pro Bild die Spaltbreiten an 20 willkürlich ausgewählten Stellen vermessen und daraus abgeleitet der gemittelte, prozentuale Wundverschluss (\pm SEM) mittels Microsoft Excel 2010 errechnet. Die Tests zur Prüfung der Signifikanz erfolgten mit GraphPad Prism (Version 5.0).

Zur Überprüfung des Galektin-8 *knock downs* wurden die Zellen nach der letzten Dokumentation in RIPA-Puffer lysiert und im Immunblot mittels Galektin-8 Antikörper analysiert.

3.2.18. Inhibierung von Kinasen verschiedener Signaltransduktionswege und deren Einfluss auf die Proteinexpression von Galektin-1, -3 und -8

In einer Publikation von Barkan *et al.* aus dem Jahr 2013 konnte durch die Zugabe des Inhibitors SP600125 eine deutlich erhöhte Proteinexpression von Galektin-7 in ST88-14 Zellen gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob Galektin-8, -3 und -1 eine ebenfalls erhöhte Proteinexpression nach der Zugabe diverser pharmakologischer Inhibitoren einzelner Kinasen in PANC-1 Zellen aufweisen, wurden 3×10^5 Zellen/Loch in 6-Lochzellkulturplatten ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit folgenden Inhibitoren in den aufgelisteten Konzentrationen für 48 h bei 37 °C, 8 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit behandelt. Als Kontrolle diente die Behandlung der Zellen mit den Lösungsmitteln DMSO und Methanol.

Inhibitor	Endkonzentration	Lösungsmittel
LY294002	20 µM	DMSO
FTS	75 µM	DMSO
Pifithrin-α	25 µM	DMSO
SP600125	25 µM	DMSO
Rapamyzin	100 nM	Methanol
PD98059	25 µM	DMSO
SB203580	4 µM	DMSO
U0126	10 µM	DMSO

Nach der Inkubation wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert. Es wurden sowohl die Proteinexpressionen der Galektine, der Kinasen als auch die Phosphorylierungen der Kinasen im Immunoblot analysiert. Es wurden spezifische Antikörper sowohl gegen Galektin-1, -3 und -8 als auch gegen pMDM2, MDM2, pAkt, Akt, pp53, p53, pERK1/2, ERK1/2, pp38, p38, pS6 und S6 verwendet.

3.2.19. Strukturanalyse

Bereits im Jahr 2000 konnten Hoffman *et al.* zeigen, dass der Geranylgeranylrest von Cdc42 mit einer hydrophoben Tasche innerhalb der Immunglobulin-ähnlichen Domäne von RhoGDI interagiert. Roblat *et al.* konnten 2004 zeigen, dass Galektin-1 ebenfalls eine hydrophobe Tasche besitzt, die mit Geranylgeranyl interagieren kann. 2006 wurde von Ashery *et al.* publiziert, dass auch Galektin-3 eine Prenylbindungstasche besitzt. In der vorliegenden Arbeit wurden die für die Interaktion maßgeblich verantwortlichen Aminosäuren des Galektin-3 Proteins mit den entsprechenden Proteinsequenzen von Galektin-8 verglichen. Dazu wurden bereits kristallisierte Galektin-3 und -8 Proteinstrukturen aus der *Research Collaboratory for*

Structural Bioinformatics (RSCB) Datenbank verwendet. Die ausgewählten Proteinstrukturen wurden im Anschluss mittels des *RCSB PDB - jCE/JFATCAT Structure Alignment Server V2.6* miteinander verglichen.

3.3. Statistik

Die Standardabweichung (SD; *standard deviation*) wurde wie folgt berechnet:

$$SD = \sqrt{[\sum(y_i - y_{\text{mean}})^2 / n - 1]}$$

n: Anzahl der Bestimmungen, y_i : Einzelwert, y_{mean} : Mittelwert aller Einzelwerte

Der Standardfehler (SEM; *standard error of the mean*) aus den Mittelwerten wurde wie folgt ermittelt:

$$SEM = SD / \sqrt{n}$$

Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der ANOVA (*analysis of variance*) Signifikanztest durchgeführt.

4. Ergebnisse

In der Literatur ist Galektin-3 als spezifischer Interaktionspartner von K-Ras.GTP beschrieben. Durch die Interaktion der beiden Proteine wird die Aktivität von K-Ras und PI3K verlängert, was zu einer Signalverstärkung führt (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. rer. nat. Monika Unger („Charakterisierung des Einflusses von konstitutiv aktivem K-Ras(G12V) auf die Signaltransduktion und die Migration von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen“, Universität Ulm, 2006) wurde durch *in vitro*-Bindungsstudien und massenspektrometrische Analysen Galektin-8 als weiterer spezifischer Interaktionspartner von K-Ras(G12V) identifiziert. Frau Dr. med. Andreea Porr charakterisierte in ihrer Dissertation („Expression und Lokalisation von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 in Pankreaskarzinomzelllinien“, Universität Ulm, 2010) u.a. die Expression und Lokalisation von Galektin-8 in unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien. In den ausgewählten Zelllinien konnten jeweils 2 mRNA Varianten von Galektin-8 identifiziert werden. Im Immunoblotverfahren wurden 2 Galektin-8 Isoformen detektiert. Bei der Galektin-8 Isoform a (*accession*: NP_963839.1; GI: 42544193) handelt es sich um ein 359 AS langes Protein, welches in dieser Arbeit Galektin-8 long genannt wird. Die Galektin-8 Isoform b (*accession*: NP_963838.1; GI: 42544191) besteht aufgrund der Deletion von Exon 11 (bp 550-698) aus nur 317 AS und wird folgend als Galektin-8 short bezeichnet.

Basierend auf den Arbeiten von Frau Dr. Monika Unger und Frau Dr. Andreea Porr sollte in der vorliegenden Arbeit die Relevanz der K-Ras/Galektin-8 Interaktion für die Signaltransduktion und Migration von Karzinomzellen untersucht werden.

4.1. Expression von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 in Lungenkarzinomzellen

Es ist publiziert, dass einige Galektine in Tumorzellen häufig überexprimiert vorliegen und dass die Expression mit der Tumorprogression und Tumorgenese korreliert (Van den Brule *et al.*, 2004). In der Arbeit von Frau Dr. med. Andreea Porr wurden bereits die neun Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1, MiaPaCa2, AsPc-1, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, Patu 8902, Patu 8988s und Patu 8988t auf die Expression von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 untersucht. Die Ergebnisse der Immunoblotanalysen zeigen deutliche Unterschiede in der Proteinexpression der untersuchten Galektine („Expression und Lokalisation von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 in Pankreaskarzinomzelllinien“ Dissertation von Dr. med. Andreea Porr, Universität Ulm, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden nun diverse Lungenkarzinomzelllinien auf ihren Proteingehalt an Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 analysiert. Dazu wurden konfluente

Kulturen der Zelllinien HTB-55, NCL-H2122, NCL-H23, A427, Colo699, H1688, SCLC-21H, HCC44, A549 und NCL-H358 in RIPA-Puffer lysiert und die Proteinlysate in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 erfolgte im Immunoblotverfahren.

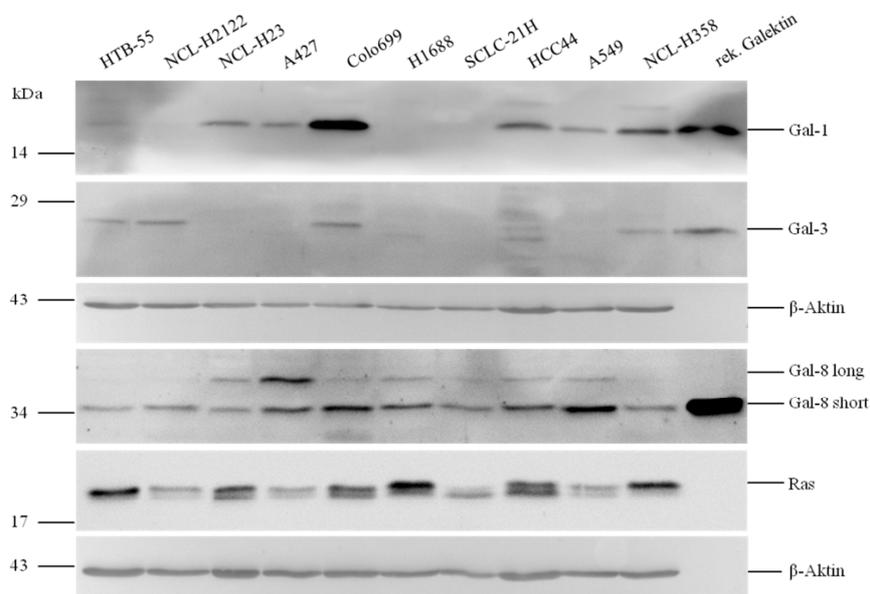


Abb. 4.1: Expression von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 in Lungenkarzinomzelllinien. Es wurden konfluente Kulturen der Zelllinien HTB-55, NCL-H2122, NCL-H23, A427, Colo699, H1688, SCLC-21H, HCC44, A549 und NCL-H358 in RIPA-Puffer lysiert. 50 µg der Gesamtllysate, 20 ng rekombinantes Galektin-1, 20 ng rekombinantes Galektin-3 und 5 ng rekombinantes Galektin-8 wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion der Galektine erfolgte mittels der polyklonalen anti-Galektin-1- und anti-Galektin-3 Antikörper und des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers sowie mittels ECL Detektion. Zum Nachweis der Expression von endogenen Ras-Proteinen wurde der monoklonale anti-Pan-Ras (Ab-3)-Antikörper verwendet. Um eine gleichmäßige Proteinbeladung in den einzelnen Spuren nachzuweisen, wurde der monoklonale anti-β-Aktin-Antikörper verwendet. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Wie in Abbildung 4.1 exemplarisch für 3 Versuche gezeigt, exprimieren alle getesteten Lungenkarzinomzelllinien beide Galektin-8 Isoformen. Die meisten von ihnen exprimieren Galektin-8 short jedoch deutlich stärker als Galektin-8 long. Galektin-3 hingegen wird nur von den Zelllinien HTB-55, NCL-H2122, Colo699, HCC44 und NCL-H358 exprimiert. Galektin-1 wird von allen Zelllinien bis auf NCL-H2122, H1688 und SCLC-21H exprimiert, jedoch in sehr unterschiedlichen Mengen. Die Zelllinie Colo699 weist übermäßig viel Galektin-1 auf. Anhand der mitgeführten rekombinanten Galektine (je 20 ng rek. Gal-1 und Gal-3, 5 ng rek. Gal-8) konnte in 2 Versuchen densitometrisch die Menge der endogenen Galektine in den verwendeten 50 µg Lysat ermittelt werden. Die Einzelwerte sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Galektin-Expressionsanalysen in Lungenkarzinomzelllinien. Dargestellt sind die Spezies und -gewebe, der Tumortyp, der *K-ras*-Mutationsstatus und die Expression von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 der Lungenkarzinomzelllinien HTB-55, NCL-H2122, NCL-H23, A427, Colo699, H1688, SCLC-21H, HCC44, A549 und NCL-H358, der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 sowie der embryonalen Nierenzelllinie HEK293. Eine vorhandene Expression ist durch ein +, eine fehlende Expression durch ein - gekennzeichnet. Ebenfalls angegeben ist der endogene Galektin Gehalt in ng pro 50 µg Gesamtllysate aus 2 Versuchen.

Zelllinie	Originalspezies und -gewebe	Tumortyp	K-ras Mutation	Gal-1		Gal-3		Gal-8	
					ng in 50 µg Lysat		ng in 50 µg Lysat		ng in 50 µg Lysat
HTB-55	Humane Lunge	Adenokarzinom	wt	+	0,2 0,2	+	2 18	+	0,1 0,2
NCL-H2122	Humane Lunge	Adenokarzinom	Homozyg. (G12C) Querings <i>et al.</i> , 2011	-		+	3,6 15	+	0,1 0,4
NCL-H23	Humane Lunge	Adenokarzinom	Heterozyg. (G12C) Ikediobi <i>et al.</i> , 2006	+	3,5 10	-		+	0,1 0,1
A427	Humane Lunge	Adenokarzinom	Heterozyg. (G12D) Valenzuela und Groffen, 1986	+	2,8 2,5	-		+	0,2 0,2
Colo699	Humane Lunge	Adenokarzinom	wt	+	39,6 43	+	4 20	+	0,2 0,2
H1688	Humane Lunge	Kleinzelliges Lungenkarzinom	wt	-		-		+	0,2 0,3
SCLC-21H	Humane Lunge	Kleinzelliges Lungenkarzinom	wt	-		-		+	0,1 0,2
HCC44	Humane Lunge	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	Heterozyg. (G12S) Franklin <i>et al.</i> , 2010	+	7,3	+		+	0,2 0,4
A549	Humane Lunge	Adenom	Homozyg. (G12C) Valenzuela und Groffen, 1986	+	3,4 9	-		+	0,4 0,6
NCL-H358	Humane Lunge	Bronchoalveolar-karzinom	Heterozyg. (G12C) Singh <i>et al.</i> , 2009	+	7,4 30	+	2,1 15	+	0,1 0,3
Panc-1	Humanes Pankreas	Adenokarzinom	Heterozyg. (G12D) Giehl <i>et al.</i> , 2000	+		+		+	
HEK293	Humane embryonale Niere		wt	-		-		-	

Mittels der densitometrischen Auswertung konnte, wie in Tabelle 4.1 zusammengefasst, gezeigt werden, dass der Galektin-8 short Proteingehalt in den Lungenzelllinien zwischen 0,1 und 0,6 ng pro 50 µg Gesamtllysate liegt. Der Galektin-3 Gehalt liegt in den Lungenzelllinien zwischen 2 und 20 ng pro 50 µg Lysat. In den HCC44 Zellen war die Galektin-3 Expression so niedrig, dass diese in mehreren Versuchen nicht densitometrisch ausgewertet werden konnte. Die Galektin-1 Expression in den Lungenkarzinomzellen ist sehr unterschiedlich. HTB-55 Zellen exprimieren lediglich 0,2 ng Galektin-1 pro 50 µg Lysat, wohingegen 39,6 ng bzw. 43 ng Galektin-1 pro 50 µg Lysat in den Colo699 Zellen errechnet wurden. Der Großteil der Galektin-1-positiven Zelllinien exprimiert zwischen 2,5 ng und 10 ng Galektin-1 pro 50 µg Lysat. In den HEK293 Zellen konnten keine Galektine nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle untersuchten Lungenkarzinomzelllinien beide Galektin-8 Isoformen exprimieren, wobei Galektin-8 short deutlich stärker exprimiert wird. In den meisten getesteten Zelllinien konnte auch Galektin-1 und Galektin-3

nachgewiesen werden. Die Zelllinien H1688 und SCLC-21H exprimieren weder Galektin-1 noch Galektin-3. Die pankreatische Karzinomzelllinie PANC-1 exprimiert Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8. Die humane Nierenzelllinie HEK293 exprimiert keine Galektine. Für weitere Versuche wurden die Lungenzelllinien A427 und A549 ausgewählt. Beide Zelllinien exprimieren Galektin-8, jedoch nicht Galektin-3. Bei den A427 Zellen handelt es sich um Zellen eines Adenokarzinoms mit einer heterozygoten *K-ras* Mutation. An Position 12 ist Glyzin durch Asparaginsäure ersetzt (G12D) (Analyse in der Arbeitsgruppe durch Dr. Sven Beilke; Valenzuela und Groffen, 1986). A549 Zellen entstammen einem Adenom und weisen eine homozygote *K-ras* Mutation auf. Hier ist an Position 12 der Aminosäuresequenz Glyzin durch Cystein ausgetauscht (G12C) (Analyse in der Arbeitsgruppe durch Dr. Sven Beilke; Valenzuela und Groffen, 1986).

4.2. Klonierung von Galektin-8 long und Galektin-8 short

Um nicht nur endogenes Galektin-8, sondern auch Galektin-8 nach ektopter Expression in der Zelle nachweisen zu können, wurden Fluoreszenzfusionsproteine generiert. Hierzu wurden die Plasmide pcDNA3/Galektin-8 long und pcDNA3/Galektin-8 short mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *EcoRV* hydrolysiert. Die Zielvektoren pECFP-C1 und pmCherry-C1 wurden mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *SmaI* restringiert. Dabei bildet *KpnI* *sticky ends* und *EcoRV* und *SmaI* *blunt ends*. Die Ligation der Galektin-8 long und Galektin-8 short Fragmente mit dem pECFP-C1 bzw. pmCherry-C1 Vektor erfolgte durch die T4-DNA-Ligase. Die Insertion der Galektin-8 cDNA in die Fluoreszenzvektoren wurde durch erneute Restriktion mit *KpnI* und *SmaI* und anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft. Zur weiteren Überprüfung wurde die neu generierte cDNA sequenziert. Die Sequenzierungen (s. Anhang) von pECFP-C1/Galektin-8 long und pECFP-C1/Galektin-8 short erfolgten mittels des pEGFP-C2 *reverse primers* (GATC). Die cDNA und Aminosäuresequenzen von Galektin-8 long und short in pECFP-C1 wurden sowohl mit denen von Galektin-8 long und short der Datenbank *pubmed* (NM_006499.4 und BC016486.2) als auch mit denen von Galektin-8 long und short in pcDNA3 (Sequenzen von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl erhalten) verglichen. Folgende Veränderungen wurden gefunden:

Tab. 4.2: Vergleich der Galektin-8 long cDNA und Aminosäuresequenzen (NCBI: NM_006499.4) mit der in pECFP-C1 klonierten Sequenz. Dargestellt sind die Positionen und Basenaustausche in der cDNA Sequenz und Aminosäureaustausche in der Aminosäuresequenz.

	Unterschiede in cDNA Sequenzen	Unterschiede in Aminosäuresequenzen
Position in der Gal-8 long Sequenz (NM_006499.4)	bp 370: C → A	AS 124: Leu → Met
	bp 678: G → C	AS 226: Arg → Ser

Die Mutation an Position 678 der cDNA Sequenz wurde ebenfalls in pcDNA3/Galektin-8 long gefunden. Die Mutation an Position 370 tritt erstmals in pECFP-C1/Galektin-8 long auf. Verglichen mit Galektin-8 long der Datenbank (NM_006499.4) zeigt pcDNA3/Galektin-8 long eine weitere Mutation an Position 547 der cDNA Sequenz (A → G) bzw. Position 56 der Aminosäuresequenz (Met → Val), welche aufgrund der unvollständigen Sequenzierung der cDNA von pECFP-C1/Galektin-8 long (bp 1-300; AS 1-100 nicht erfasst) nicht überprüft werden konnte. In der Datenbank *neXtprot* sind die Punktmutationen an den Positionen 56 und 226 der Aminosäuresequenz als bekannte Varianten beschrieben.

Tab. 4.3: Vergleich der Galektin-8 short cDNA und Aminosäuresequenzen (NCBI: BC016486.2) mit der in pECFP-C1 klonierten Sequenz. Dargestellt sind die Positionen und Basenaustausche in der cDNA Sequenz und Aminosäureaustausche in der Aminosäuresequenz.

	Unterschiede in cDNA Sequenzen	Unterschiede in Aminosäuresequenzen
Position in der Gal-8 short Sequenz (BC016486.2)	bp 146: A → G	AS 49: Asp → Gly
	bp 619: G → A	AS 207: Val → Met
	bp 772: T → C	AS 258: Ser → Pro
	bp 821: A → G	AS 274: Asp → Gly

Die in Tabelle 4.3 aufgeführten Mutationen sind ebenfalls in der cDNA Sequenz von pcDNA3/Galektin-8 short zu finden. Durch die Sequenzierung der cDNA von pECFP-C1/Galektin-8 short wurden die Nukleotide 48-954 bzw. AS 17-317 erfasst. In der Datenbank *neXtprot* ist die Punktmutation an Position 274 der Aminosäuresequenz als bekannte Variante beschrieben.

Die Sequenzierungen von pmCherry-C1/Galektin-8 long und short (s. Anhang) erfolgten mittels des pEGFP *forward primers* und des pEGFP-C2 *reverse primers* (GATC). Die cDNA und Aminosäuresequenzen von pmCherry-C1/Galektin-8 long und short wurden sowohl mit Galektin-8 long und short der Datenbank *pubmed* (NM_006499.4 und BC016486.2) als auch mit pcDNA3/Galektin-8 long und short (Sequenzen von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl erhalten) verglichen.

Tab. 4.4: Vergleich der Galektin-8 long cDNA und Aminosäuresequenzen (NCBI: NM_006499.4) mit der in pmCherry-C1 klonierten Sequenz. Dargestellt sind die Positionen und Basenaustausche in der cDNA Sequenz und Aminosäureaustausche in der Aminosäuresequenz.

	Unterschiede in cDNA Sequenzen	Unterschiede in Aminosäuresequenzen
Position in der Gal-8 long Sequenz (NM_006499.4)	bp 165: C → T	
	bp 166: A → G	AS 56: Met → Val
	bp 330: G → A	
	bp 678: G → C	AS 226: Leu → Ser
	bp 942: T → C	

Die Mutationen an den Positionen 166 und 678 der Galektin-8 long cDNA Sequenz (NM_006499.4) konnten ebenfalls in pcDNA3/Galektin-8 long detektiert werden. Die weiteren in Tabelle 4.4 aufgelisteten Mutationen in der pmCherry-C1/Galektin-8 long cDNA Sequenz an den Positionen 165, 330 und 942 führen zu keinen Änderungen in der pmCherry-C1/Galektin-8 long Aminosäuresequenz. In der Datenbank *neXtprot* ist die Punktmutation an Position 56 der Aminosäuresequenz als bekannte Variante beschrieben.

Tab. 4.5: Vergleich der Galektin-8 short cDNA und Aminosäuresequenzen (NCBI: BC016486.2) mit der in pmCherry-C1 klonierten Sequenz. Dargestellt sind die Positionen und Basenaustausche in der cDNA Sequenz und Aminosäureaustausche in der Aminosäuresequenz.

	Unterschiede in cDNA Sequenzen	Unterschiede in Aminosäuresequenzen
Position in der Gal-8 short Sequenz (BC016486.2)	bp 146: A → G	AS 49: Asp → Gly
	bp 158: G → A	AS 53: Gly → Glu
	bp 159: C → G	
	bp 619: G → A	AS 207: Val → Met
	bp 772: T → C	AS 258: Ser → Pro
	bp 816: T → C	
	bp 821: A → G	AS 274: Asp → Gly

Die Mutationen an den Positionen 146, 619, 772 und 821 in der pmCherry-C1/Galektin-8 short cDNA sind bereits in pcDNA3/Galektin-8 short vorhanden. Die Austausch an den Positionen 158 und 159 der pmCherry-C1/Galektin-8 short cDNA, welche einen Austausch der Aminosäure Glyzin zu Glutaminsäure an Position 53 der Aminosäuresequenz zur Folge haben, treten erstmals auf. In der Datenbank *neXtprot* ist die Punktmutation an Position 274 der Aminosäuresequenz als bekannte Variante beschrieben.

Die Galektin-8 long und short cDNAs konnten somit in die Vektoren pECFP-C1 (pECFP-C1/Galektin-8 long, pECFP-C1/Galektin-8 short) und pmCherry-C1 (pmCherry-C1/Galektin-8 long, pmCherry-C1/Galektin-8 short) eingebracht werden.

4.2.1. Ektope Expression von ECFP-Galektin-8 long und ECFP-Galektin-8 short in PANC-1 Zellen

Um die Expression der Fluoreszenzfusionsproteine zu kontrollieren, wurden PANC-1 Zellen bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert und mit pECFP/Galektin-8 long und pECFP/Galektin-8 short transfiziert. PANC-1 Zellen transfiziert mit pECFP-C1 dienten als Kontrolle. Da es sich um Fluoreszenzfusionsproteine handelt, wurde die Expression 24 h nach der Transfektion zunächst am Fluoreszenzmikroskop überprüft und die Transfektionseffizienzen bestimmt.

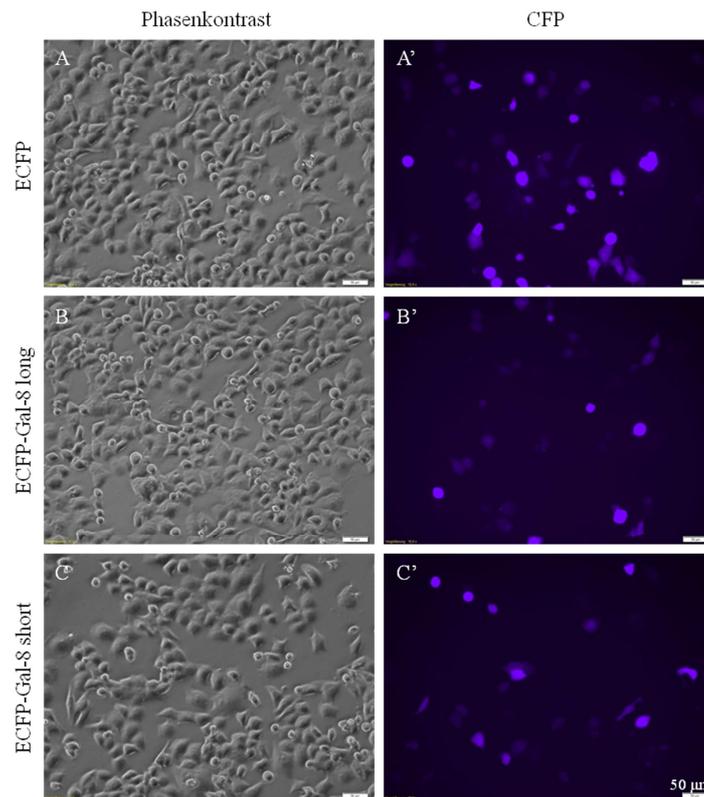


Abb. 4.2: Mikroskopische Überprüfung der ektope Expression von ECFP-Galektin-8 in PANC-1 Zellen. PANC-1 Zellen wurden in einer 6-Lochzellkulturplatte (4×10^5 Zellen/Loch) ausgesät, 24 h bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert und mit jeweils $2 \mu\text{g}$ pECFP-C1 (A und A'), pECFP/Galektin-8 long (B und B') und pECFP/Galektin-8 short (C und C') transfiziert. Nach einer 24 stündigen Inkubation bei 37°C , 8 % CO_2 und einer 90 %igen Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch bei 20facher Vergrößerung analysiert. Die Teilabbildungen A-C zeigen die Zellen im Phasenkontrast. In den Teilabbildungen A'-C' wurden ECFP und ECFP-Galektin-8 mit Licht der Wellenlänge 433 nm angeregt und die Emission bei 475 nm im CFP Kanal detektiert. Die Transfektionseffizienzen betragen 26 % für ECFP, 15 % für ECFP-Galektin-8 long und 21 % für ECFP-Galektin-8 short. Der Messbalken entspricht einer Länge von $50 \mu\text{m}$.

Wie aus Abbildung 4.2 hervorgeht, wurden sowohl die Kontrolle ECFP (A') als auch ECFP-Galektin-8 long (B') und ECFP-Galektin-8 short (C') in PANC-1 Zellen exprimiert. Durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 433 nm und einer Emission bei 475 nm konnten die Proteine detektiert werden. Zur Errechnung der Transfektionseffizienzen wurde nun die Anzahl der transfizierten (A'-C'), zur Anzahl aller Zellen in den Phasenkontrastaufnahmen (A-

C) ins Verhältnis gesetzt. ECFP weist mit 26 % die höchste Transfektionseffizienz auf. 21 % der PANC-1 Zellen waren mit ECFP-Galektin-8 short und 15 % mit ECFP-Galektin-8 long transfiziert.

Nach der mikroskopischen Analyse wurden die transfizierten Zellen in RIPA-Puffer lysiert und die Proteine der Lysate in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression von ektope ECFP-Galektin-8 long und ECFP-Galektin-8 short aber auch des endogenen Galektin-8 long und Galektin-8 short wurde im Immunoblotverfahren nachgewiesen.

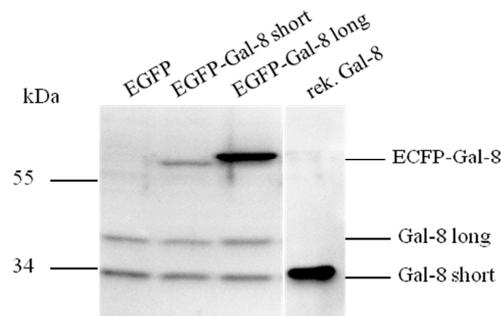


Abb. 4.3: Nachweis der ektope Expression von ECFP-Galektin-8 in PANC-1 Zellen mittels Western Blot Analyse. PANC-1 Zellen wurden in einer 6-Lochzellkulturplatte (4×10^5 Zellen/Loch) ausgesät, 24 h bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert, mit jeweils 2 μ g pECFP-C1, pECFP/Galektin-8 long und pECFP/Galektin-8 short transfiziert und 24 h bei 37 °C, 8 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in je 75 RIPA-Puffer lysiert. In einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 50 μ g des Gesamtlysats und 5 ng rekombinantes Galektin-8 elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis des ektope ECFP-Galektin-8 und des endogenen Galektin-8 erfolgte mittels des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers sowie ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Der exemplarische Immunoblot in Abbildung 4.3 zeigt, dass das ektope ECFP-Galektin-8 long bei etwa 67 kDa und das ektope ECFP-Galektin-8 short bei ungefähr 61 kDa detektiert wurde. Anhand der definierten Menge des rekombinanten Galektin-8 konnte densitometrisch bestimmt werden, dass etwa 10x mehr ECFP-Galektin-8 long als ECFP-Galektin-8 short (3,1 ng bzw. 0,3 ng in 50 μ g Gesamtlysat) detektiert wurde. In allen Lysaten war etwa die gleiche Menge an endogenem Galektin-8 long (ca. 40 kDa) und Galektin-8 short (ca. 34 kDa) enthalten (0,3 ng bzw. 0,5 ng in 50 μ g Gesamtlysat).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse nach 4 Transfektionen, dass Galektin-8 long und Galektin-8 short erfolgreich in den Fluoreszenzvektor pECFP-C1 kloniert wurden und in PANC-1 Zellen exprimiert werden. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde in vier Experimenten eine ECFP-Galektin-8 long Transfektionseffizienz von 17 % (± 3 S.D.) und eine ECFP-Galektin-8 short Transfektionseffizienz von 21 % ($\pm 9,3$ S.D.) ermittelt. Die Expressionskontrolle mittels des Immunoblotverfahrens zeigte in 2 Experimenten eine höhere ECFP-Galektin-8 long als ECFP-Galektin-8 short Expression. In 2 weiteren

Experimenten wurde mehr ECFP-Galektin-8 short als ECFP-Galektin-8 long detektiert. Die Ergebnisse der Immunoblotanalysen zeigen keine eindeutig erhöhte Expression der einen Galektin-8 Isoform gegenüber der anderen.

Die fluoreszenzmikroskopische Überprüfung von mCherry-Galektin-8 Expression ist in Kapitel 4.3.2 (Abb. 4.5) im Zusammenhang mit der Lokalisationsanalyse dargestellt.

4.3. Lokalisation von Galektin-8 in PANC-1 Zellen

4.3.1. Lokalisationsanalyse im Immunoblotverfahren nach Präparation von partikulären und löslichen Proteinen

Um die subzelluläre Lokalisation von Galektin-8 in PANC-1 zu analysieren, wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Dazu wurden PANC-1 Zellen verwendet, die stabil EGFP (Klon 21) oder EGFP-K-Ras(G12V) (Klon 4.1) exprimieren. In der Dissertation von Frau Dr. Monika Unger konnte gezeigt werden, dass EGFP gleichmäßig im Zytosol und im Nukleus, nicht aber an der Plasmamembran lokalisiert ist. Für EGFP-K-Ras(G12V) hingegen wurde eine vorwiegende Lokalisierung an der Plasmamembran beschrieben („Charakterisierung des Einflusses von konstitutiv aktivem K-Ras(G12V) auf die Signaltransduktion und die Migration von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen“, Dissertation von Dr. rer. nat. Monika Unger, Universität Ulm, 2006).

Mittels Ultrazentrifugation bei 100000 x g wurden Lysate der beiden Zelllinien in eine membranständige, partikuläre Fraktion (P) und eine lösliche, zytosolhaltige Fraktion (S) getrennt. Jeweils 50 µg der Fraktionen wurden im Immunoblotverfahren untersucht.

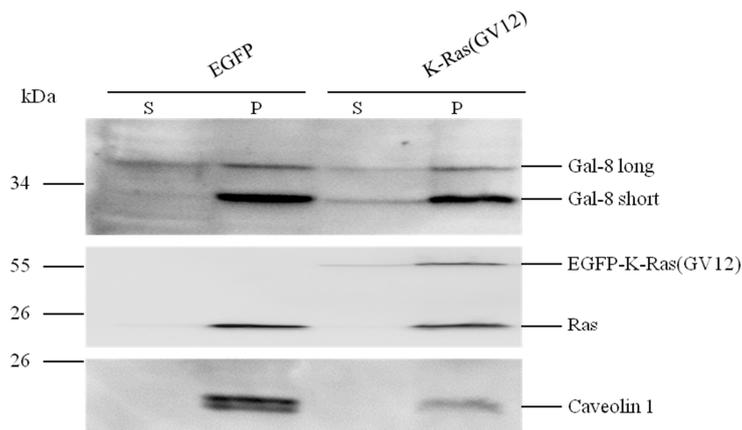


Abb. 4.4: Subzelluläre Lokalisation von Galektin-8 in EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen. PANC-1/EGFP (Klon 21) und PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) (Klon 4.1) Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend in HEPES-Puffer aufgenommen. Durch Ultrazentrifugation bei 100000 x g wurden die Lysate in eine partikuläre Fraktion (P) und eine lösliche Fraktion (S) getrennt. Je Fraktion wurden 50 µg Proteinlysate in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion von Galektin-8, Ras und Caveolin 1 erfolgte durch den monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörper, den monoklonalen anti-Pan-Ras (Ab-3)-Antikörper und den monoklonalen anti-Caveolin 1-Antikörper, sowie mittels ECL Detektion. Caveolin 1 wurde als Marker der partikulären Fraktion verwendet. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Abbildung 4.4 stellt einen exemplarischen Immunoblot aus 3 Versuchen dar. Sowohl in den EGFP- als auch in den EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen sind Galektin-8 long und Galektin-8 short hauptsächlich in der partikulären Fraktion nachweisbar, jedoch konnten sie auch in geringen Mengen in den löslichen Fraktionen beider Zelllinien detektiert werden. In beiden Zelllinien wurde mehr Galektin-8 short als Galektin-8 long in den partikulären Fraktionen detektiert. Das ektope EGFP-K-Ras(G12V) konnte in der partikulären Fraktion der EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Verglichen damit konnte allerdings auch eine geringe Proteinmenge EGFP-K-Ras(G12V) (ca. 10%) in der löslichen Fraktion gezeigt werden. In den EGFP-exprimierenden Kontrollzellen konnte kein EGFP-K-Ras(G12V) nachgewiesen werden. Endogenes Ras wurde in beiden Zelllinien zu mehr als 95 % in der partikulären Fraktion detektiert. Durch die Verwendung des anti-Caveolin 1-Antikörpers kann die Trennung der löslichen von der partikulären Fraktion gezeigt werden. Caveolin 1 ist ein membranständiges Protein und fungiert als Marker der membranhaltigen Fraktionen und konnte nicht in den löslichen Fraktionen detektiert werden. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl endogenes Ras, EGFP-K-Ras(G12V) als auch dessen Interaktionspartner Galektin-8 hauptsächlich in der membranhaltigen Fraktion enthalten sind.

4.3.2. Lokalisationsanalyse mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur weiteren Analyse der subzellulären Lokalisation von Galektin-8 wurde das Fluoreszenzfusionsprotein pmCherry-C1/Galektin-8 long (s. Kapitel 4.2) verwendet. PANC-1 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 50 % kultiviert und mit pmCherry-C1 (Kontrolle) und pmCherry/Galektin-8 long transfiziert. Die Zellen wurden für weitere 48 h inkubiert und die subzelluläre Lokalisation von Galektin-8 in lebenden Zellen anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Wellenlänge zur Anregung der mCherry-Proteine liegt bei 587 nm, die der Emission 610 nm.

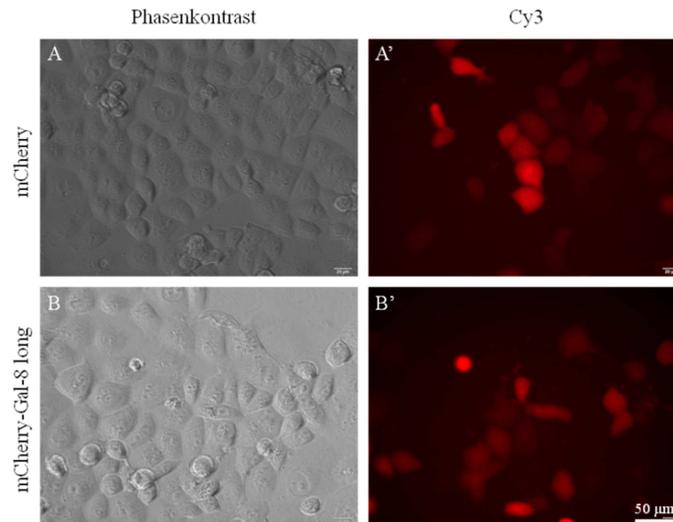


Abb. 4.5: Analyse der subzellulären Lokalisation von mCherry-Galektin-8 long in PANC-1 Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. PANC-1 Zellen in einer 6-Lochzellkulturplatte wurden bei einer Konfluenz von 50 % mit jeweils 2 µg pmCherry-C1 bzw. pmCherry/Galektin-8 long transfiziert. Nach einer 48 stündigen Inkubation bei 37 °C, 8 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit wurde die subzelluläre Lokalisation bei 40facher Vergrößerung fluoresszenzmikroskopisch analysiert. Die Teilabbildungen A und B zeigen die Zellen im Phasenkontrast. In den Teilabbildungen A' und B' wurden die mCherry-Fluoreszenzproteine mit Licht der Wellenlänge 587 nm angeregt und die Emission bei 610 nm im Cy-3 Kanal detektiert. Der Messbalken entspricht einer Länge von 50 µm.

Wie in Abbildung 4.5 im Cy3 Kanal dargestellt, sind sowohl das Kontrollprotein mCherry als auch mCherry-Galektin-8 long im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. Beide Proteine konnten nicht in der Membran lokalisiert werden, was im Gegensatz zu den Ergebnissen der Immunoblotanalyse in Abbildung 4.4 steht, in der eine Lokalisation des endogenen Galektin-8 short und long in EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden Zellen in der partikulären, membranhaltigen Fraktion detektiert wurde. Dieses Ergebnis wurde in zwei weiteren fluoresszenzmikroskopischen Analysen bestätigt.

Im Vergleich zur Kontrolle der ektopen Expression von ECFP-Galektin-8 long und short (s. Kapitel 4.2.1.) wurden in diesem Experiment keine Immunoblotanalysen durchgeführt.

In weiteren Versuchen sollte die Lokalisation von K-Ras(G12V) und Galektin-8 long untersucht werden. Dazu wurden EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierende PANC-1 Zellen verwendet. Diese wurden ebenfalls bis zu einer Konfluenz von 50 % kultiviert und mit pmCherry-C1 (Kontrolle) und pmCherry/Galektin-8 long transfiziert. Nach einer 48 stündigen Inkubation wurden die Zellen ebenfalls fluoresszenzmikroskopisch analysiert. In diesem Falle wurden die EGFP-Proteine mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt. Ihre Emission wurde bei 507 nm detektiert. Die Anregung der mCherry-Proteine erfolgte bei 587 nm, die Detektion der Emission bei 610 nm.

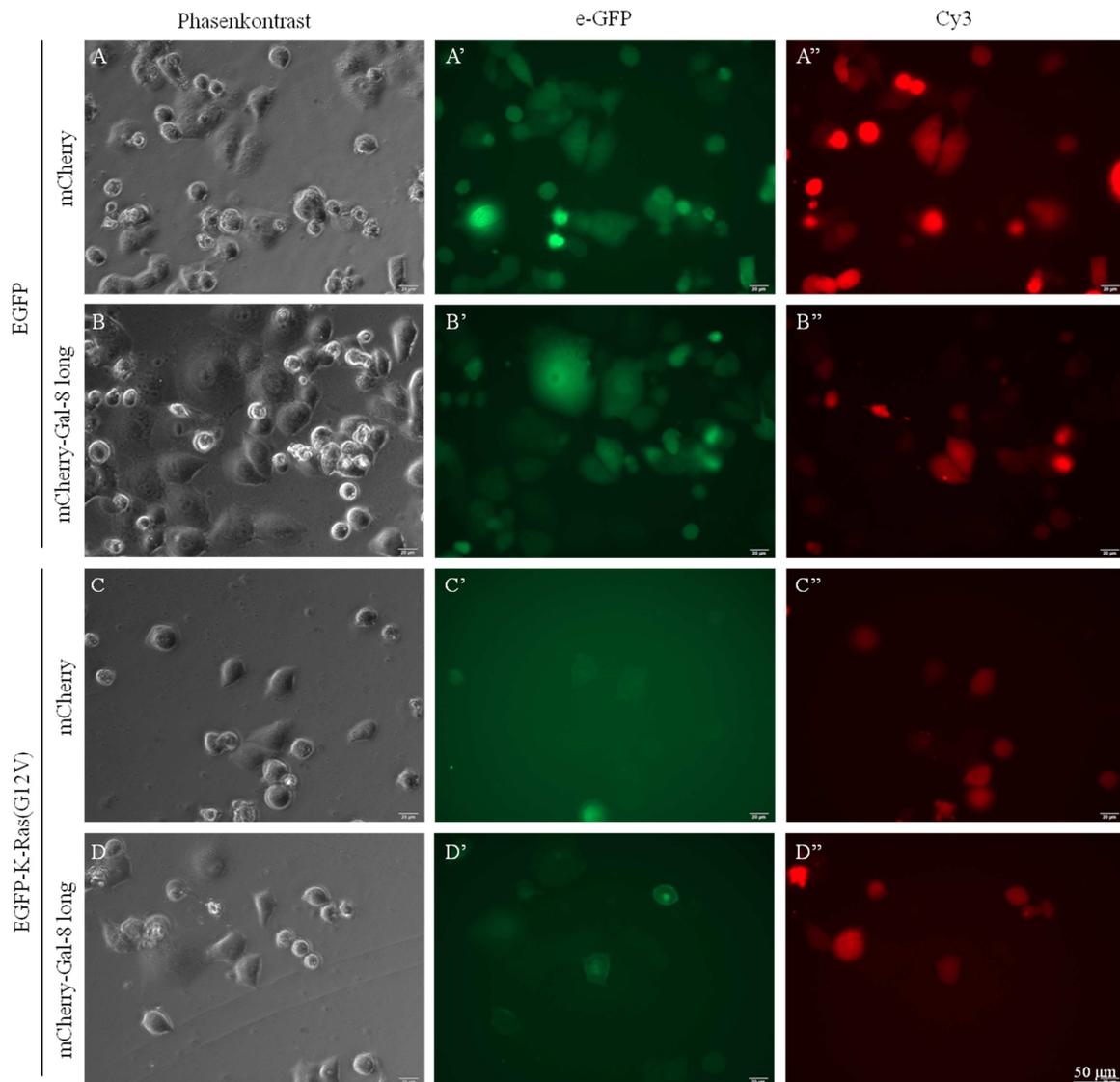


Abb. 4.6: Analyse der subzellulären Lokalisation von EGFP-K-Ras(G12V) und mCherry-Galektin-8 long in EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. PANC-1/EGFP (Klon 21) und PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) (Klon 4.1) Zellen wurden in einer 6-Lochzellkulturplatte bei einer Konfluenz von 50 % mit jeweils 2 µg pmCherry-C1 bzw. pmCherry/Galektin-8 long transfiziert. Nach einer 48 stündigen Inkubation bei 37 °C, 8 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit wurde die subzelluläre Lokalisation bei 40facher Vergrößerung fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Teilabbildungen A-D zeigen die Zellen im Phasenkontrast. In den Teilabbildungen A'-D' wurden die GFP-Fluoreszenzproteine mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt und die Emission bei 507 nm im e-GFP Kanal detektiert. In den Teilabbildungen A''-D'' wurden die mCherry-Fluoreszenzproteine mit Licht der Wellenlänge 587 nm angeregt und die Emission bei 610 nm im Cy-3 Kanal detektiert. Der Messbalken entspricht einer Länge von 50 µm.

Die aus 3 Versuchen ausgewählten repräsentativen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.6 zeigen, dass das Kontrollprotein mCherry in den EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen im Zytosol lokalisiert ist (Teilabbildungen A'' und C''). In den EGFP-exprimierenden PANC-1 Zellen konnte EGFP ebenfalls im Zytosol detektiert werden (Teilabbildungen A' und B'). Für mCherry-Galektin-8 long konnte auch hier in beiden getesteten Zelllinien eine zytosolische Lokalisation bestätigt werden (Teilabbildungen B'' und D''). EGFP-K-Ras(G12V) hingegen konnte deutlich an der

Plasmamembran der EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen detektiert werden (Teilabbildungen C' und D'). Des Weiteren war in mehreren fluoreszenzmikroskopischen Analysen zu beobachten, dass nur wenige Zellen, die EGFP-K-Ras(G12V) exprimieren, gleichzeitig auch mCherry-Galektin-8 long exprimieren. Oftmals haben die Zellen, die keine EGFP-K-Ras(G12V) Expression aufwiesen mCherry-Galektin-8 long exprimiert.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass das transient exprimierte mCherry-Galektin-8 long nicht mit EGFP-K-Ras(G12V) an der Plasmamembran ko-lokalisiert. Die Zellfraktionierungsexperimente in Abbildung 4.4 zeigen hingegen, dass endogenes Galektin-8 long und short in der membranhaltigen, partikulären Fraktion lokalisiert sind. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Lokalisierungen der endogen- gegenüber den ekto-exprimierten Galektin-8 Proteinen könnte der mCherry-tag sein. Aufgrund der Größe des tags von rund 29 kDa könnte eventuell die Bindung des Fusionsproteins mCherry/Galektin-8 an die Plasmamembran verhindert werden.

4.4. Charakterisierung der K-Ras Interaktion mit Galektin-8 und Galektin-3

Es ist bereits publiziert, dass Galektin-3 mit K-Ras interagiert (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Frau Dr. Monika Unger und Frau Dr. Andreea Porr konnten im Rahmen ihrer Dissertationen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl zeigen, dass Galektin-8 long und short mit K-Ras interagieren. Beide Galektin-8 Isoformen interagieren deutlich schwächer mit H-Ras und N-Ras(G12V) („Charakterisierung des Einflusses von konstitutiv aktivem K-Ras(G12V) auf die Signaltransduktion und die Migration von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen“, Dissertation von Dr. rer. nat. Monika Unger, Universität Ulm, 2006; „Expression und Lokalisation von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 in Pankreaskarzinomzelllinien“, Dissertation von Dr. med. Andreea Porr, Universität Ulm, 2010).

4.4.1. Ko-Immunpräzipitationsstudien von K-Ras mit endogenem Galektin-8 und endogenem Galektin-3 in PANC-1 Zellen

Um nachzuweisen, ob K-Ras(G12V) mit endogenem Galektin-8 bzw. endogenem Galektin-3 in EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen interagiert, wurden Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt. Die Lyse der Zellen erfolgte in Gold-Lyse-Puffer. In zwei Experimenten wurde EGFP-K-Ras(G12V) aus Proteinzelllysaten der beiden Zelllinien durch anti-GFP-AK, gekoppelt an magnetische *beads* (Miltenyi-Biotec), präzipitiert und das daran gebundene Galektin-8 bzw. Galektin-3 ko-präzipitiert. Die Präzipitate wurden im Immunoblotverfahren analysiert.

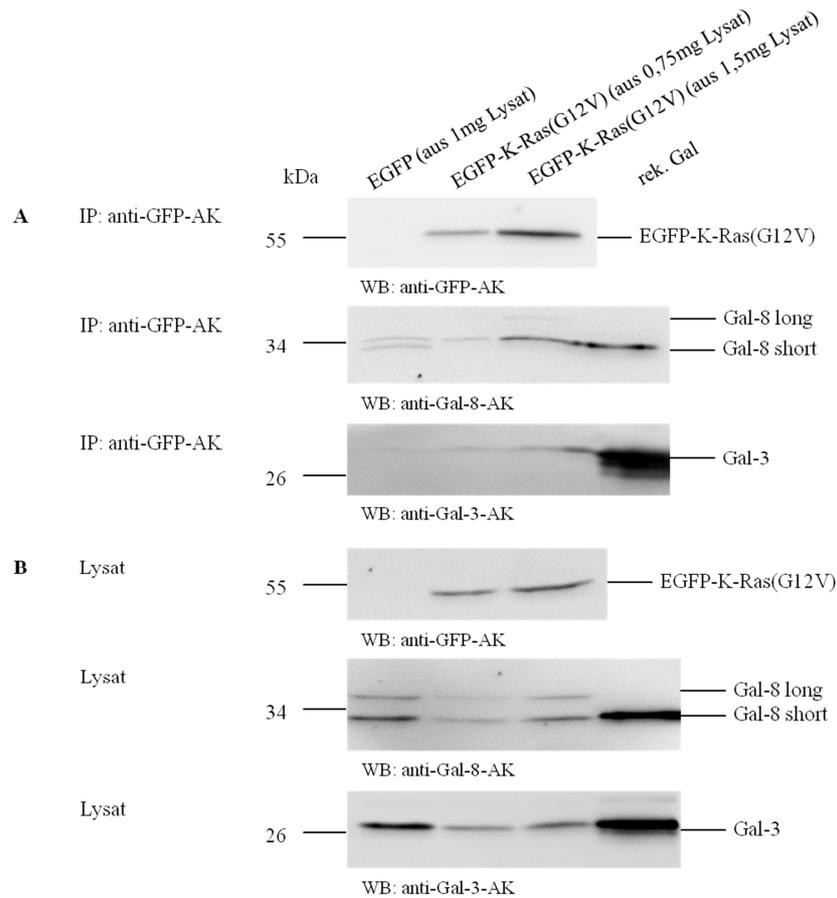


Abb. 4.7: Charakterisierung der Interaktion zwischen K-Ras(G12V) und endogenem Galektin-8 bzw. Galektin-3 aus PANC-1 Gesamtlisaten in Gold-Lyse-Puffer. EGFP (Klon 21)- und EGFP-K-Ras(G12V) (Klon 4.1)-exprimierende PANC-1 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert und in je 400 μ l Gold-Lyse-Puffer lysiert. A) Die Immunpräzipitation von EGFP erfolgte aus 1 mg PANC-1/EGFP Gesamtlisat, die von EGFP-K-Ras(G12V) aus 0,75 mg bzw. 1,5 mg PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Gesamtlisat mittels des μ MACSTM anti-GFP Epitope Tagged Protein Isolation Kits (Miltenyi-Biotec). Die Präzipitate sowie 20 ng rekombinantes Galektin-3 und 5 ng rekombinantes Galektin-8 wurden anschließend in einer 12,5 % SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. B) Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras(G12V) und Galektin in der IP wurden 1/20 der im Experiment eingesetzten Proteinmengen im Immunoblotverfahren analysiert. Der Nachweis von EGFP-K-Ras und der Galektine erfolgte mittels des monoklonalen anti-GFP-Antikörpers, des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers und des polyklonalen anti-Galektin-3-Antikörpers, sowie mittels ECL und AP Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert. Abkürzungen: AK: Antikörper; IP: Immunpräzipitation; rek.: rekombinant; WB: Western Blot Analyse.

Der repräsentative Immunoblot in Abbildung 4.7 A zeigt die unterschiedlichen Mengen an immunpräzipitiertem EGFP-K-Ras(G12V) in der Ko-Immunpräzipitation (Blot 1), die aufgrund der unterschiedlich eingesetzten Mengen an Gesamtlisat (0,75 mg und 1,5 mg) zustande kommen. Durch die Detektion von Galektin-8 im Präzipitat (Blot 2) konnte eine Interaktion von Galektin-8 short mit K-Ras(G12V) aus 1,5 mg Gesamtlisat nachgewiesen werden (Spur 3). Die EGFP-K-Ras(G12V)/Galektin-8 short Interaktion konnte nicht in 0,75 mg Gesamtlisat nachgewiesen werden, da die gleiche Menge an Galektin-8 short mit der Kontrolle EGFP (Spur 1) ko-präzipitierte.

Galektin-3 ko-präzipitierte nur sehr schwach mit EGFP-K-Ras(G12V) (Blot 3, Spur 3) aus 1,5 mg Gesamtllysate. Aus 0,75 mg Gesamtlysat (Blot 3, Spur 2) konnte keine spezifische Interaktion nachgewiesen werden, da etwa die gleiche Menge an Galektin-3 mit der Kontrolle EGFP (Blot 3, Spur 1) ko-präzipitierte.

Die abgebildeten Immunoblots in Teilabbildung B zeigen je 1/20 der in der Ko-Immunpräzipitation eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras(G12V), Galektin-8 und Galektin-3. Verglichen mit 50 µg des PANC-1/EGFP Gesamtlysat (Blot 3, Spur 1) wurde in 75 µg PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Gesamtlysat (Blot 3, Spur 3) nur etwa die Hälfte an Galektin-3 nachgewiesen. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte die stabile Expression von EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1 Zellen sein, die die Galektin-3 Proteinexpression reduziert. Dies konnte mehrfach in der Arbeitsgruppe bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Anhand des in Abbildung 4.7 dargestellten Versuchs konnte die Interaktion von K-Ras(G12V) mit Galektin-8 in Gold-Lyse-Puffer-Gesamtlysaten nachgewiesen werden. Die Interaktion zwischen K-Ras(G12V) und Galektin-3 konnte nur schwach nachgewiesen werden und war, verglichen mit der Publikation von Elad-Sfadia (2004) nicht zufriedenstellend.

Um diese Diskrepanz näher zu analysieren wurde der Gold-Lyse-Puffer durch den Zell-Lyse-Puffer von Cell Signaling (20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% TritonTM X-100) ersetzt. Letzterer enthält im Vergleich zum Gold-Lyse-Puffer die 3x Menge an NaCl und zusätzlich Na₂EDTA und EGTA. Für einen weiteren Ko-Immunpräzipitationsversuch wurden EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierende PANC-1 Zellen in Zell-Lyse-Puffer, versetzt mit 20 mM MgCl₂, lysiert. Magnesiumionen stabilisieren die Bindung von GTP an K-Ras (Bräse *et al.*, 2008; Ostrem *et al.*, 2013). EGFP-K-Ras(G12V) wurde wie in Kapitel 3.2.15 beschrieben präzipitiert und die Präzipitate im Immunoblotverfahren analysiert.

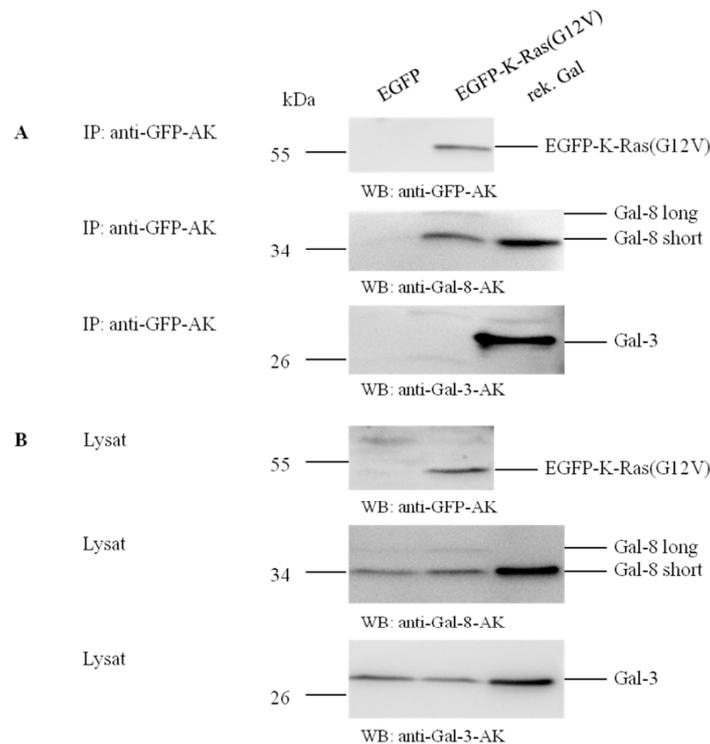


Abb. 4.8: Charakterisierung der Interaktion zwischen K-Ras(G12V) und endogenem Galektin-8 bzw. Galektin-3 aus PANC-1 Gesamtlisaten in Zell-Lyse-Puffer. EGFP (Klon 21)- und EGFP-K-Ras(G12V) (Klon 4.4)-exprimierende PANC-1 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert und in je 400 μ l Zell-Lyse-Puffer (Cell Signaling), versetzt mit 20 mM $MgCl_2$, lysiert. A) Die Immunpräzipitation von EGFP bzw. EGFP-K-Ras(G12V) erfolgte aus 3 mg PANC-1/EGFP bzw. PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Gesamtlisat mittels des μ MACSTM anti-GFP Epitope Tagged Protein Isolation Kits (Miltenyi-Biotec). Die Präzipitate sowie 5 ng rekombinantes Galektin-3 und 2,5 ng rekombinantes Galektin-8 wurden anschließend in einer 12,5 % SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. B) Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras(G12V) und Galektin in der IP wurden 1/50 der im Experiment eingesetzten Proteinmengen im Immunoblotverfahren analysiert. Der Nachweis von EGFP-K-Ras und der Galektine erfolgte mittels des monoklonalen anti-GFP-Antikörpers, des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers und des polyklonalen anti-Galektin-3-Antikörpers, sowie mittels ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert. Abkürzungen: AK: Antikörper; IP: Immunpräzipitation; rek.: rekombinant; WB: Western Blot Analyse.

Abbildung 4.8 A zeigt die Ergebnisse des Immunoblotverfahrens nach der Ko-Immunpräzipitation. Es wurde EGFP-K-Ras(G12V) bzw. EGFP präzipitiert. Im Präzipitat konnte Galektin-8 short deutlich und Galektin-8 long schwach detektiert werden. Eine Interaktion von EGFP-K-Ras(G12V) mit Galektin-3 konnte unter den verwendeten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Die Teilabbildung B stellt 1/50 der in der Ko-Immunpräzipitation eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras(G12V), Galektin-8 und Galektin-3 dar. Anhand der definierten Mengen der rekombinanten Galektine konnte abgeschätzt werden, wie viel endogenes Galektin-8 und Galektin-3 in der Ko-Immunpräzipitation eingesetzt wurde. In 3 mg PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Gesamtlisat befanden sich ca. 50 ng Galektin-8 und ca. 100 ng Galektin-3.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse unter den hier gewählten Bedingungen eine Interaktion von EGFP-K-Ras(G12V) mit Galektin-8, jedoch nicht mit Galektin-3.

Nachdem $MgCl_2$, die Detergenzien Na_2EDTA und EGTA und eine 3x erhöhte Konzentration an $NaCl$ keinen Einfluss auf die EGFP-K-Ras(G12V)/Galektin-3 Interaktion hatten, wurde in weiteren Versuchen der IP-Puffer (nach Shalom-Feuerstein *et al.*, 2008) verwendet. Verglichen mit dem Gold-Lyse-Puffer beinhaltet der IP-Puffer die 4x Menge an $NaCl$, jedoch nur die Hälfte an nichtionischen Tensiden (TritonTM X-100 bzw. NP-40).

In drei Experimenten wurden EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierende PANC-1 Zellen in IP-Puffer lysiert. In zwei der drei Experimente wurden zum Vergleich Zellen beider Zelllinien in Gold-Lyse-Puffer lysiert, da unter diesen Bedingungen zumindest eine schwache K-Ras(G12V)/Galektin-3 Interaktion gezeigt werden konnte (s. Abb. 4.7 A). In allen Ansätzen wurde EGFP-K-Ras(G12V) durch einen anti-GFP-AK, gekoppelt an magnetische *beads* (Miltenyi-Biotec), präzipitiert. Der präzipitierte Proteinkomplex wurde im Immunoblotverfahren analysiert.

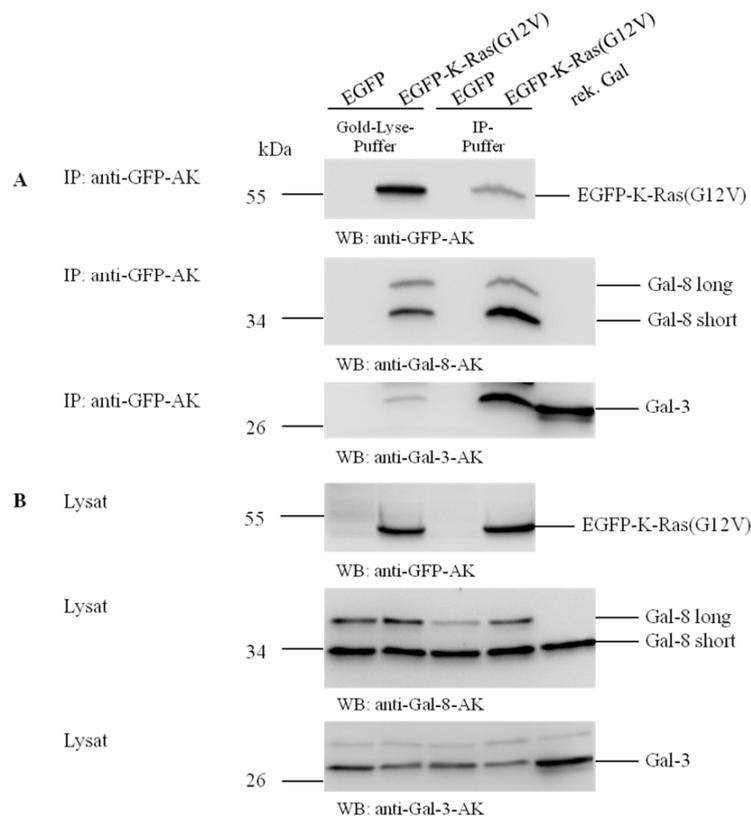


Abb. 4.9: Vergleich der Interaktion von K-Ras(G12V) mit endogenem Galektin-8 bzw. Galektin-3 in Gold-Lyse- und IP-Puffer. EGFP (Klon 21)- und EGFP-K-Ras(G12V) (Klon 4.4)-exprimierende PANC-1 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert und in je 400 μ l Gold-Lyse-Puffer bzw. IP-Puffer lysiert. A) Die Immunpräzipitation von EGFP bzw. EGFP-K-Ras(G12V) erfolgte aus 2,5 mg PANC-1/EGFP bzw. 5 mg PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Gesamtlisat mittels des μ MACSTM *anti-GFP Epitope Tagged Protein Isolation Kits* (Miltenyi-Biotec). Die Präzipitate sowie 10 ng rekombinantes Galektin-3 und 2,5 ng rekombinantes Galektin-8 wurden anschließend in einer 13,5 % SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. B) Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras(G12V) und Galektin in der IP wurden 1/100 der im Experiment eingesetzten Proteinnengen im Immunoblotverfahren analysiert. Der Nachweis von EGFP-K-Ras und der Galektine erfolgte mittels des monoklonalen anti-GFP-Antikörpers, des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers und des polyklonalen anti-

Galektin-3-Antikörper, sowie mittels ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert. Abkürzungen: AK: Antikörper; IP: Immunpräzipitation; rek.: rekombinant; WB: Western Blot Analyse.

Die repräsentativen Immunoblots aus drei Experimenten in Abbildung 4.9 A zeigen eine deutlich höhere Präzipitation von EGFP-K-Ras(G12V) in Gesamtlysaten von PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Zellen in Gold-Lyse-Puffer als in IP-Puffer. Galektin-8 long ko-präzipitierten gleichermaßen mit EGFP-K-Ras(G12V) in Gesamtlysaten von PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Zellen in beiden Puffern. Galektin-8 short ko-präzipitierte stärker in Gesamtlysaten in IP-Puffer. Im Vergleich zum Ansatz mit Gold-Lyse-Puffer wurde im Ansatz mit IP-Puffer trotz der deutlich geringeren Menge an präzipitiertem EGFP-K-Ras(G12V) mehr Galektin-8 short ko-präzipitiert. Die Ko-Immunpräzipitation von Galektin-3 und EGFP-K-Ras(G12V) konnte in Gesamtlysaten von PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Zellen in IP-Puffer nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass der IP-Puffer bessere Bedingungen für die Interaktion von Galektin-8 und Galektin-3 mit EGFP-K-Ras(G12V) bietet als der Gold-Lyse-Puffer.

In der Ko-Immunpräzipitation konnten keine unspezifischen Bindungen zwischen Galektin-8 oder Galektin-3 mit EGFP detektiert werden.

In der Teilabbildung B sind 1/100 der in der Ko-Immunpräzipitation eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras(G12V), Galektin-8 und Galektin-3 dargestellt. In den Gesamtlysaten von PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Zellen in Gold-Lyse- bzw. IP-Puffer befanden sich die gleichen Mengen an EGFP-K-Ras(G12V) und Galektin-8 short. Die Galektin-3 Detektion zeigt die gleichen Mengen an Galektin-3 in Gesamtlysaten von PANC-1/EGFP Zellen in Gold-Lyse- bzw. IP-Puffer. In den Gesamtlysaten der PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Zellen in Gold-Lyse- bzw. IP-Puffer konnten leicht geringere Mengen an Galektin-3 nachgewiesen werden, da die stabile Expression von EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1 Zellen die Galektin-3 Proteinexpression reduziert.

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Galektin-8 mit EGFP-K-Ras(G12V) *in vitro* in IP-Puffer stärker ist als in Gold-Lyse-Puffer, da EGFP-K-Ras(G12V) zwar besser aus Gold-Lyse-Puffer als aus IP-Puffer Gesamtlysaten präzipitiert werden konnte, die Menge an gebundenem, ko-präzipitierten Galektin-8 jedoch gleich ist. Die Interaktion von EGFP-K-Ras(G12V) mit Galektin-3 konnte stärker in IP-Puffer als in Gold-Lyse-Puffer Gesamtlysaten nachgewiesen werden.

4.4.2. Ko-Immunpräzipitation von farnesyldefizienten K-Ras Mutanten mit Galektin-3 in HEK293 Zellen

Für die Interaktion der Ras Proteine mit der Plasmamembran ist die Farnesylierung der Proteine unerlässlich. In Ko-Immunpräzipitationsversuchen mit Fibroblastenzelllysaten konnte gezeigt werden, dass farnesyliertes, konstitutiv aktives K-Ras(G12V) mit Galektin-3 interagiert. Eine farnesyldefiziente K-Ras(G12V,C185S) Mutante, bei der an Position 185 das Cystein durch ein Serin ersetzt wurde war nicht mehr in der Lage mit Galektin-3 zu interagieren (Elad-Sfadia *et al.*, 2004).

Im Rahmen von Experimenten, die von Sourav Chakraborty in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnte durch die Präparation von partikulären und löslichen Proteinen aus transient transfizierten HEK293 Zellen gezeigt werden, dass der Verlust der Farnesylierung von konstitutiv aktivem EGFP-K-Ras(G12V,C185S) und dominant negativem EGFP-K-Ras(S17N,C185S) zu einer Verlagerung der Lokalisation der Proteine aus der partikulären, membranhaltigen in die lösliche, zytosolische Fraktion führte (Laborbuch Sourav Chakraborty, 2011).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst in 3 Experimenten die Interaktion von Galektin-3 mit konstitutiv aktivem K-Ras(G12V) sowie der korrespondierenden farnesyldefizienten Mutante K-Ras(G12V,C185S) charakterisiert. Dazu wurden HEK293 Zellen verwendet, da diese keine endogene Galektinexpression aufweisen. Die Zellen wurden mit pcDNA3/hum Galektin-3 und pEGFP-C1, pEGFP-C1/K-Ras(G12V) oder pEGFP-C1/K-Ras(G12V,C185S) ko-transfiziert und nach 48 h in IP-Puffer lysiert. Für den Einsatz gleicher Mengen an EGFP-K-Ras in der Ko-Immunpräzipitation wurden zunächst im Immunoblotverfahren die vorhandenen EGFP-K-Ras Mengen ermittelt und angeglichen (Daten nicht gezeigt). Die Ko-Immunpräzipitation der K-Ras Mutanten und Galektin-3 erfolgte mittels des μ MACSTM anti-GFP Epitope Tagged Protein Isolation Kits (Miltenyi-Biotec). Der Nachweis der K-Ras Mutanten und Galektin-3 erfolgte im Immunoblotverfahren.

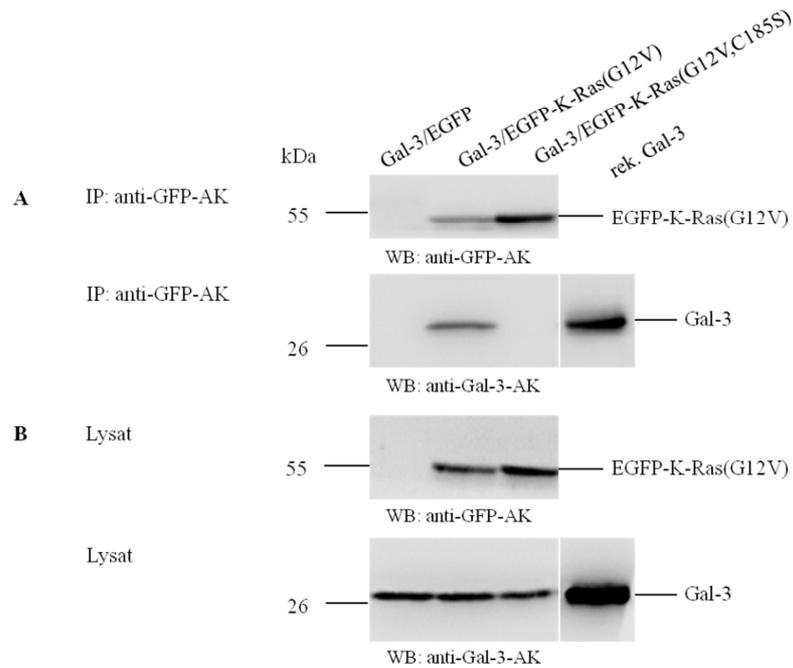


Abb. 4.10: Interaktionsanalyse zwischen Galektin-3 und K-Ras Mutanten. HEK293 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen bei einer Konfluenz von 80 % mit jeweils 5 μ g der entsprechenden Plasmide, die für Galektin-3 und EGFP, EGFP-K-Ras(G12V) bzw. EGFP-K-Ras(G12V,C185S) kodieren, ko-transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in 400 μ l IP-Puffer lysiert. A) Die Ko-Immünpräzipitation der EGFP bzw. EGFP-K-Ras(G12V) Komplexe erfolgte aus 6 mg Gesamtlysat mittels des μ MACSTM anti-GFP Epitope Tagged Protein Isolation Kits (Miltenyi-Biotec). Die Präzipitate sowie 10 ng rekombinantes Galektin-3 wurden anschließend in einer 12,5 % SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. B) Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras und Galektin-3 in der IP wurden 1/100 der im Experiment eingesetzten Proteinmengen im Immunoblotverfahren analysiert. Der Nachweis von EGFP-K-Ras und Galektin-3 erfolgte mittels des monoklonalen anti-GFP-Antikörpers und des polyklonalen anti-Galektin-3-Antikörpers, sowie mittels ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert. Abkürzungen: AK: Antikörper; IP: Immunpräzipitation; rek.: rekombinant; WB: Western Blot Analyse.

In Abbildung 4.10 A sind charakteristische Immunoblots der Ko-Präzipitation der EGFP-K-Ras Mutanten mit Galektin-3 präsentiert. Im Präzipitat konnte im Vergleich zu EGFP-K-Ras(G12V) (Spur 2) die ca. 2x Menge an EGFP-K-Ras(G12V,C185S) (Spur 3) nachgewiesen werden. Galektin-3 interagiert mit EGFP-K-Ras(G12V), aber nicht mit der farnesyldefizienten Mutante EGFP-K-Ras(G12V,C185S). In Teilabbildung B sind die Kontrollblots zu den in der Ko-Immünpräzipitation eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras und Galektin-3 dargestellt. Hier wurden etwa gleiche Mengen EGFP-K-Ras(G12V) und EGFP-K-Ras(G12V,C185S) detektiert. Galektin-3 wurde gleichmäßig in der Kontrolle (Gal-3/EGFP), Gal-3/EGFP-K-Ras(G12V) und Gal-3/EGFP-K-Ras(G12V,C185S) detektiert.

In drei unabhängigen Experimenten konnte die Interaktion von Galektin-3 mit EGFP-K-Ras(G12V) nachgewiesen werden. Da Galektin-3 nicht mit der farnesyldefizienten Mutante EGFP-K-Ras(G12V,C185S) ko-präzipitierte, ist die Interaktion abhängig von der Farnesylierung des K-Ras C-Terminus. Zusammenfassend wurde somit die von Elad-Sfadia publizierte, farnesylabhängige Interaktion von K-Ras(G12V) bestätigt.

4.4.3. Ko-Immunpräzipitation von farnesyldefizienten K-Ras Mutanten mit Galektin-8 short und Galektin-8 long in HEK293 Zellen

Um die Interaktion von Galektin-8 mit konstitutiv aktivem K-Ras(G12V), dominant negativem K-Ras(S17N) und den korrespondierenden farnesyldefizienten Mutanten K-Ras(G12V,C185S) und K-Ras(S17N,C185S) zu untersuchen, wurden die Ko-Immunpräzipitationsexperimente wie für die Interaktion von K-Ras mit Galektin-3 beschrieben durchgeführt. Für die Zelllyse wurde jedoch statt des IP-Puffers der Gold-Lyse-Puffer verwendet.

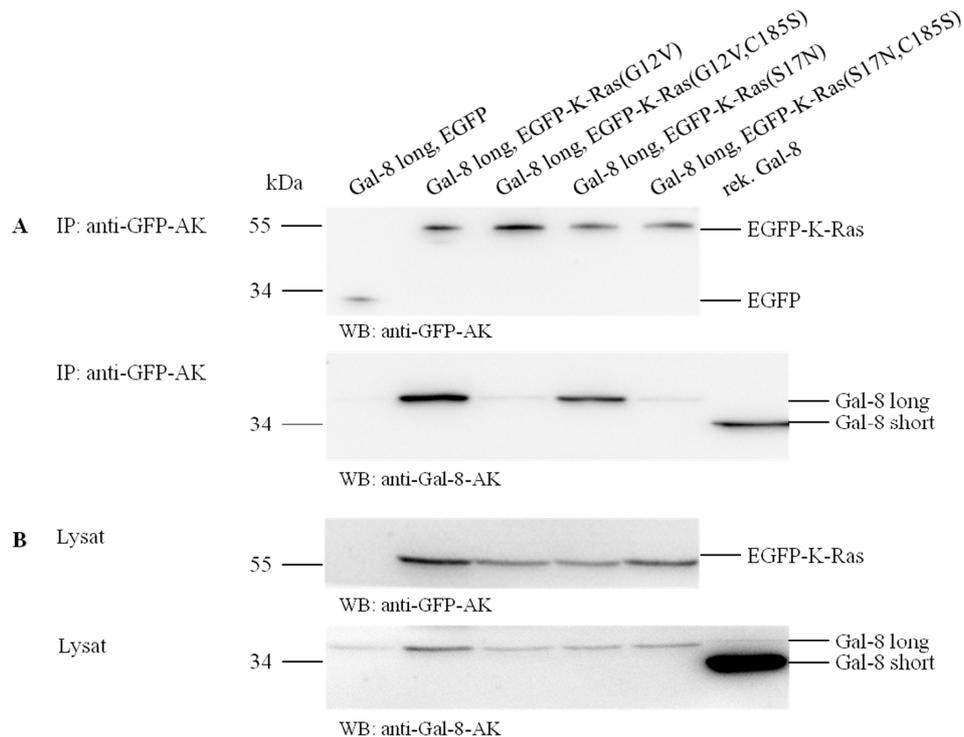


Abb. 4.11: Interaktionsanalyse zwischen Galektin-8 long und K-Ras Mutanten. HEK293 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen bei einer Konfluenz von 80 % mit jeweils 5 µg der entsprechenden Plasmide, die für Galektin-8 long und EGFP, EGFP-K-Ras(G12V), EGFP-K-Ras(G12V,C185S), EGFP-K-Ras(S17N) bzw. EGFP-K-Ras(S17N,C185S) kodieren, ko-transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in 400 µl Gold-Lyse-Puffer lysiert. A) Die Ko-Immunpräzipitation des EGFP und EGFP-K-Ras(S17N,C185S) Komplexes erfolgte aus 0,5 mg Gesamtllysate, die der EGFP-K-Ras(G12V), EGFP-K-Ras(G12V,C185S) und EGFP-K-Ras(S17N) Komplexe aus 1 mg Gesamtllysate mittels des μ MACSTM anti-GFP Epitope Tagged Protein Isolation Kits (Miltenyi-Biotec). Die Präzipitate sowie 5 ng rekombinantes Galektin-8 wurden anschließend in einer 13,5 % SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. B) Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras und Galektin-8 long in der IP wurden 1/20 der im Experiment eingesetzten Proteinmengen im Immunoblotverfahren analysiert. Der Nachweis von EGFP-K-Ras und Galektin-8 long erfolgte mittels des monoklonalen anti-GFP-Antikörpers und des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers, sowie mittels ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert. Abkürzungen: AK: Antikörper; IP: Immunpräzipitation; rek.: rekombinant; WB: Western Blot Analyse.

Die repräsentativen Immunoblots aus drei Experimenten in Abbildung 4.11 A zeigen, dass etwa gleichen Mengen EGFP-K-Ras(G12V), EGFP-K-Ras(S17N) und EGFP-K-Ras(S17N,C185S) durch den anti-GFP-AK, gekoppelt an magnetischen *beads* (Miltenyi-Biotec), präzipitiert wurden. Im Vergleich dazu wurde eine leicht erhöhte Menge EGFP-K-

Ras(G12V,C185S) präzipitiert. Galektin-8 long wurde mit EGFP-K-Ras(S17N) und etwa 1,5x stärker mit EGFP-K-Ras(G12V) ko-präzipitiert. Eine schwache Ko-Präzipitation von Galektin-8 long konnte mit den farnesyldefizienten K-Ras Mutanten EGFP-K-Ras(G12V,C185S) bzw. EGFP-K-Ras(S17N,C185S) und der Kontrolle EGFP detektiert werden. Aus den Kontrollen der in der Immunpräzipitation eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras und Galektin-8 long in Teilabbildung B geht hervor, dass in Spur 2 (Gal-8 long/EGFP-K-Ras(G12V)) und Spur 5 (Gal-8 long/EGFP-K-Ras(S17N,C185S)) mehr EGFP-K-Ras eingesetzt wurde als in den Spuren 3 und 4 (Gal-8 long/EGFP-K-Ras(G12V,C185S) und Gal-8 long/EGFP-K-Ras(S17N)). In der Ko-Immunpräzipitation wurde in Spur 2 jedoch weniger EGFP-K-Ras(G12V) als EGFP-K-Ras(G12V,C185S) in Spur 3 detektiert. Des Weiteren wurde in Spur 2 (Gal-8 long/EGFP-K-Ras(G12V)) der Teilabbildung B mehr Galektin-8 long detektiert.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente eine Interaktion von Galektin-8 long mit sowohl EGFP-K-Ras(G12V) als auch etwas schwächer mit EGFP-K-Ras(S17N). Die K-Ras/Galektin-8 long Interaktion ist demnach unabhängig davon, ob K-Ras in GTP- oder GDP-gebundener Form vorliegt. In zwei von drei Versuchen wurde Galektin-8 long mit EGFP-K-Ras(G12V,C185S) und EGFP-K-Ras(S17N,C185S) ko-präzipitiert. Die dabei detektierten Mengen an Galektin-8 long waren jedoch vergleichbar mit denen, die mit der Kontrolle EGFP ko-präzipitiert wurden. Die Interaktion von Galektin-8 long mit den farnesyldefizienten K-Ras Mutanten ist somit unspezifisch. Dies bedeutet, dass für die K-Ras/Galektin-8 long Interaktion die Farnesylierung von großer Bedeutung ist.

In den Ko-Immunpräzipitationsstudien mit Galektin-8 long und der farnesyldefizienten Mutante K-Ras(G12V,C185S) wurden die gleichen Ergebnisse erzielt wie in den Ko-Immunpräzipitationen mit Galektin-3 und der farnesyldefizienten K-Ras(G12V,C185S) Mutante (s. Kapitel 4.4.2.).

Um zu untersuchen, ob Galektin-8 short die gleichen Bindungseigenschaften wie Galektin-8 long aufweist, wurden die gleichen Experimente mit der Isoform Galektin-8 short 3x wiederholt.

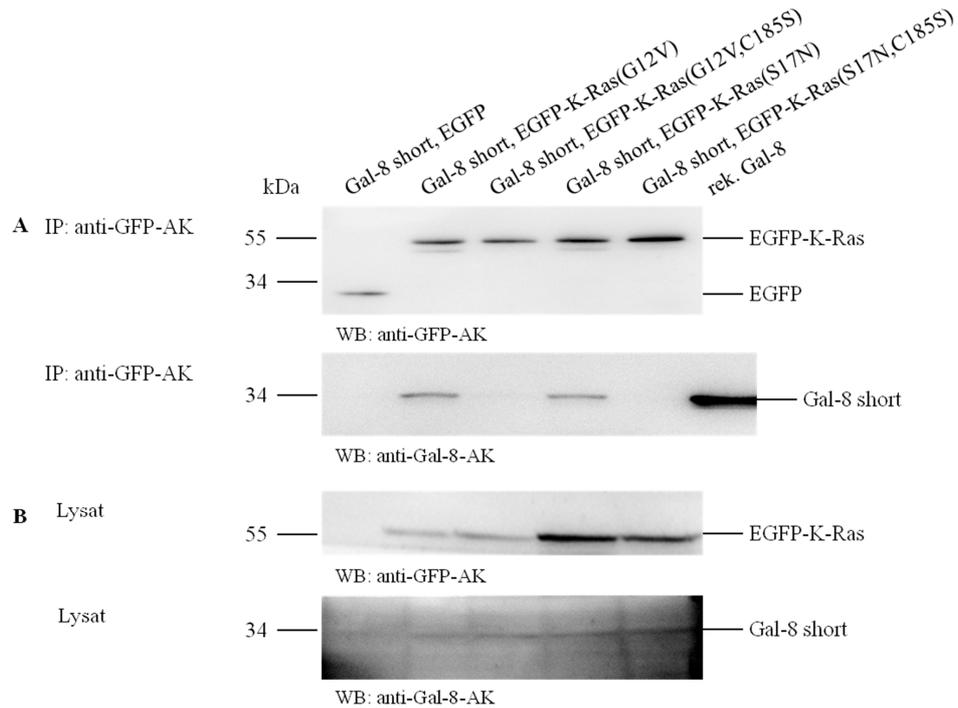


Abb. 4.12: Interaktionsanalyse zwischen Galektin-8 short und K-Ras Mutanten. HEK293 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen bei einer Konfluenz von 80 % mit jeweils 5 µg der entsprechenden Plasmide, die für Galektin-8 short und EGFP, EGFP-K-Ras(G12V), EGFP-K-Ras(G12V,C185S), EGFP-K-Ras(S17N) bzw. EGFP-K-Ras(S17N,C185S) kodieren, ko-transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in 400 µl Gold-Lyse-Puffer lysiert. A) Die Ko-Immunpräzipitation des EGFP-K-Ras(S17N) Komplexes erfolgte aus 0,7 mg Gesamtlisat, die der übrigen EGFP und EGFP-K-Ras Komplexe aus 1 mg Gesamtlisat mittels des *µMACSTM anti-GFP Epitope Tagged Protein Isolation Kits* (Miltenyi-Biotec). Die Präzipitate sowie 5 ng rekombinantes Galektin-8 wurden anschließend in einer 13,5 % SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. B) Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras und Galektin-8 short in der IP wurden 1/20 der im Experiment eingesetzten Proteinmengen im Immunoblotverfahren analysiert. Der Nachweis von EGFP-K-Ras und Galektin-8 short erfolgte mittels des monoklonalen anti-GFP-Antikörpers und des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers, sowie mittels ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert. Abkürzungen: AK: Antikörper; IP: Immunpräzipitation; rek.: rekombinant; WB: Western Blot Analyse.

Die Immunoblots in Abbildung 4.12 A weisen vergleichbare Mengen von sowohl EGFP-K-Ras(G12V) und EGFP-K-Ras(G12V,C185S) als auch von EGFP-K-Ras(S17N) und EGFP-K-Ras(S17N,C185S) auf. Die Daten zeigen, dass Galektin-8 short mit EGFP-K-Ras(G12V) und EGFP-K-Ras(S17N) ko-präzipitieren. Eine Interaktion zwischen Galektin-8 short und EGFP-K-Ras(G12V,C185S) konnte nur schwach und mit EGFP-K-Ras(S17N,C185S) nicht nachgewiesen werden.

Die Immunoblots der Kontrollen in Abbildung 4.13 B dokumentieren, dass verglichen mit EGFP-K-Ras(G12V) und EGFP-K-Ras(G12V,C185S) etwa die dreifache Menge an EGFP-K-Ras(S17N) und EGFP-K-Ras(S17N,C185S), jedoch die gleichen Mengen an Galektin-8 short in der Proteinkomplex-Immunpräzipitation eingesetzt wurden.

In zwei der drei durchgeführten Experimente konnten Interaktionen zwischen Galektin-8 short und K-Ras(G12V) bzw. K-Ras(S17N) nachgewiesen werden. In einem Experiment

wurde Galektin-8 short lediglich mit K-Ras(G12V), nicht aber mit K-Ras(S17N) ko-präzipitiert. In letzterem Experiment wurde im Vergleich zu dem Ansatz Galektin-8 short/EGFP-K-Ras(G12V) im Ansatz Galektin-8 short/EGFP-K-Ras(S17N) jedoch deutlich weniger Galektin-8 short in der Ko-Immunpräzipitation eingesetzt. Die Menge an Galektin-8 short könnte zu gering gewesen sein, um eine Interaktion mit EGFP-K-Ras(S17N) nachweisen zu können. Die Interaktionen zwischen Galektin-8 short und den farnesyldefizienten Mutanten K-Ras(G12V,C185S) und K-Ras(S17N, C185S) wurden in den weiteren Immunoblotanalysen nicht detektiert.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten der transienten Ko-Expressionen und Ko-Immunpräzipitationen, dass Galektin-3 und beide Galektin-8 Isoformen mit K-Ras.GTP und K-Ras.GDP interagieren. Für diese Interaktionen ist die Farnesylierung des K-Ras C-Terminus unabdingbar.

4.4.4. Charakterisierung der Bindung von Galektin-8 und Galektin-3 an K-Ras(G12V) in PANC-1 Zellen

In Kapitel 4.4.1. konnte beschrieben werden, dass sowohl Galektin-8 long und short als auch Galektin-3 mit K-Ras(G12V) interagieren. Mit dem folgenden Experiment sollte geklärt werden, ob die Galektine miteinander um die Bindung an K-Ras(G12V) konkurrieren. Eine verstärkte Bindung des einen Galektin gegenüber des anderen, könnte unter Umständen zur Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege und somit zu unterschiedlichen zellulären Effekten führen.

Es wurden keine Versuche mit ektopter Galektin-8 bzw. Galektin-3 Proteinexpression durchgeführt, da es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen ist, die Galektin-8 Expression um das mindestens 2x zu steigern. Aus diesem Grund wurde die Proteinexpression der Galektine mittels siRNAs (*small interfering RNAs*) inhibiert. Es wurden nur Versuche ausgewertet, die eine um mindestens 50 % reduzierte Galektin-8 bzw. Galektin-3 Proteinexpression aufzeigten. Um zu untersuchen, ob mehr Galektin-8 in Abwesenheit von Galektin-3 mit EGFP-K-Ras(G12V) ko-präzipitiert, wurde in einem Versuchsansatz die Galektin-3 Proteinexpression mittels spezifischer siRNAs (Gal-3 si-7 und Gal-3 si-8) inhibiert. Für die Charakterisierung der Bindung von Galektin-3 an K-Ras(G12V) in Abwesenheit von Galektin-8 wurden spezifische siRNAs, die gegen Galektin-8 gerichtet sind (Gal-8 si-5 und Gal-8 si-8), verwendet. Bei siRNAs handelt es sich um RNA-Moleküle mit einer Länge von 20-25 Basenpaaren. Durch die Anlagerung der siRNAs an komplementäre

Einzelstränge der Ziel-RNA (s. Tabelle 4.6) werden diese von RISC (*RNA-induced silencing complex*) erkannt und zerstört. Dadurch wird die Translation zum Protein verhindert.

Tab. 4.6: Übersicht der verwendeten siRNAs und ihrer Positionen. Dargestellt sind die Positionen, an denen die siRNAs sich an die mRNA von Galektin-8 long (NCBI: NM_006499.4), Galektin-8 short (NCBI: BC016486.2) und Galektin-3 (NCBI: AB006780.1) anlagern.

siRNA	Position der Anlagerung der siRNA an der Ziel-mRNA
Gal-8 si-5	bp 1100-1118 Galektin-8 long (NM_006499.4) bp 981-999 Galektin-8 short (BC016486.2)
Gal-8 si-8	bp 1346-1362 Galektin-8 long (NM_006499.4) bp 1227-1243 Galektin-8 short (BC016486.2)
Gal-3 si-7	bp 897-915 Galektin-3 (AB006780.1)
Gal-3 si-8	bp 537-555 Galektin-3 (AB006780.1)

Für diese Versuche wurden EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierende PANC-1 Zellen gewählt, da diese im Gegensatz zu HEK293 Zellen endogen Galektin-8 und Galektin-3 exprimieren.

4.4.4.1. siRNA-vermittelte Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression in PANC-1 Zellen

Um die Bedingungen der möglichst starken siRNA-vermittelten Inhibierung (50-100 %) der Galektin-8 und Galektin-3 Expression in PANC-1 Zellen zu ermitteln, wurden die Zellen mit jeweils zwei spezifischen siRNAs gegen Galektin-8 (Gal-8 si-5 und Gal-8 si-8) und Galektin-3 (Gal-3 si-7 und Gal-3 si-8) transfiziert. Als Kontrolle dienten PANC-1 Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA, welche keinerlei Homologie zu bekannten Genen aufweist, transfiziert wurden. Die Endkonzentrationen der transfizierten siRNAs betragen zwischen 50 nM und 100 nM. Des Weiteren wurden die beiden Transfektionsreagenzien DMRIE-C (Invitrogen) und peqFECT siRNA (PEQLAB Biotechnologie GmbH) verglichen. Die Zellen wurden nach 48 h lysiert. Die Detektion von Galektin-8 und Galektin-3 erfolgte im Immunoblotverfahren.

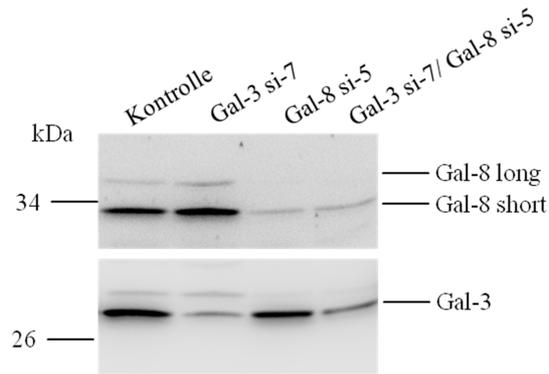


Abb. 4.13: siRNA-vermittelte Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Proteinexpression in PANC-1 Zellen. PANC-1 Zellen wurden in einer 6-Lochzellkulturplatte (4×10^5 Zellen/Loch) für 24 h bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert und mit jeweils 50 nM siRNA gegen Galektin-8 (Gal-8 si-5) und gegen Galektin-3 (Gal-3 si-7) mittels des Transfektionsreagenzes peqFECT siRNA transfiziert. In einem weiteren Ansatz wurde die Kombination der beiden siRNAs (50 nM Gal-3 si-7/50 nM Gal-8 si-5) transfiziert. Als Kontrolle dienten mit Kontroll-siRNA transfizierte PANC-1 Zellen. Nach 48 h wurden die Zellen in jeweils 75 μ l RIPA-Puffer lysiert und je 50 μ g Gesamtlisat in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion der Galektine mit dem monoklonalen anti-Galektin-8- und dem polyklonalen anti-Galektin-3-Antikörper sowie ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Die exemplarischen Immunoblots in Abbildung 4.13 zeigen, dass 48 h nach der Transfektion der siRNAs Gal-8 si-5 und Gal-3 si-7/Gal-8 si-5 eine Inhibierung von Galektin-8 long und Galektin-8 short um 90 % zu sehen ist. Des Weiteren wird deutlich, dass die siRNA Gal-8 si-5, die spezifisch gegen Galektin-8 gerichtet ist, sowohl die Expression der Isoform Galektin-8 long als auch die Expression der Isoform Galektin-8 short beeinflusst. Für Galektin-3 wurde eine Gal-3 si-7-vermittelte Proteininhibierung von 80 % nachgewiesen. Die Transfektion der Kombination Gal-3 si-7/Gal-8 si-5 zeigte einen etwa 60 %igen *knock down* der Galektin-3 Proteinexpression.

Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten lassen den Schluss zu, dass in PANC-1 Zellen eine Proteininhibierung von Galektin-8 und Galektin-3 um mindestens 50 % durch die Verwendung von 50 nM Gal-8 si-5 und Gal-3 si-7 nach 48 h vermittelt wird.

Darüber hinaus wurde jeweils eine weitere spezifische siRNA gegen Galektin-8 (Gal-8 si-8) und Galektin-3 (Gal-3 si-8) getestet. Es konnten im Vergleich zu Gal-8 si-5 und Gal-3 si-7 keine Unterschiede bezüglich der Proteininhibierungen oder Endkonzentrationen festgestellt werden. Bei Transfektionen mit dem Reagenz peqFECT siRNA reichten siRNA-Endkonzentrationen von 50 nM aus, während bei Transfektionen mit DMRIE-C Endkonzentrationen von 75 nM bis 100 nM benötigt wurden. Aufgrund der hohen Zytotoxizität von DMRIE-C erfolgte bereits 6 h nach der Transfektion ein Medienwechsel. Bei der Transfektion mit peqFECT siRNA erfolgte der Medienwechsel erst nach 24 h, da dieses Reagenz weniger toxisch für die Zellen war.

In weiteren Versuchen wurden die Bedingungen für eine siRNA-vermittelte Galektin-8 und Galektin-3 Proteininhibierung in EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen bestimmt. Die Zellen wurden ebenfalls mit Gal-8 si-5, Gal-8 si-8, Gal-3 si-7, Gal-3 si-8 und einer Kontroll-siRNA mittels peqFECT siRNA transfiziert. Aufgrund der Zytotoxizität und der erzielten Ergebnisse in PANC-1 Zellen wurden keine Vergleiche mit DMRIE-C angestellt. Die Endkonzentrationen der verwendeten siRNAs betragen zwischen 50 nM und 75 nM. Die Zellen wurden nach 48 h lysiert. Die Detektion von Galektin-8 und Galektin-3 erfolgte im Immunoblotverfahren.

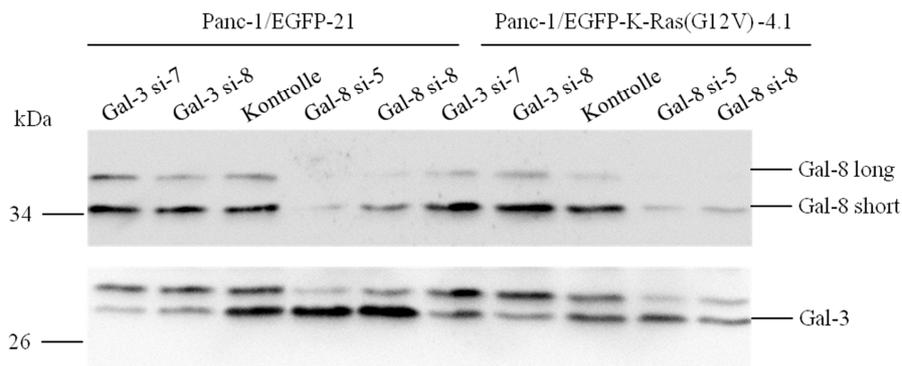


Abb. 4.14: siRNA-vermittelte Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Proteinexpression in EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen. PANC-1/EGFP (Klon 21) und PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) (Klon 4.1) Zellen wurden in einer 6-Lochzellkulturplatte (4×10^5 Zellen/Loch) für 24 h bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert und mit jeweils 75 nM Gal-3 si-7 und Gal-3 si-8 bzw. 50 nM Gal-8 si-5 und Gal-8 si-8 mittels peqFECT siRNA transfiziert. Als Kontrolle dienten mit Kontroll-siRNA transfizierte PANC-1/EGFP und PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Zellen. Nach 48 h wurden die Zellen in jeweils 75 μ l RIPA-Puffer lysiert und je 50 μ g Gesamtlysat in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion der Galektine mit dem monoklonalen anti-Galektin-8- und dem polyklonalen anti-Galektin-3-Antikörper sowie ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Die in Abbildung 4.14 exemplarischen Immunoblots zeigen eine um >90 % bzw. 60 % reduzierte Galektin-8 Proteinexpression in PANC-1/EGFP Gesamtlysaten vermittelt durch Gal-8 si-5 bzw. Gal-8 si-8 (50 nM Endkonzentration). In PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Gesamtlysaten wurde die Galektin-8 Proteinexpression durch beide siRNAs (Gal-8 si-5 und Gal-8 si-8; 50 nM Endkonzentration) um jeweils ca. 90 % reduziert. Die Transfektion von Gal-3 si-7 bzw. Gal-3 si-8 (Endkonzentration 75 nM) führte zu einer Inhibierung der Galektin-3 Proteinexpression um 80 % bzw. 70 % in PANC-1/EGFP Gesamtlysaten und um 20 % bzw. 60 % in PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Gesamtlysaten.

In zwei Experimenten konnte in beiden verwendeten Zelllinien nach 48 h eine siRNA-vermittelte Reduktion der Galektin-8 Proteinexpression durch Gal-8 si-5 und Gal-8 si-8 um mindestens 60 % detektiert werden. In beiden Versuchen wurden stärkere Inhibierungen durch die Verwendung der siRNA Gal-8 si-5 erreicht. Die Inhibierung der Galektin-3

Expression wurde in einem Experiment stärker durch Gal-3 si-7 als durch Gal-3 si-8 und in einem zweiten Experiment stärker durch Gal-3 si-8 als durch Gal-3 si-7 erzielt.

In der Gesamtheit führten diese Ergebnisse dazu, dass für die Inhibierung der Galektin-8 bzw. Galektin-3 Proteinexpression in sowohl PANC-1 als auch in EGFP- oder EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen Gal-8 si-5 bzw. Gal-3 si-7 in einer Endkonzentration von 50 nM bzw. 75 nM bis 100 nM eingesetzt wurden. Als Transfektionsreagenz wurde, aufgrund der niedrigen Toxizität, peqFECT siRNA verwendet und die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert.

4.4.4.2. Ko-Immünpräzipitationen von EGFP-K-Ras(G12V) mit Galektin-8 und Galektin-3

Zur Charakterisierung der Bindung von Galektin-8 und Galektin-3 an K-Ras(G12V) wurde die Galektin-8 Proteinexpression in PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) siRNA-vermittelt inhibiert. Anschließend wurde EGFP-K-Ras(G12V) wie in Kapitel 3.2.15 beschrieben präzipitiert und die Präzipitate im Immunoblotverfahren analysiert.

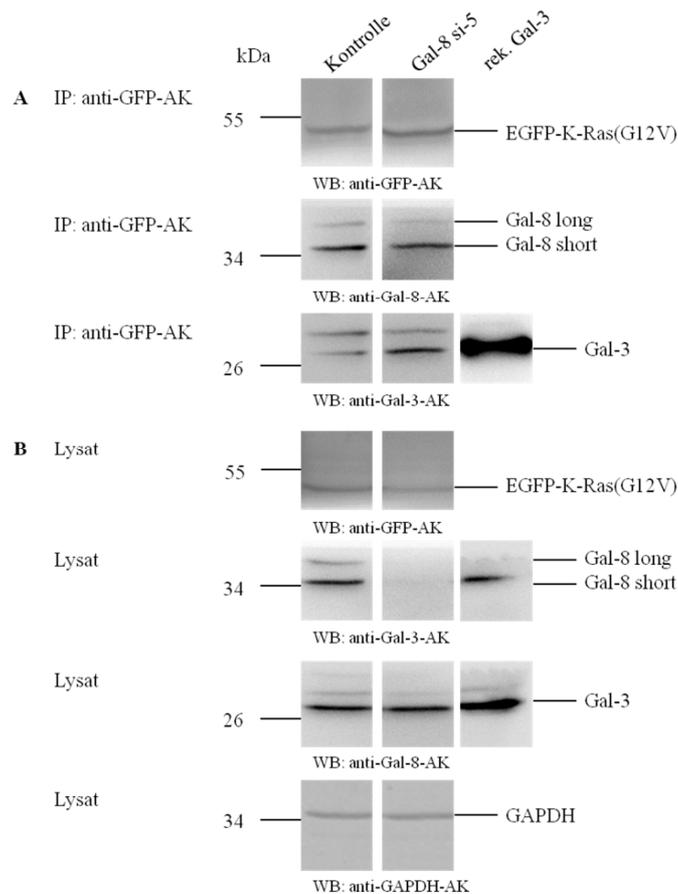


Abb. 4.15: Charakterisierung der Bindung von Galektin-8 und Galektin-3 an EGFP-K-Ras(G12V). EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierende PAC-1 Zellen (Klon 4.1) wurden bei einer 90 %igen Konfluenz in 10 cm Zellkulturschalen mit einer siRNA gegen Galektin-8 (Gal-8 si-5; Endkonzentration 50 nM) transfiziert. Als Kontrolle dienten mit Kontroll-siRNA transfizierte PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Zellen (Klon 4.1). 48 h nach der Transfektion wurden in Zellen in jeweils 400 µl IP-Puffer lysiert. A) Die Ko-Immünpräzipitation von EGFP-

K-Ras(G12V) und Galektin-8 bzw. Galektin-3 erfolgte aus 2 mg Gesamtlisat mittels des μ MACSTM anti-GFP Epitope Tagged Protein Isolation Kits (Miltenyi-Biotec). Die Präzipitate sowie 2,5 ng bzw. 5 ng rekombinantes Galektin-8 bzw. Galektin-3 wurden anschließend in einer 12,5 % SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. B) Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras und Galektin-8 bzw. -3 in der IP wurden 1/40 der im Experiment eingesetzten Proteinnengen im Immunoblotverfahren analysiert. Der Nachweis von EGFP-K-Ras, Galektin-8 und Galektin-3 erfolgte durch den monoklonalen anti-GFP-Antikörper, den monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörper und den polyklonalen anti-Galektin-3-Antikörper, sowie mittels ECL Detektion. Um eine gleichmäßige Proteinbeladung in den einzelnen Spuren nachzuweisen, wurde der polyklonale anti-GAPDH-Antikörper verwendet. Ein Proteinstandard ist links markiert. Abkürzungen: AK: Antikörper; IP: Immunpräzipitation; rek.: rekombinant; WB: Western Blot Analyse.

Der Immunoblot in Abbildung 4.15 A zeigt eine gleichmäßige Detektion des präzipitierten EGFP-K-Ras(G12V) in den Spuren 1 (Kontrolle) und 2 (Gal-8 si-5). Verglichen mit der Kontrolle konnte aus dem Lysat der Zellen, die mit Gal-8 si-5 transfiziert wurden, wie zu erwarten, weniger ko-präzipitiertes Galektin-8 long bzw. short im Immunoblotverfahren aufgezeigt werden. Es wurde jedoch im Vergleich zu der Kontrolle deutlich mehr Galektin-3 aus den Gal-8 si-5 Zelllysaten ko-präzipitiert. Das bedeutet, dass in Abwesenheit von Galektin-8 mehr Galektin-3 an EGFP-K-Ras(G12V) bindet.

Teilabbildung B zeigt 1/40 der in der Ko-Immunpräzipitation eingesetzten Mengen an EGFP-K-Ras(G12), Galektin-8 und Galektin-3. Im Vergleich zur Kontrolle wurde eine leicht geringere Menge an EGFP-K-Ras(G12V) im Gal-8 si-5 Lysat in der Ko-Immunpräzipitation eingesetzt wurde. Die Detektion von Galektin-8 dokumentiert eine durch Gal-8 si-5 verminderte Galektin-8 Proteinexpression.

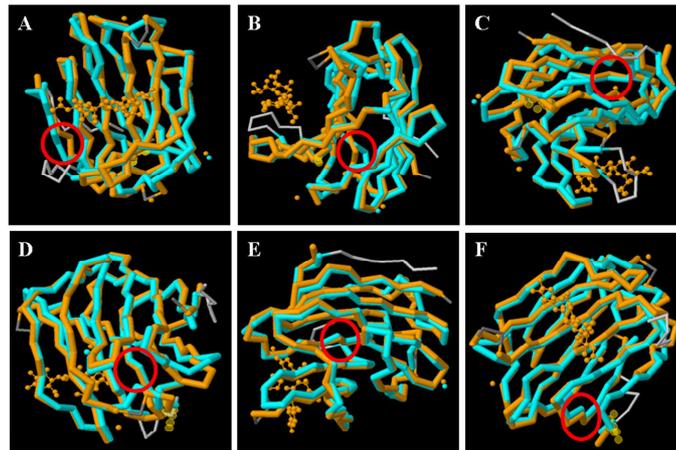
Das Bindungsverhalten von Galektin-8 an EGFP-K-Ras(G12V) in Abwesenheit von Galektin-3 konnte in diesem Experiment nicht untersucht werden, da keine Inhibierung der Galektin-3 Proteinexpression mittels der siRNAs Gal-3 si-7 oder Gal-3 si-8 um mindestens 50 % erreicht wurde.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse aus 2 Versuchen darauf hin, dass Galektin-3 in PANC-1 Zellen stärker mit EGFP-K-Ras(G12V) interagiert, wenn die Galektin-8 Proteinexpression siRNA-vermittelt inhibiert wurde. Galektin-8 konkurriert mit Galektin-3 um die Bindung an EGFP-K-Ras(G12V).

4.5. Struktureller Vergleich der N-terminalen und C-terminalen Galektin-8 CRD mit der Galektin-3 CRD

In Kapitel 4.4. wurde die Interaktion von K-Ras mit Galektin-8 und Galektin-3 gezeigt und das Bindungsverhalten der Proteine näher charakterisiert. Anhand dieser Ergebnisse stellt sich nun die Frage, wie und in welchen Bereichen K-Ras mit Galektin-8 interagiert. Wie bereits in Kapitel 1.2.4. beschrieben, konnte eine hydrophobe Tasche in Galektin-1 bzw. Galektin-3 identifiziert werden, die mit der Farnesylgruppe des H-Ras bzw. K-Ras interagiert (Rotblat *et al.*, 2004a; Ashery *et al.*, 2006). Galektin-8 besitzt eine N-terminale und eine C-terminale CRD. Beide CRDs sind strukturell ähnlich und aus 2 antiparallelen β -Faltblättern, bestehend aus 5 (F1-F5) und 6 (S1-S6) β -Strängen aufgebaut (Yoshida *et al.*, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob auch Galektin-8 eine mögliche Farnesylbindungstasche aufweist. Um zu überprüfen, ob die beiden Galektin-8 CRDs strukturell unterschiedliche oder gleiche hydrophobe Bindungstaschen für die Farnesylgruppe von K-Ras ausbilden können, wurden mittels des *RCSB PDB - jCE/JFATCAT Structure Alignment Server V2.6* kristallisierte Proteinstrukturen des Galektin-3 Proteins (PDB-ID: 4LBO, AS 113-250) mit der kompletten N-terminalen CRD (PDB-ID: 3VKN, AS 1-153) und C-terminalen CRD (PDB-ID: 3OJB; AS 1-139, entsprechen den AS 178-317 bzw. 220-359 im *full length* Protein) des Galektin-8 verglichen. Des Weiteren wurden die Aminosäuresequenzen der Galektin-3 und beider Galektin-8 CRDs mittels des gleichen Programms verglichen. Genauer analysiert wurden jedoch nur die Teilstrukturen der CRDs, die die 6 Aminosäuren umfassen, welche für die Interaktion zwischen der Farnesylgruppe des K-Ras und den Galektinen von Bedeutung sein könnten.



G Gal-3 CRD: 113 ELIVFYNLPLPGGVVPERMLITILGTVKPNANRIALDFQRG-----NDVAFHFNPRFNENNRRVIVCNTK
 Gal-8 N-term. CRD: 14 NFVIFVGTIPDQLDPGTLIVIRGHVPSDADRFPQVDLQNGSSMKPRADVAFHFNPRFK--RAGCIVCNTL

Gal-3 CRD : 177 LDNNWGREERQSVFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNHRVKKLNEISKLGISGDIDLTASAYTM
 Gal-8 N-term. CRD : 82 INEKWGREIITYDTPFKREKSFVEIVIMVLKDKFQVAVNGKHTLLYGHRIG-PEKIDTLGIYQKVNTHSIGFSF

Abb. 4.16: Struktur- und Sequenzvergleich der N-terminalen Galektin-8 CRD mit der Galektin-3 CRD. Mittels des *RCSB PDB - jCE/JFATCAT Structure Alignment Server V2.6* wurde die kristallisierte Sekundärstruktur der Galektin-3 CRD (PDB-ID: 4LBO) mit der kristallisierten Sekundärstruktur der N-terminalen Galektin-8 CRD (PDB-ID: 3VKN) verglichen. In den Teilabbildungen A-F repräsentieren die in rot markierten Bereiche die Überlagerungen der Sekundärstrukturen im Bereich der 6 für die Interaktion zwischen Galektin und einer Farnesylgruppe von Ras wichtigen Aminosäuren. Die Struktur der Galektin-8 N-terminalen CRD ist in blau, die der Galektin-3 CRD in orange dargestellt. Die Teilabbildung G zeigt den Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen der Galektin-3 CRD (AS 113-249) und der N-terminalen Galektin-8 CRD (AS 14-153). In rot markiert sind die 6 für die Interaktion potentiell verantwortlichen Aminosäuren an den Positionen 21 bzw. 120, 23 bzw. 122, 33 bzw. 132, 46 bzw. 145, 48 bzw. 147 und 146 bzw. 242 der Galektin-8 bzw. Galektin-3 Sequenz.

Aus den Sekundärstrukturvergleichen zwischen der N-terminalen Galektin-8 CRD und der Galektin-3 CRD in Abbildung 4.16 geht hervor, dass die rot markierten Sekundärstrukturen der beiden CRDs in den Teilabbildungen A und B unterschiedliche räumliche Teilstrukturen aufweisen. In Teilabbildung G ist der Vergleich der Aminosäuresequenzen dargestellt. Die zu den Teilabbildungen A und B korrespondierenden Aminosäuren an den Position 21 und 23 bzw. 120 und 122 der N-terminalen Galektin-8 CRD bzw. der Galektin-3 CRD repräsentieren 2 der 6 Aminosäuren, die für die Interaktion von Galektin mit dem Farnesylrest des K-Ras verantwortlich sein könnten (rot markiert).

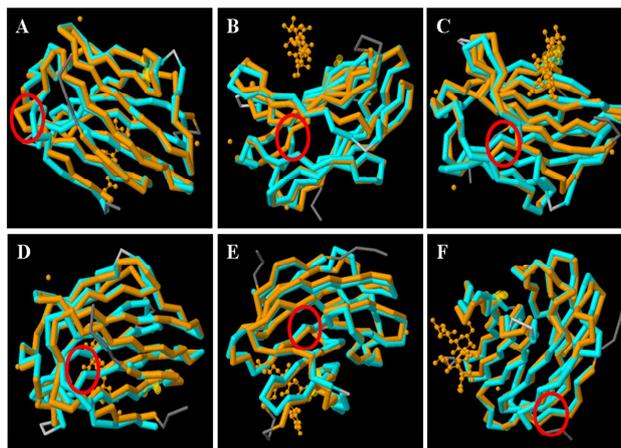
Die markierten Sekundärstrukturen der N-terminalen Galektin-8 CRD bzw. der Galektin-3 CRD in den Teilabbildungen C-F sind identisch. Diese Bereiche korrespondieren mit 4 der 6 Aminosäuren, die für die mögliche Interaktion von Galektin mit dem Farnesylrest des K-Ras verantwortlich sein könnten an den Positionen 33 bzw. 132, 46 bzw. 145, 48 bzw. 147 und 146 bzw. 242 der Galektin-8 N-terminalen CRD der Galektin-3 CRD bzw. (Teilabbildung G, rot markiert).

Die Ergebnisse der Struktur- und Sequenzvergleiche der N-terminalen Galektin-8 CRD mit der Galektin-3 CRD sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Tab. 4.7: Zusammenfassung der Struktur- und Sequenzvergleiche der N-terminalen Galektin-8 CRD mit der Galektin-3 CRD. Angegeben sind die 6 Aminosäuren, die für die Interaktion von Galektin mit dem Farnesylrest des K-Ras verantwortlich sein könnten sowie die Strukturelemente der N-terminalen Gal-8 CRD, in denen diese Aminosäuren liegen.

Teilabbildung 4.17	Gal-8 N-term. CRD		Gal-3 CRD	Vergleich der Sekundärstrukturen
		Strukturelement		
A	AS 21: Gly	S1	AS 120: Leu	unterschiedlich
B	AS 23: Ile	S1	AS 122: Leu	unterschiedlich
C	AS 33: Ile	F2	AS 132: Ile	gleich
D	AS 46: Phe	S3	AS 145: Ile	gleich
E	AS 48: Val	S3	AS 147: Leu	gleich
F	AS 146: Ile	F1	AS 242: Leu	gleich

In einer weiteren bioinformatischen Analyse wurde die C-terminalen Galektin-8 CRD mit der Galektin-3 CRD, wie bereits für die N-terminale Galektin-8 CRD beschrieben, verglichen.



G Gal-3 CRD: 116 VPYNLPLPGGVVPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRG--NDVAFHFNPRFNENNRNRVIVCNTKLDNNWGR
Gal-8 C-term. CRD: 9 MPFARLNTPMGPGRTVVVKGEVNAVAKSFNVDLLAGKSKDIALHLNPRLN---IKAFVRNSFLQESWGE

Gal-3 CRD: 184 EERQS-VFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLQYNHRVKKLNEISKLGISGDIDLTSAS
Gal-8 C-term. CRD: 76 EERNITSFPPSPGMYFEMIIYCDVREFKQAVNGVHSLEYKHRFKELSSIDTLEINGDIHLLLEVR

Abb. 4.17: Struktur- und Sequenzvergleich der C-terminalen Galektin-8 CRD mit der Galektin-3 CRD. Mittels des *RCSB PDB - jCE/JFATCAT Structure Alignment Server V2.6* wurde die kristallisierte Sekundärstruktur der Galektin-3 CRD (PDB-ID: 4LBO) mit der kristallisierten Sekundärstruktur der C-terminalen Galektin-8 CRD (PDB-ID: 3OJB) verglichen. In den Teilabbildungen A-F repräsentieren die in rot markierten Bereiche die Überlagerungen der Sekundärstrukturen im Bereich der 6 für die Interaktion zwischen Galektin und einer Farnesylgruppe von Ras wichtigen Aminosäuren. Die Struktur der Galektin-8 C-terminalen CRD ist in blau, die der Galektin-3 CRD in orange dargestellt. Die Teilabbildung G zeigt den Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen der Galektin-3 CRD (AS 113-247) und der C-terminalen Galektin-8 CRD (AS 1-139). In rot markiert sind die 6 für die Interaktion potentiell verantwortlichen Aminosäuren an den Positionen 13 bzw. 120, 15 bzw. 122, 25 bzw. 132, 38 bzw. 145, 40 bzw. 147 und 135 bzw. 243 der Galektin-8 bzw. der Galektin-3 Sequenz.

Aus den Strukturvergleichen zwischen der C-terminalen Galektin-8 CRD und der Galektin-3 CRD in Abbildung 4.17 geht hervor, dass 4 der 6 Aminosäuren (Positionen 25 bzw. 132, 38 bzw. 145, 40 bzw. 147 und 135 bzw. 243 der C-terminalen Galektin-8 CRD bzw. der Galektin-3 CRD in Teilabbildung G, rot markiert), die für die Interaktion von Galektin mit dem Farnesylrest des K-Ras verantwortlich sein könnten, in diesen Teilbereichen eine identische Sekundärstruktur aufweisen (Teilabbildungen C-F, rot markiert). Die markierten Teilstrukturen in Teilabbildungen A und B zeigen unterschiedliche Sekundärstrukturen. Diese Bereiche korrespondieren mit 2 der 6 für die K-Ras/Galektin-Interaktion kritischen Aminosäuren an den Positionen 13 bzw. 120 und 15 bzw. 122 der C-terminalen Galektin-8 CRD und der Galektin-3 CRD.

Die Ergebnisse der Struktur- und Sequenzvergleiche der C-terminalen Galektin-8 CRD mit der Galektin-3 CRD sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Tab. 4.8: Zusammenfassung der Struktur- und Sequenzvergleiche der C-terminalen Galektin-8 CRD mit der Galektin-3 CRD. Angegeben sind die 6 Aminosäuren, die für die Interaktion von Galektin mit dem Farnesylrest des K-Ras verantwortlich sein könnten sowie die Strukturelemente der C-terminalen Gal-8 CRD, in denen diese Aminosäuren liegen.

Teilabbildung 4.18	Gal-8 C-term. CRD		Gal-3 CRD	Vergleich der Sekundärstrukturen
		Strukturelement		
A	AS 13: Ala	F2	AS 120: Leu	unterschiedlich
B	AS 15: Leu	F2	AS 122: Leu	unterschiedlich
C	AS 25: Val		AS 132: Ile	gleich
D	AS 38: Phe	S4	AS 145: Ile	gleich
E	AS 40: Val		AS 147: Leu	gleich
F	AS 135: Leu	F1	AS 243: Leu	gleich

Der Vergleich der Sekundärstrukturen der N-terminalen als auch C-terminalen Galektin-8 CRD mit der Galektin-3 CRD im Bereich der 6 für die Interaktion kritischen Aminosäuren zeigte jeweils 4 Übereinstimmungen und 2 Unterschiede. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Galektin-8 CRD eine hydrophobe Bindungstasche formen könnte, in die die Farnesylgruppe des K-Ras binden könnte.

4.6. Einfluss von pharmakologischen Inhibitoren auf die Proteinexpression von Galektin-8, Galektin-3 und Galektin-1 in PANC-1 Zellen

2013 wurde publiziert, dass die Galektin-7 Proteinexpression in ST88-14 Zellen, einer Zelllinie, die aus einem malignen, peripheren Nervenscheidentumors isoliert wurde, durch die Inhibierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) induziert wird. Die Zellen wurden für 48 h mit pharmakologischen Inhibitoren gegen die bekanntesten Ras Effektoren behandelt. Dabei wurden U0126 (MEK Inhibitor), LY94002 (PI3K Inhibitor), SB203580 (p38 Inhibitor) und SP600125 (JNK Inhibitor) eingesetzt. Lediglich die Inhibierung der JNK Signalkaskade induzierte einen Anstieg der Galektin-7 mRNA und Proteinexpression (Barkan *et al.*, 2013).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden in der vorliegenden Arbeit PANC-1 Zellen für 48 h mit den Inhibitoren LY294002 (20 μ M), FTS (75 μ M), Pifithrin- α (25 μ M), SP600125 (25 μ M), Rapamyzin (100 nM), PD98059 (25 μ M), SB203580 (4 μ M) und U0126 (10 μ M) behandelt. Als Kontrolle dienten die Lösungsmittel DMSO und Methanol. Die Detektion von Galektin-8, -3 und -1 und der sowohl phosphorylierten als auch nicht-phosphorylierten Kinasen erfolgte im Immunoblotverfahren.

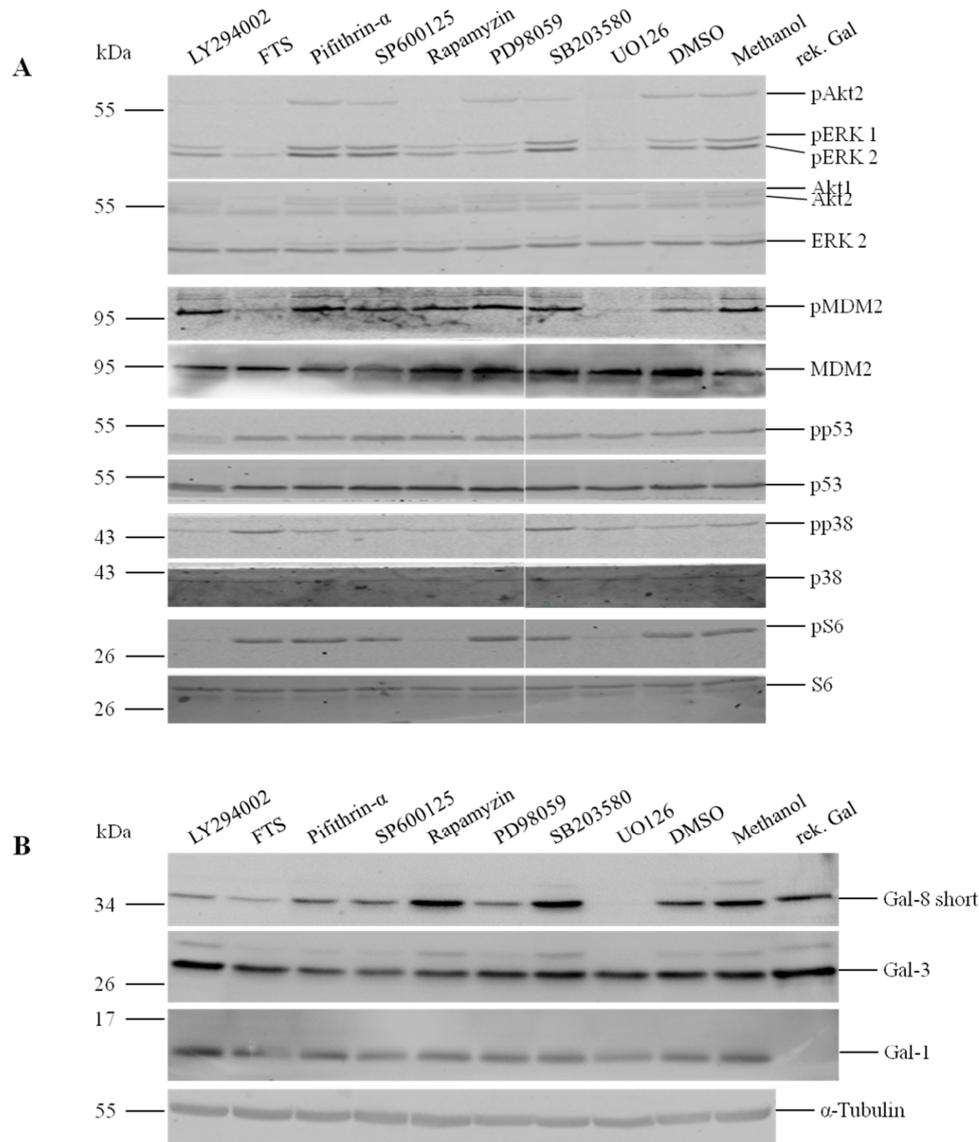


Abb. 4.18: Einfluss diverser pharmakologischer Inhibitoren auf die Proteinexpression von Galektin-8, Galektin-3 und Galektin-1 in PANC-1 Zellen. PANC-1 Zellen in 6-Lochzellkulturplatten (3×10^5 Zellen/Loch) wurden 24 h nach der Aussaat bei einer Konfluenz von 80 % mit folgenden Inhibitoren für 48 h inkubiert: LY294002 (20 μ M), FTS (75 μ M), Pifithrin- α (25 μ M), SP600125 (25 μ M), Rapamyzin (100 nM), PD98059 (25 μ M), SB203580 (4 μ M) und UO126 (10 μ M). Als Kontrolle dienten die Lösungsmittel DMSO und Methanol. Die Zelllyse erfolgte in 75 μ l RIPA-Puffer. Es wurden 50 μ g Gesamtlysat in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. A) Die Detektion der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Kinasen erfolgte durch die folgenden Antikörper: Phospho-Akt (S473), Akt (pan) (40D4), Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP[®], pan ERK, Phospho-MDM2 (Ser166), MDM2 (SMP14), Phospho-p53 (Ser15), p53 (DO1), Phospho-p38 MAPK (Thr180/ Tyr182) (3D7), p38 α , Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) und S6 Ribosomal Protein (54D2) sowie mittels ECL Detektion oder Fluoreszenzdetektion. B) Die Detektion von Galektin-8, -3 und -1 erfolgte durch den monoklonalen anti-Galektin-8- und die polyklonalen anti-Galektin-3- und anti-Galektin-1-Antikörper sowie mittels ECL Detektion. Um eine gleichmäßige Proteinbeladung nachzuweisen, wurde α -Tubulin mit Hilfe des monoklonale anti- α -Tubulin-Antikörper detektiert. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Die exemplarischen Immunoblots aus 3 unabhängigen Versuchen in Abbildung 4.18 A zeigen die Überprüfung der Wirksamkeit der Inhibitoren.

PANC-1 Zellen exprimieren die Isoform Akt2 deutlich stärker als Akt1. Mit den hier verwendeten Antikörpern konnten beide Isoformen, Akt1 (ca. 60 kDa) und Akt2 (ca. 57 kDa), nachgewiesen werden, jedoch wurde nur die Phosphorylierung von Akt2 detektiert. Sowohl LY294002 als auch Rapamyzin inhibierten die Phosphorylierung von Akt2 durch PI3K und den *downstream* Effektor S6. Rapamyzin verhindert die mTOR Komplex1-vermittelte Aktivierung der p70(S6Kinase) und die darauf folgende S6-Phosphorylierung. Bei längerer Inkubation der Zellen mit Rapamyzin inhibiert dieses über den mTOR-Komplex2 die Aktivierung von Akt, welches nicht mehr in der Lage ist den mTOR-Komplex1 zu aktivieren und somit die gleiche Wirkung wie Rapamyzin ausübt (Ye *et al.*, 2013). Die Inhibierung der Phosphorylierung von Akt2 und S6 konnte in allen durchgeführten Versuchen detektiert werden.

Der verwendete Phospho-spezifische anti-ERK-Antikörper erkennt Phosphorylierungen an Thr202 und Tyr204 der Isoformen ERK1 (44 kDa) und ERK2 (42 kDa). Mit dem anti-ERK-Antikörper konnte ERK2 detektiert werden. Eine deutlich inhibierte Phosphorylierung von ERK1/2 wurde durch U0126, einem MEK1 und MEK2 Inhibitor und PD98059 nachgewiesen. Da U0126 ebenso den mTOR-p70(S6Kinase) Signaltransduktionsweg blockiert, wurde eine deutliche Inhibierung S6 Phosphorylierung detektiert (Populo *et al.*, 2013). PD98059 bindet an die inaktive Form von MEK1 und verhindert dessen Aktivierung durch c-Raf (Rosen *et al.*, 1994). Die Wirksamkeit von U0126 und PD98059 konnte in 3 Experimenten gezeigt werden.

Bei FTS (S-trans, trans-Farnesylthiosalizylsäure) handelt es sich um einen Ras-Antagonisten, welcher die Farnesylgruppe des Ras imitiert, an die Ankerproteine in der Plasmamembran bindet und somit die Interaktion der Ankerproteine mit Ras verhindert. Das ungebundene Ras wird im Zytoplasma abgebaut (Weisz *et al.*, 1999; Goldberg *et al.*, 2009). Die Inkubation der PANC-1 Zellen mit FTS resultiert in einer inhibierten Phosphorylierung von Akt2, ERK1/2 und MDM2 sowie in einer erhöhten Phosphorylierung von p38. Die Inhibitionen der Phosphorylierungen der Kinasen Akt2, ERK1/2 und MDM2 konnten in den weiteren Versuchen nicht bestätigt werden. Hier kam es zu keinen Änderungen der Phosphorylierungslevel. Die gesteigerte Phosphorylierung von p38 wurde in 2 der 3 Experimente nachgewiesen.

Pifithrin- α , ein p53 Phosphorylierungsinhibitor, zeigte weder in Abbildung 18 A noch in den beiden weiteren Experimenten eine Veränderungen in den detektierten Kinase-Phosphorylierungen.

Die Aktivität von SP600125, einem Inhibitor der Phosphorylierung von JNK, konnte in keinem der durchgeführten Versuche untersucht werden, da weder phosphoryliertes noch nicht-phosphoryliertes JNK nachgewiesen werden konnte.

Bei SB203580 handelt es sich um einen p38 Inhibitor. Dieser inhibiert die katalytische Aktivität von p38 indem er an dessen ATP-Bindungstasche bindet. Hierdurch wird nicht die Phosphorylierung und somit Aktivierung von p38 durch *upstream* Kinasen inhibiert (Kumar *et al.*, 1999). In allen Versuchen konnte eine erhöhte Phosphorylierung von p38 detektiert werden.

Die Abbildung 4.18 B repräsentiert die Detektion der Galektin-8, Galektin-3 und Galektin-1 Expressionen. Für die Expression von Galektin-3 und Galektin-1 konnten in 3 Versuchen keine Änderungen der Expressionsmengen nach der Inkubation mit den verschiedenen Inhibitoren beobachtet werden.

Die Zugabe von LY294002 bewirkte im abgebildeten Immunoblot eine deutliche Inhibierung der Galektin-8 Proteinmenge. In einem weiteren Versuch konnte nur ein leichter Rückgang der Galektin-8 Proteinmenge nachgewiesen werden, während in einem dritten Versuch eine Erhöhung der Proteinmenge detektiert wurde.

Die Behandlung der Zellen mit FTS führte in Abbildung 4.18 B und in einem weiteren Versuch zu einem deutlich reduzierten Galektin-8 short Proteingehalt. In Versuch 3 wurde eine erhöhte Proteinmenge detektiert.

Die detektierte Galektin-8 Expression nach der Inkubation der Zellen mit Pifithrin- α und SP600125 war leicht reduziert. Dies konnte in einem zweiten Versuch bestätigt werden. Ein dritter Versuch zeigte hingegen erhöhte Galektin-8 Proteinmengen.

Rapamyzin erhöhte die Expression von Galektin-8 sowohl im dargestellten Immunoblot in Abbildung 4.18 B als auch in 2 weiteren Versuchen.

Die Behandlung der Zellen mit PD98059 resultierte in 2 Versuchen in einer Inhibierung und in Versuch 3 in einer leichten Erhöhung der Proteinmenge von Galektin-8 short.

Die mit SB203580 behandelten Zellen zeigten in Abbildung 4.18 B und einem weiteren Experiment eine erhöhte Menge an Galektin-8. In einem dritten Versuch führte die Inkubation des Inhibitors zu einer leichten Reduzierung der Galektin-8 Expression.

Die Inkubation der Zellen mit U0126 bewirkte in allen 3 Experimenten eine starke Inhibierung der Galektin-8 Expression.

Die Galektin-8 Proteinmengen innerhalb der 3 Einzelversuche waren teilweise heterogen. Ein Grund dafür könnten Unterschiede in den Effizienzen der einzelnen Inhibitoren in den Einzelversuchen sein.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die Expression von Galektin-8 negativ durch den MEK/ERK und positiv durch den Akt/mTOR Signaltransduktionsweg reguliert wird.

4.7. Einfluss von Galektin-8 und Galektin-3 auf die Aktivität von Akt1/2 und ERK1/2 in PANC-1 Zellen

Sowohl die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade als auch die PI3K/Akt-Signalkaskade gehören zu den am häufigsten untersuchten Ras-Effektor-Signalwegen (Downward, 1998; Khosravi-Far *et al.*, 1998; Brazil und Hemmings, 2001). Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Galektin-8 und Galektin-3 auf diese beiden Ras-abhängigen Signaltransduktionswege in PANC-1 Zellen zu untersuchen.

Hierzu wurden die Effekte einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression auf die Phosphorylierungen von Akt2 und ERK1/2 im Immunoblotverfahren analysiert. Um die Auswirkungen einer erhöhten Galektin-8 Proteinexpression auf den Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionsweg zu untersuchen, wurden ECFP-Galektin-8 long bzw. short ektop exprimiert und die Phosphorylierung von ERK analysiert.

4.7.1. Einfluss einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression auf die Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2 in PANC-1 Zellen

Um den Einfluss einer verminderten Galektin-8 und Galektin-3 Proteinexpression auf die Raf/MEK/ERK- und PI3K/Akt-Signaltransduktionswege zu untersuchen, wurde in PANC-1 Zellen die Expression der Galektine mittels der spezifischen siRNAs Gal-8 si-5 und Gal-3 si-7 inhibiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Die Expression des endogenen Galektin-8 und Galektin-3, die Phosphorylierung sowie die Gesamtproteinmenge von Akt1/2 und ERK1/2 wurden im Immunoblotverfahren nachgewiesen.

Die Bandenintensitäten der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Akt1/2 bzw. ERK1/2 Proteine wurden im Anschluss densitometrisch mit Hilfe der ImageQuant 5.0 Software ermittelt. Es wurde das Verhältnis der phosphorylierten zu den nicht-phosphorylierten Proteinen ermittelt. Die Kontrolle diente als Referenz und wurde gleich 1 gesetzt.

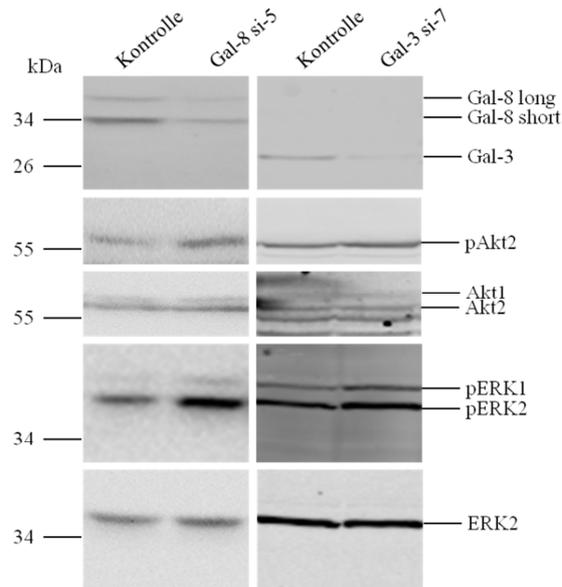


Abb. 4.19: Immunoblotanalysen des Einflusses einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression auf die Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2 in PANC-1 Zellen. PANC-1 Zellen in 6-Lochzellkulturplatten (4×10^5 Zellen/Loch) wurden 24 h nach der Aussaat bei einer Konfluenz von 90 % mit 50 nM siRNA Gal-8 si-5, 100 nM siRNA Gal-3 si-7 oder 50 nM Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellyse erfolgte 48 h nach Transfektion in 75 μ l RIPA-Puffer. Es wurden 50 μ g Gesamtlysate in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis der Galektine erfolgte mittels des monoklonalen anti-Galektin-8- und des polyklonalen anti-Galektin-3-Antikörpers. Der Nachweis der Phosphorylierungen der Akt2 und ERK1/2 Proteine erfolgte durch den polyklonalen anti-P-Akt(Ser473)- und den monoklonalen anti-P-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP[®]-Antikörper. Der Nachweis des gesamten Akt2 und ERK2 Proteingehalts erfolgte durch den monoklonalen anti-Akt (pan) (40D4)- und den monoklonalen anti-panERK-Antikörper sowie mittels ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Die repräsentativen Immunoblots in Reihe 1 der Abbildung 4.19 dokumentieren die Inhibierung der Expression von Galektin-8 bzw. Galektin-3 durch die siRNAs Gal-8 si-5 bzw. Gal-3 si-7. Anhand densitometrischer Auswertungen konnte im Vergleich zur Kontrolle eine um 70 % reduzierte Galektin-8 und eine um 78 % reduzierte Galektin-3 Proteinexpression ermittelt werden. Mit den hier verwendeten Antikörpern konnte die Menge der Isoformen Akt1 und Akt2 (Reihe 3) sowie die Phosphorylierung von Akt2 (Reihe 2) nachgewiesen werden. In den Gesamtlysaten der Zellen die eine Gal-8 si-5-vermittelte Inhibierung der Galektin-8 Expression aufweisen, konnte im Vergleich zur Kontrolle eine 1,9x Phosphorylierung von Akt2 detektiert werden. Eine Gal-3 si-7-vermittelte Inhibierung der Galektin-3 Proteinexpression führte, verglichen mit der Kontrolle zu einer 1,1x erhöhten Phosphorylierung von Akt2.

Der verwendete Phospho-spezifische anti-ERK1/2-Antikörper erkennt Phosphorylierungen an Thr202 und Tyr204 der Isoformen ERK1 und ERK2 (Reihe 4). Mit dem anti-ERK-Antikörper (Reihe 5) konnte die Proteinmenge von ERK2 detektiert werden. Die zusammengefassten Bandenintensitäten des phosphorylierten ERK1 und ERK2 wurden zur Bandenintensität des nicht-phosphorylierten ERK2 ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse der quantitativen

Analyse zeigen im Vergleich zu den Kontrollen eine 2,4x bzw. 1,4x erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 in PANC-1 Zellen mit siRNA-inhibierter Galektin-8 bzw. Galektin-3 Proteinexpression.

Die quantitative Auswertung des Einflusses einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression auf die Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2 aus 3-6 unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 4.20 dargestellt. Es wurde das Verhältnis der phosphorylierten Akt2 bzw. ERK1/2 zu den nicht-phosphorylierten Akt1/2 bzw. ERK2 Proteinen mittels der ImageQuant 5.0 Software bestimmt. Die Kontrolle wurde als Referenzwert gleich 1 gesetzt.

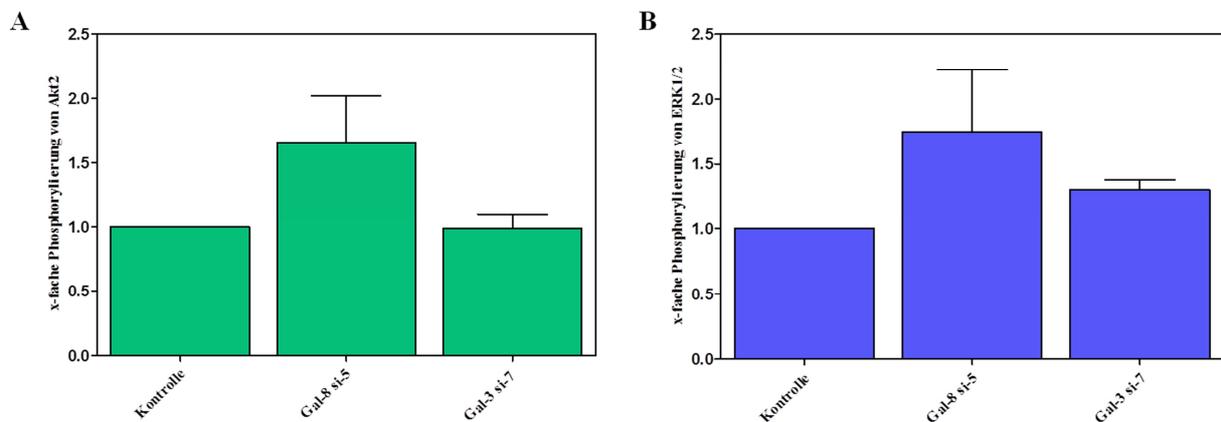


Abb. 4.20: Quantitative Analyse des Einflusses einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression auf die Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2 in PANC-1 Zellen. A) Die Bandenintensität der Akt2 Phosphorylierung wurde zur Bandenintensität des Akt1/2 Proteingehalts ins Verhältnis gesetzt. Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse der x-fachen Phosphorylierung von Akt2 sind als Mittelwert \pm S.D. aus 6 (Gal-8 si-5) bzw. 3 (Gal-3 si-7) Versuchen angegeben. B) Die Bandenintensitäten der ERK1/2 Phosphorylierungen wurden zur Bandenintensität des ERK2 Proteingehalts ins Verhältnis gesetzt. Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse der x-fachen Phosphorylierung von ERK1/2 sind als Mittelwert \pm S.D. aus 6 (Gal-8 si-5) bzw. 5 (Gal-3 si-7) Versuchen angegeben.

Abbildung 4.20 A zeigt, dass eine Gal-8 si-5-vermittelte Inhibierung der Galektin-8 Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle in eine 1,7x (\pm 0,4 S.D.; n=6) erhöhte Phosphorylierung von Akt2 resultiert. Die Gal-3 si-7-vermittelte Inhibierung der Galektin-3 Proteinexpression hingegen hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt2 (1x \pm 0,1 S.D.; n=3). Aus Abbildung 4.20 B ist ersichtlich, dass eine Gal-8 si-5-vermittelte Inhibierung der Galektin-8 Proteinexpression verglichen mit der Kontrolle zu einer 1,7x (\pm 0,5 S.D.; n=6) erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 führt. Die siRNA-inhibierte Expression von Galektin-3 durch Gal-3 si-7 zeigt im Vergleich zur Kontrolle einen 1,3x (\pm 0,1 S.D.; n=5) Anstieg der ERK1/2 Phosphorylierung.

Die siRNA-vermittelte Inhibierung der Galektin-8 Expression führt zu einer Erhöhung der Akt2 und ERK1/2 Phosphorylierung. Die inhibierte Expression von Galektin-3, induziert

durch siRNA, hat eine steigernde Wirkung auf die Phosphorylierung von ERK1/2, jedoch keine Auswirkung auf die Akt2 Phosphorylierung.

4.7.2. Einfluss einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression auf die K-Ras(G12V)-vermittelte Akt Phosphorylierung in PANC-1 Zellen

Es ist bekannt, dass Akt und ERK wichtige Effektorproteine von K-Ras sind (Downward, 1998; Khosravi-Far *et al.*, 1998; Brazil und Hemmings, 2001). Durch die Analyse der ERK1/2 Aktivität mittels ERK1/2-*in vitro*-Aktivitätsassays wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Giehl gezeigt, dass die stabile Expression von EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1 Zellen zu keiner konstitutiven Aktivierung von ERK1/2 führt (Dreissigacker *et al.*, 2005). Mit folgendem experimentellen Ansatz sollte der Frage nachgegangen werden, ob Galektin-8 und Galektin-3 einen Einfluss auf die K-Ras(G12V)-induzierte PI3K/Akt-Signaltransduktion ausüben. PANC-1 Zellen, welche stabil EGFP-K-Ras(G12V) exprimieren wurden mit Gal-8 si-5, Gal-3 si-7 oder Kontroll-siRNA (Kontrolle) transfiziert.

Nach der Zellyse wurde die Galektin-8 und Galektin-3 Expression als auch die Phosphorylierung und Proteinmenge von Akt2 im Immunoblotverfahren nachgewiesen. Zur quantitativen Analyse wurden die Bandenintensitäten der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Akt2 Proteine mittels der ImageQuant 5.0 Software densitometrisch ermittelt. Der Anteil der phosphorylierten zu den nicht-phosphorylierten Proteinen wurde errechnet und mit der Kontrolle, die als Referenz diente und gleich 1 gesetzt wurde, verglichen.

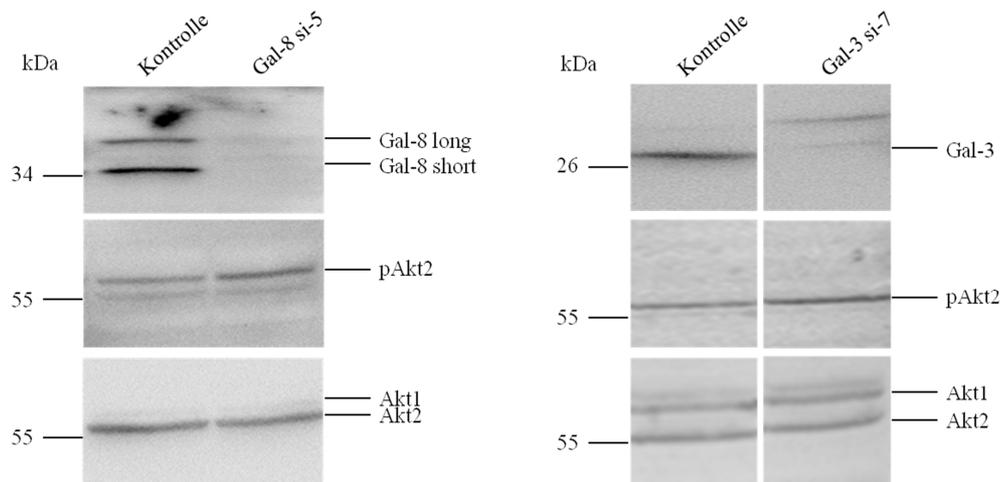


Abb. 4.21 Einfluss einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression auf die Phosphorylierung von Akt2 in EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen. PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Zellen in 6-Lochzellkulturplatten (4×10^5 Zellen/Loch) wurden 24 h nach der Aussaat bei einer Konfluenz von 90 % mit 50 nM siRNA Gal-8 si-5, 100 nM siRNA Gal-3 si-7 oder 50 nM Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellyse erfolgte 48 h nach Transfektion in 75 μ l RIPA-Puffer. Es wurden 50 μ g Gesamtlisat in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis der Galektine erfolgte mittels des monoklonalen anti-Galektin-8- und des polyklonalen anti-Galektin-3-Antikörpers. Der Nachweis der Phosphorylierung der Akt Proteine erfolgte durch den polyklonalen anti-P-Akt(Ser473)-Antikörper. Der Nachweis des gesamten Akt Proteingehalts erfolgte durch monoklonalen anti-Akt (pan) (40D4)-Antikörper sowie mittels ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Die exemplarischen Immunoblots der in Abbildung 4.21 (Reihe 1) zeigen eine Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression um jeweils ca. 90 %, vermittelt durch die siRNAs Gal-8 si-5 bzw. Gal-3 si-7. Reihen 2 und 3 repräsentieren die Detektion des phosphorylierten Akt2 bzw. des nicht-phosphorylierten Akt1 und Akt2. Der Anteil der phosphorylierten Akt2 Proteine am Anteil der Akt2 Gesamtproteinmenge wurde mit Hilfe der ImageQuant 5.0 Software densitometrisch ermittelt und mit der Kontrolle verglichen. Daraus ergab sich eine 2,3x gesteigerte Phosphorylierung von Akt2 nach der Inhibierung der Galektin-8 Expression. Eine verminderte Galektin-3 Expression erhöht die Akt2 Phosphorylierung 1,4x.

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung aus 3 bzw. 2 Experimenten sind in Abbildung 4.22 zusammengefasst.

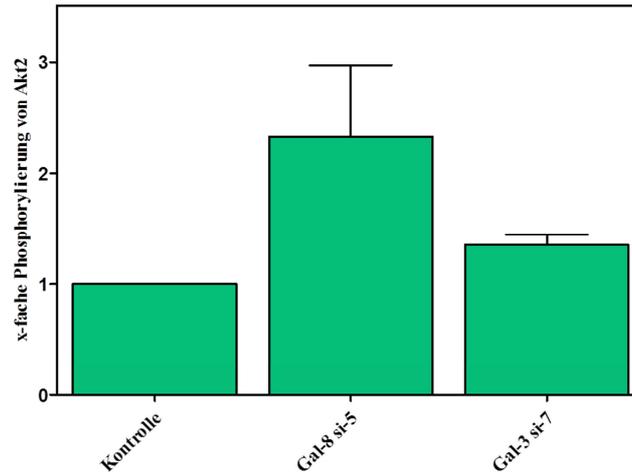


Abb. 4.22: Quantitative Analyse des Einflusses einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 und Galektin-3 Expression auf die Phosphorylierung von Akt2 in EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen. Die Bandenintensität der Akt2 Phosphorylierung wurde zur Bandenintensität des Akt1/2 Proteingehalts ins Verhältnis gesetzt. Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse der x-fachen Phosphorylierung von Akt2 sind als Mittelwert \pm S.D. aus 3 (Gal-8 si-5) bzw. 2 (Gal-3 si-7) Versuchen angegeben.

Aus Abbildung 4.22 geht hervor, dass in PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Zellen eine Gal-8 si-5-vermittelte Inhibierung der Galektin-8 Proteinexpression zu einer 2,3x (\pm 0,7 S.D., n=3) gesteigerten Phosphorylierung von Akt2 führt. Dies bedeutet, dass K-Ras(G12V) die durch die reduzierte Galektin-8 Proteinexpression hervorgerufene gesteigerte Phosphorylierung von Akt2 (1,7fach \pm 0,4 S.D., s. Abbildung 4.20) weiter erhöht. Die Inhibierung der Galektin-3 Proteinexpression durch Gal-3 si-7 resultiert in einer 1,4x (\pm 0,1 S.D., n=2) erhöhten Phosphorylierung von Akt2. Wie unter 4.8.1. in Abbildung 4.20 beschrieben, nahm die Galektin-3 Inhibierung in PANC-1 Zellen, welche nicht stabil mit EGFP-K-Ras(G12V) transfiziert waren, keinen Einfluss auf die Akt2 Phosphorylierung.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die stabile Expression von EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1 Zellen den Einfluss von Galektin-8 auf die Akt2 Phosphorylierung deutlich verstärkt.

4.7.3. Einfluss einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 Expression auf die Phosphorylierung von Akt und in A549 und A427 Lungenkarzinomzellen

Um den Einfluss einer inhibierten Galektin-8 Expression auf die Phosphorylierung von Akt und ERK in Lungenkarzinomzellen zu untersuchen, wurden die Zelllinien A549 und A427 ausgewählt.

Die Zellen der Linie A549 stammen aus einem Adenom und weisen eine homozygote K-ras Mutation auf, bei der an Position 12 Glyzin durch Cystein ersetzt wurde (Beau-Feller, 2009).

A549 Zellen exprimieren endogenen Galektin-8 und Galektin-1, jedoch kein Galektin-3. Die humane Adenokarzinom Zelllinie A427 besitzt eine heterozygote *K-ras* Mutation, bei der an Position 12 Glyzin durch Asparaginsäure ersetzt wurde (Mitchell *et al.*, 1995). A427 Zellen exprimieren endogenen Galektin-8 und Galektin-1, jedoch kein Galektin-3. Die Mutationen beider verwendeten Zelllinien wurden in der Arbeitsgruppe durch Dr. Sven Beilke bestätigt (Laborbuch Dr. Sven Beilke, 2011).

Beide Zelllinien wurden mit einer Kontroll-siRNA oder Gal-8 si-5 transfiziert. Die Expression des endogenen Galektin-8 als auch die Phosphorylierung und Gesamtproteinmenge von Akt und ERK wurden im Immunoblotverfahren nachgewiesen. Zur quantitativen Auswertung wurden mittels des ImageQuant 5.0 Programms die Bandenintensitäten der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Akt und ERK Proteine densitometrisch ermittelt. Es wurde das Verhältnis der phosphorylierten zu den nicht-phosphorylierten Proteinen gebildet. Die Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, dienten als Referenz und wurden gleich 1 gesetzt.

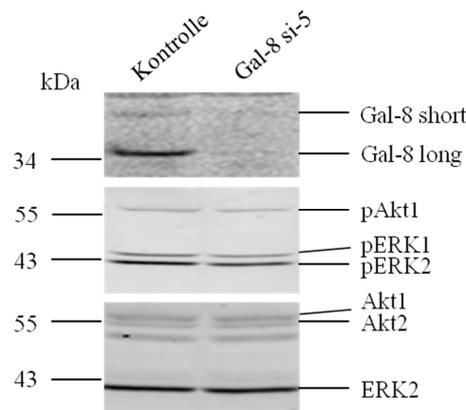


Abb. 4.23: Einfluss einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 Expression auf die Phosphorylierung von Akt1 und ERK1/2 in A549 Lungenkarzinomzellen. A549 Zellen in 6-Lochzellkulturplatten (4×10^5 Zellen/Loch) wurden 24 h nach der Aussaat bei einer Konfluenz von 90 % mit 50 nM siRNA Gal-8 si-5 oder 50 nM Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellyse erfolgte 48 h nach Transfektion in 75 μ l RIPA-Puffer. Es wurden 50 μ g Gesamtlisat in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis von Galektin-8 erfolgte mittels des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers. Der Nachweis der Phosphorylierung der Akt1, ERK1 und ERK2 Proteine erfolgte durch die monoklonalen anti-P-Akt(Ser473) (D9E) XP[®]- und anti-P-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP[®]-Antikörper. Der Nachweis des nicht-phosphorylierten Akt1 und Akt2 sowie ERK2 Proteingehalts erfolgte durch die monoklonalen anti-Akt (pan) (40D4)- und anti-panERK-Antikörper sowie mittels ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Der exemplarische Immunoblot in Abbildung 4.23 weist eine fast 100 %ige Inhibierung der Galektin-8 Proteinexpression durch die siRNA Gal-8 si-5 auf (Reihe1). Der anti-Phospho-Akt(Ser473) (D9E) XP[®]-Antikörper erkennt spezifisch die Phosphorylierung von Akt an Ser473. Da die in dieser Arbeit verwendeten Lungenkarzinom-Zelllinien A549 und A427, im Gegensatz zu PANC-1 Zellen, mehr Akt1 als Akt2 exprimieren, wurde die Phosphorylierung

von Akt1 nachgewiesen werden (Reihe 2 oben). Mittels des anti-Akt (pan) (40D4)-Antikörpers wurden die Isoformen Akt1 (ca. 60 kDa) und Akt2 (ca. 57 kDa) nachgewiesen (Reihe 3 oben). Der anti-P-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP[®]-Antikörper bindet spezifisch an phosphoryliertes Thr202 und Tyr 204 der Isoformen ERK1 und ERK2 (Reihe 2 unten), während der anti-panERK-Antikörper den Gesamtproteingehalt der Isoform ERK2 erkennt (Reihe 3 unten).

In den quantitativen Auswertungen wurde das Verhältnis der phosphorylierten Akt1 zu den nicht-phosphorylierten und gemeinsam erfassten Akt1/2 Proteinen ermittelt. Ebenso wurde das Verhältnis der gemeinsam erfassten phosphorylierten ERK1/2 an den nicht-phosphorylierten ERK2 Proteinen bestimmt. Die Inhibierung der Galektin-8 Expression durch Gal-8 si-5 führt im Vergleich zur Kontrolle zu einer 0,9x Phosphorylierung von Akt1 und ERK1/2.

Die quantitativen Analysen aus 3 unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 4.24 dargestellt.

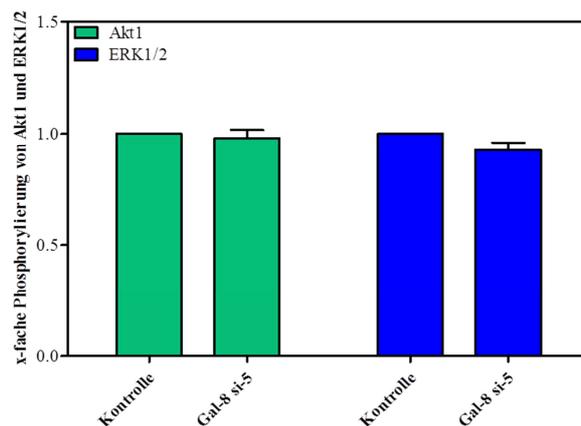


Abb. 4.24: Quantitative Analyse des Einflusses einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 Expression auf die Phosphorylierung von Akt1 und ERK1/2 in A549 Lungenkarzinomzellen. Die Bandenintensitäten der Akt1 bzw. ERK1/2 Phosphorylierungen wurden zu den Bandenintensitäten des Akt1/2 bzw. ERK2 Proteingehalts ins Verhältnis gesetzt. Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse der x-fachen Phosphorylierung von Akt1 und ER1/2 sind als Mittelwert \pm S.D. aus 3 Versuchen angegeben.

Das Balkendiagramm in Abbildung 4.24 fasst die Daten aus 3 Versuchen zusammen. Eine um mindestens 70 % inhibierte Galektin-8 Proteinexpression, vermittelt durch die siRNA Gal-8 si-5, führt zu keiner Änderung der Phosphorylierung von Akt1 ($1x \pm 0,1$ S.D.) und ERK1/2 ($0,9x \pm 0,1$ S.D.).

Die Experimente wurden, wie für A549 Zellen beschrieben, in A427 Zellen wiederholt.

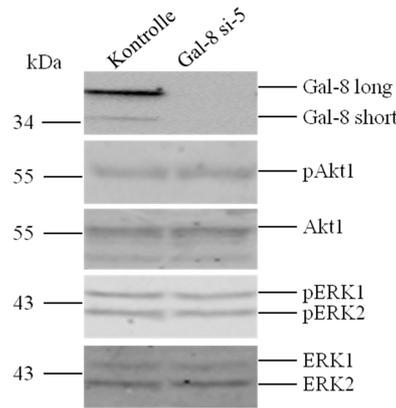


Abb. 4.25: Einfluss einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 Expression auf die Phosphorylierung von Akt1 und ERK1/2 in A427 Lungenkarzinomzellen. A427 Zellen in 6-Lochzellkulturplatten (4×10^5 Zellen/Loch) wurden 24 h nach der Aussaat bei einer Konfluenz von 90 % mit 50 nM siRNA Gal-8 si-5 oder 50 nM Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellyse erfolgte 48 h nach Transfektion in 75 μ l RIPA-Puffer. Es wurden 50 μ g Gesamtlisat in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis von Galektin-8 erfolgte mittels des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers. Der Nachweis der Phosphorylierung der Akt1, ERK1 und ERK2 Proteine erfolgte durch die monoklonalen anti-P-Akt(Ser473) (D9E) XP[®]- und anti-P-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP[®]-Antikörper. Der Nachweis des gesamten Akt1, ERK1 und ERK2 Proteingehalts erfolgte durch die monoklonalen anti-Akt (pan) (40D4)- und anti-panERK-Antikörper sowie mittels ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Die aus 3 Experimenten ausgewählten exemplarischen Immunoblots in Abbildung 4.25 zeigen einen 100 %igen, Gal-8 si-5-vermittelten *knock down* der Galektin-8 Expression (Reihe 1). In den Reihen 2 und 3 wurde sowohl phosphoryliertes als auch nicht-phosphoryliertes Akt1 detektiert. Reihen 4 und 5 zeigen den Nachweis der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten ERK1 und ERK2 Proteine.

In quantitativen Analysen wurden das Verhältnis der densitometrisch ermittelten Bandenintensitäten der phosphorylierten zu den nicht-phosphorylierten Bandenintensitäten der Akt1 und ERK1/2 Proteine ermittelt. Die Bandenintensitäten von ERK1 und ERK2 bzw. pERK1 und pERK2 wurden gemeinsam erfasst. Die Kontrolle (Zellen, transfiziert mit Kontroll-siRNA) diente als Referenz und wurde gleich 1 gesetzt. Verglichen damit ergab sich eine 1,1x bzw. 1x erhöhte Phosphorylierung von Akt1 bzw. ERK1/2 in Zellen mit siRNA-vermittelter Inhibierung der Galektin-8 Expression.

Die quantitativen Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen sind in Abbildung 4.26 zusammengefasst.

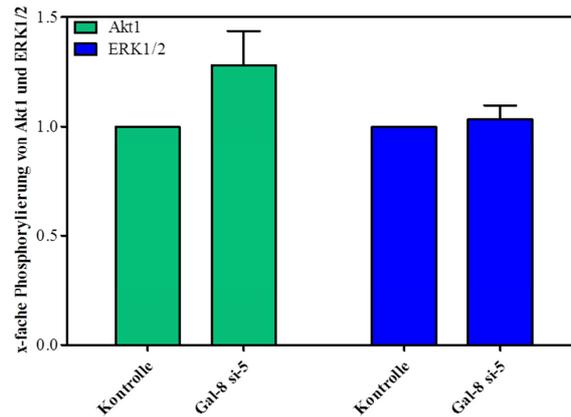


Abb. 4.26: Quantitative Analyse des Einflusses einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 Expression auf die Phosphorylierung von Akt1 und ERK1/2 in A427 Lungenkarzinomzellen. Die Bandenintensitäten der Akt1 und ERK1/2 Phosphorylierungen wurden zu den Bandenintensitäten der Akt1 und ERK1/2 Proteine ins Verhältnis gesetzt. Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse der x-fachen Phosphorylierung von Akt1 und ERK1/2 sind als Mittelwert \pm S.D. aus 3 Versuchen angegeben.

Wie das Balkendiagramm in Abbildung 4.26 zeigt, führt eine Gal-8 si-5-induzierte Inhibierung der Galektin-8 Proteinexpression in 3 Versuchen zu einer 1,3x gesteigerten Phosphorylierung von Akt1. Da die Standardabweichung bei $\pm 0,3$ liegt, liegt keine veränderte Akt1 Phosphorylierung vor. Bezüglich der Phosphorylierung von ERK1/2 ist ebenfalls keine Änderung der Phosphorylierung detektierbar ($1x \pm 0,1$, $n=3$).

Die Galektin-8 Proteinexpression hat somit keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt1 oder ERK1/2 in A427 Zellen.

4.7.4. Einfluss einer ektopten Galektin-8 Expression auf die K-Ras(G12V)-vermittelte Phosphorylierung von ERK1/2 in PANC-1 Zellen

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden PANC-1 Zellen transient mit ECFP-Galektin-8 short und long transfiziert, um den Einfluss der ektopten Expression auf die Phosphorylierung von ERK1/2 zu untersuchen. Die Transfektionseffizienzen von weniger als 30 % reichten jedoch nicht aus, um verlässliche Aussagen bezüglich einer Auswirkung auf die Phosphorylierung von ERK1/2 treffen zu können. Aufgrund dessen wurde in den nachfolgenden Experimenten der Einfluss einer transienten ECFP-Galektin-8 Expression auf die K-Ras(G12V)-induzierte ektope HA-ERK2 Aktivierung untersucht, da publiziert ist, dass transient exprimiertes EGFP-K-Ras(G12V) die Aktivität von HA-ERK2 erhöht (Dreissigacker *et al.*, 2005).

PANC-1 Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit mit pEGFP-C1/K-Ras(G12V), pECFP-C1/Galektin-8 long oder pECFP-C1/Galektin-8 short und pcDNA3.1/HA-ERK2 ko-transfiziert. Mit Hilfe des gegen den HA-tag gerichteten Antikörpers 12CA5 und Protein G-Agarose *beads* wurde HA-ERK2 aus Gesamtlisaten präzipitiert. Die Präzipitate wurden im

Immunoblotverfahren mittels Phospho-Aminosäure-spezifischen ERK1/2 und ERK1/2-spezifischer Antikörpern analysiert.

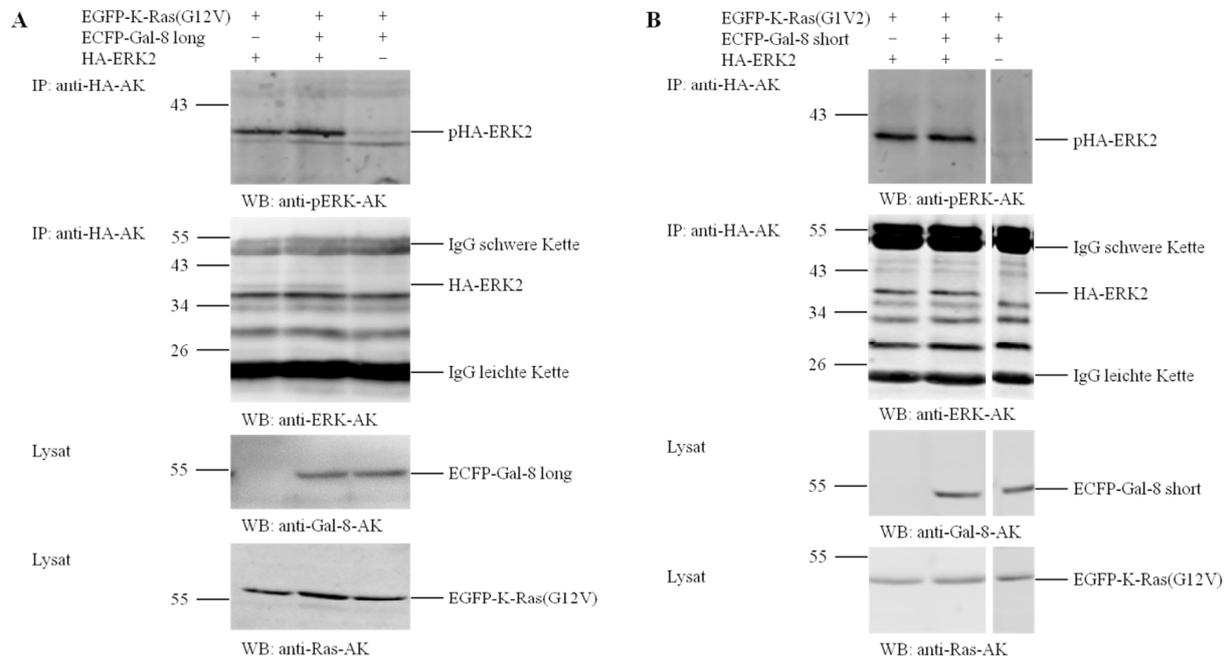


Abb. 4.27: Einfluss der ectopen Galektin-8 Expression auf die K-Ras(G12V)-abhängige Aktivierung von HA-ERK2 in PANC-1 Zellen. PANC-1 Zellen in 6 cm Zellkulturschalen (4×10^5 Zellen/Loch) wurden 24 h nach der Aussaat bei einer Konfluenz von 80 % mit jeweils 2,5 μ g pEGFP-C1/K-Ras(G12V), pEGFP-C1/Galektin-8 long (A) bzw. pEGFP-C1/Galektin-8 short (B) und pcDNA3/HA-ERK2 ko-transfiziert. Die Zelllyse erfolgte 24 h nach Transfektion in 100 μ l RIPA-Puffer. HA-ERK2 wurde mittels des HA-spezifischen Antikörpers 12CA5 aus 0,5 mg Gesamtlysat präzipitiert. Die Präzipitate wurden in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis der Phosphorylierung des präzipitierten HA-ERK2 Proteins erfolgte durch den monoklonalen anti-P-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP[®]-Antikörper, der Nachweis des gesamten HA-ERK2 Proteingehalts erfolgte durch den monoklonalen anti-panERK-Antikörper sowie mittels ECL Detektion. Zur Kontrolle der Mengen an EGFP-K-Ras(G12V) und Galektin-8 in den Lysaten, die in der Immunpräzipitation eingesetzt worden waren, wurden 50 μ g Gesamtlysat in einem weiteren 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis des ectopen ECFP-Galektin-8 long oder short erfolgte mittels des monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörpers, der des ectopen EGFP-K-Ras(G12V) mittels des monoklonalen Anti-Pan-Ras (Ab-3)-Antikörpers sowie mittels ECL Detektion. Ein Proteinstandard ist links markiert. Abkürzungen: AK: Antikörper; IP: Immunpräzipitation; WB: Western Blot Analyse.

Die exemplarischen Immunoblots aus 3 unabhängigen Versuchen in Abbildung 4.27, Teilabbildung A zeigen, dass die ectope ECFP-Galektin-8 long Expression in Spur 2 (+ EGFP-K-Ras(G12V) + ECFP-Galektin-8 long + HA-ERK2) im Vergleich zur Kontrolle (Spur 1; + EGFP-K-Ras(G12V) + HA-ERK2) keine veränderte Phosphorylierung von HA-ERK2 zur Folge hat. Der zweite Immunoblot in Teilabbildung A repräsentiert in den Spuren 1 und 2 die Präzipitation von HA-ERK2. Wie aus den Kontrollen der Mengen an EGFP-K-Ras(G12V) und Galektin-8 long im Lysat, die in der Immunpräzipitation eingesetzt wurden hervorgeht, wurden die gleichen Mengen an EGFP-K-Ras(G12V) und ECFP-Galektin-8 long

(Teilabbildung A, untere Blots) eingesetzt. In den beiden weiteren durchgeführten Immunpräzipitationsstudien wurden zum einen eine leichte Reduzierung und zum anderen keine Änderung der Phosphorylierungsintensität von HA-ERK2 detektiert.

Die repräsentativen Immunoblots der Immunpräzipitation aus 3 Experimenten in Teilabbildung B weisen in der Kontrolle in Spur 1 (+ EGFP-K-Ras(G12V) + HA-ERK2) und in Spur 2 (+ EGFP-K-Ras(G12V) + ECFP-Galektin-8 short + HA-ERK2) die gleichen Bandenintensitäten bezüglich der Phosphorylierung von HA-ERK2 auf. Eine Überexpression von ECFP-Galektin-8 short führt nicht zu einer Änderung der EGFP-K-Ras(G12V)-induzierten HA-ERK2 Phosphorylierung. Die Detektion des präzipitierten HA-ERK2 zeigt gleiche Mengen in den Spuren 1 und 2. Die Kontrollen (Teilabbildung B, untere Blots) belegen, dass gleiche Mengen an EGFP-K-Ras(G12V) und ECFP-Galektin-8 short im Lysat, das in der Immunpräzipitation eingesetzt wurde, vorhanden sind. Die beiden weiteren Immunpräzipitationsstudien bestätigen dieses Ergebnis. Es wurde keine Änderung der EGFP-K-Ras(G12V)-induzierten Phosphorylierung von HA-ERK2 detektiert.

Weder eine erhöhte Galektin-8 long noch eine erhöhte Galektin-8 short Proteinexpression in PANC-1 Zellen übt einen Einfluss auf die K-Ras(G12V)-induzierte ERK2 Aktivität aus.

Die HA-ERK2 Phosphorylierung wurde überdies densitometrisch analysiert. Die Bandenintensität der HA-ERK2 Phosphorylierung wurde zu der Bandenintensität des präzipitierten HA-ERK2 ins Verhältnis gesetzt. Die Kontrolle (Abb. 4. 27 Spur 1; + EGFP-K-Ras(G12V) + HA-ERK2 - ECFP-Galektin-8) wurde als Referenzwert gleich 1 gesetzt.

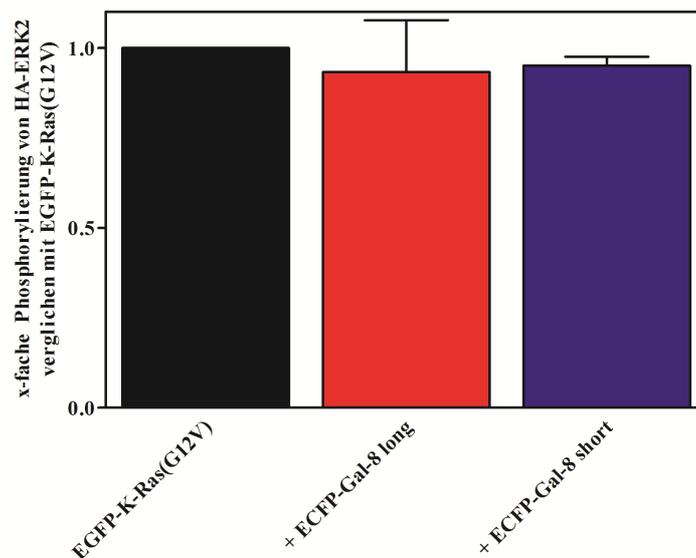


Abb. 4.28: Densitometrische Analyse des Einflusses einer ektopten Galektin-8 Expression auf die K-Ras(G12V)-abhängige Phosphorylierung von HA-ERK2 in PANC-1 Zellen. Die Bandenintensitäten des phosphorylierten HA-ERK2 wurden zu denen des nicht-phosphorylierten Proteins ins Verhältnis gesetzt. Die Kontrolle (EGFP-K-Ras(G12V)) wurde als Referenz gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse der x-fachen Phosphorylierung von HA-ERK2 unter dem Einfluss einer ECFP-Galektin-8 long bzw. ECFP-Galektin-8 short Expression sind als Mittelwert \pm S.D. aus 3 Versuchen angegeben.

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung in Abbildung 4.28 zeigen, dass weder die Expression von ECFP-Galektin-8 long ($0,93x \pm 0,14$ S.D.) noch von ECFP-Galektin-8 short ($0,95x \pm 0,03$ S.D.) einen Einfluss auf die EGFP-K-Ras(G12V)-induzierte Phosphorylierung von HA-ERK2 hat.

4.8. Einfluss von Galektin-8 auf die Migration in PANC-1 Zellen

Frau Dr. Monika Unger konnte zeigen, dass die stabile Expression von EGFP-K-Ras(G12V) zu einer deutlich verstärkten, Akt-abhängigen Migration von PANC-1 Zellen führte (Dissertation, Dr. rer. nat. Monika Unger, Universität Ulm, 2006). Um zu untersuchen, ob die Expression von Galektin-8 die Migration von PANC-1 Zellen beeinflusst, wurden *Wounding-Assays* durchgeführt. Dazu wurden PANC-1 Zellen mit sowohl mit den siRNAs Gal-8 si-5 und Gal-8 si-8 als auch mit einer Kontroll-siRNA in einem Doppelsatz transfiziert. Vor dem *wounding* wurden die Zellen für 2 h mit dem Zytostatikum Mitomycin C behandelt. Im Anschluss wurde ein Spalt durch den konfluenten Zellrasen gezogen (*wounding*). Ein Ansatz wurde mit 10 % FCS im Wachstumsmedium, der zweite in DMEM-Medium ohne FCS weiter kultiviert. Der Wundverschluss und somit die Wanderung der Zellen mit und ohne FCS Zugabe wurde nach 2 h (t_0), 14 h (t_{14}), 24 h (t_{24}), 38 h (t_{38}) und 48 h (t_{48}) mit dem Mikroskop dokumentiert. Zur Überprüfung der Galektin-8 Inhibierung wurden die Zellen nach der mikroskopischen Dokumentation lysiert. Die Detektion von Galektin-8 erfolgte im Immunoblotverfahren.

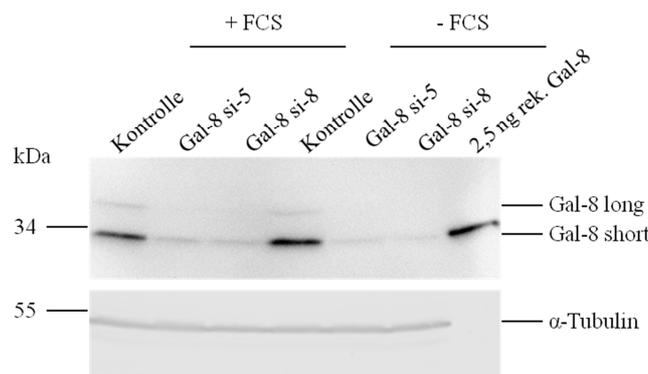


Abb. 4. 29: Nachweis der Inhibierung der Galektin-8 Expression durch die siRNAs Gal-8 si-5 und si-8 in PANC-1 Zellen. PANC-1 Zellen in 6-Lochzellkulturplatten (1×10^5 Zellen/Loch) wurden 24 h nach der Aussaat mit je 50 nM Kontroll-siRNA, Gal-8 si-5 oder Gal-8 si-8 transfiziert. Nach 24 h wurde ein *Wounding Assay* durchgeführt und die Zellen in Wachstumsmedium +10 % FCS bzw. in DMEM-Medium ohne FCS kultiviert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen in 75 μ l RIPA-Puffer lysiert und jeweils 50 μ g Gesamtlisat wurde in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Galektin-8 Detektion erfolgte durch den monoklonalen anti-Galektin-8-Antikörper sowie mittels ECL-Detektion. Um eine gleichmäßige Proteinbeladung nachzuweisen, wurde α -Tubulin mittels des monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörpers detektiert. Ein Proteinstandard ist links markiert.

In Abbildung 4.29 ist exemplarisch die Inhibierung der Galektin-8 Expression, vermittelt durch die siRNAs Gal-8 si-5 bzw. Gal-8 si-8, aus einem von 3-5 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Bandenintensitäten von Galektin-8 wurden densitometrisch erfasst. Verglichen mit der Kontrolle ergibt sich ein Galektin-8 short *knock down* von 82 % bzw. 83 % durch Gal-8 si-5 bzw. Gal-8 si-8 im Wachstumsmedium und eine Inhibition um 92 % bzw. 93 % durch Gal-8 si-5 bzw. Gal-8 si-8 bei Serumentzug. Die Galektin-8 long Proteinexpression ist im Vergleich zu Galektin-8 short in allen gezeigten Proben deutlich schwächer und eine verlässliche densitometrische Auswertung war nicht möglich. Die Detektion von α -Tubulin zeigt, dass in allen Spuren eine vergleichbare Menge Protein aufgetragen wurde.

Es wurden nur Versuche ausgewertet, die eine um mindestens 50 % reduzierte Galektin-8 Proteinexpression aufwiesen.

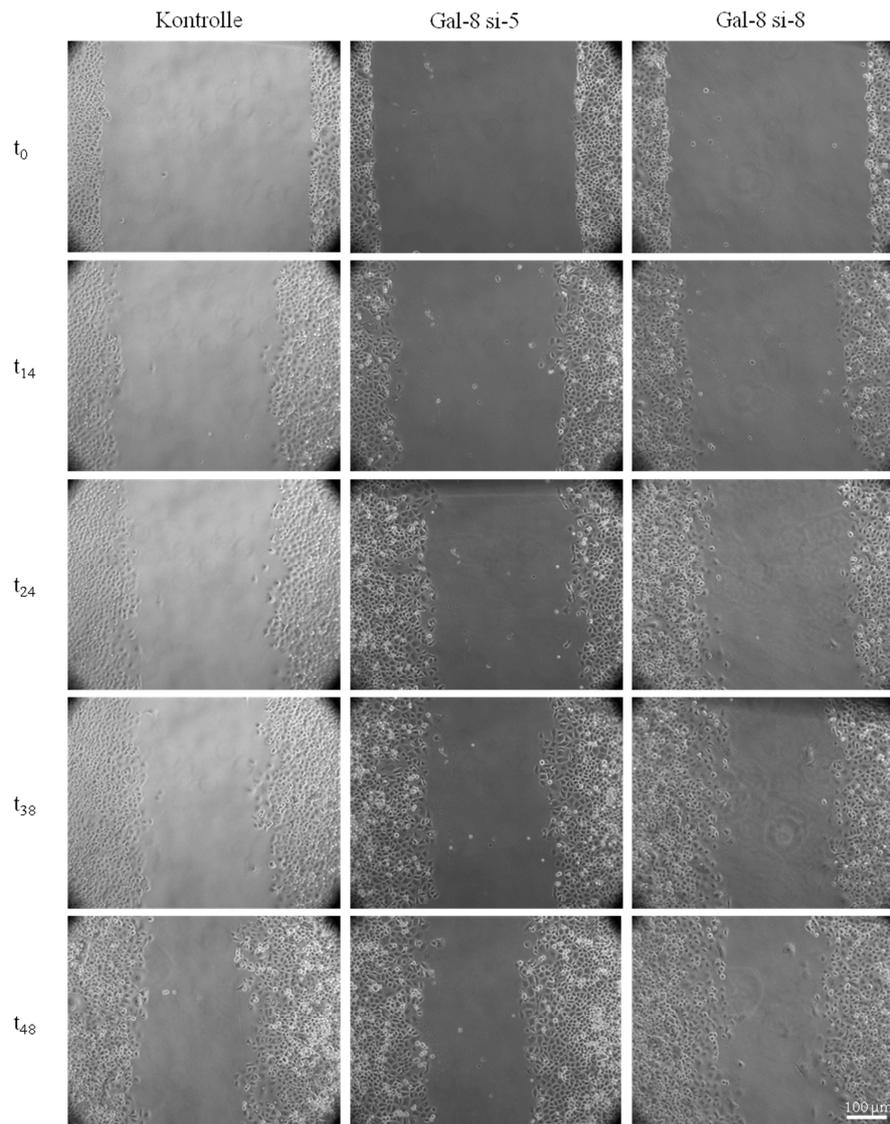


Abb. 4. 30: Einfluss von Galektin-8 auf die Migration von PANC-1 Zellen unter Zugabe von 10 % FCS im Wachstumsmedium. PANC-1 Zellen wurden in einer 6-Lochzellkulturplatte (4×10^5 Zellen/Loch) 24 h kultiviert, mit 50 nM Kontroll-siRNA, 100 nM Gal-8 si-5 oder 100 nM Gal-8 si-8 transfiziert und 48 h bis zur Konfluenz kultiviert. Mit einer Pipettenspitze wurde ein Spalt durch den Zellrasen gezogen und die Wanderung der Zellen unter Zugabe von 10 % FCS im Wachstumsmedium beobachtet. Zu den Zeitpunkten t_0 , t_{14} , t_{24} , t_{38} und t_{48} wurden pro Transfektionsansatz je 9 Phasenkontrastaufnahmen gemacht. Hier abgebildet ist jeweils eine repräsentative Aufnahme pro Zeitwert und Transfektionsansatz. Der Messbalken entspricht 100 μm .

Die Abbildung 4.30 zeigt repräsentative Phasenkontrastaufnahmen der Spalten nach dem *wounding* unter Einfluss von FCS. Dargestellt sind die Mikroskopieaufnahmen der PANC-1 Zellen, die mit Kontroll-siRNA, Gal-8 si-5 und Gal-8 si-8 transfiziert wurden zu den Zeitpunkten t_0 , t_{14} , t_{24} , t_{38} und t_{48} .

Zum Zeitpunkt t_0 sind alle Spalten etwa gleich breit und schließen sich im Laufe der Zeit gleichmäßig.

Zur quantitativen Auswertung wurde jede Aufnahme an 20 Stellen vermessen. Anhand dieser Werte wurde der prozentuale Wundverschluss nach der siRNA-vermittelten Inhibierung der

Expression von Galektin-8 durch Gal-8 si-5 bzw. Gal-8 si-8 aus 5 bzw. 3 Experimenten ermittelt.

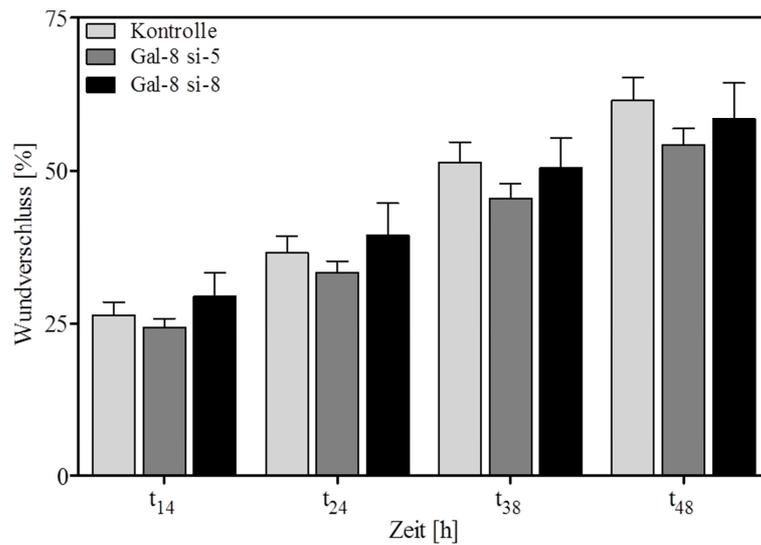


Abb. 4.31: Graphische Darstellung des Einflusses von Galektin-8 auf die Migration von PANC-1 Zellen unter Zugabe von 10 % FCS in Wachstumsmedium. Dargestellt ist der prozentuale Wundverschluss als Mittelwert \pm SEM zu den Zeitpunkten t_0 , t_{14} , t_{24} , t_{38} und t_{48} . Ausgewertet wurden 5 unabhängige Experimente, in denen Zellen mit Gal-8 si-5 transfiziert wurden bzw. 3 unabhängige Experimente in denen Zellen mit Gal-8 si-8 transfiziert wurden.

Das Balkendiagramm in Abbildung 4.31 fasst den prozentualen Wundverschluss als Mittelwert \pm SEM aus 5 bzw. 3 unabhängigen Experimenten unter Einfluss von FCS zusammen. Zu allen gemessenen Zeitpunkten sind nur minimale Unterschiede bezüglich der Wanderung zwischen den Galektin-8 *knock down*- und den Kontrollzellen zu sehen. Nach 14 h ergab sich ein Wundverschluss von $26,3 \pm 2,2$ % in der Kontrolle und von $24,4 \pm 1,4$ % bzw. $29,5 \pm 3,8$ % in den Ansätzen, die mit Gal-8 si-5 bzw. si-8 transfiziert worden waren. 24 h nach dem *wounding* haben die Kontrollzellen den Spalt zu $36,5 \pm 2,7$ % geschlossen, die Zellen mit reduzierter Galektin-8 Proteinexpression schlossen den Spalt zu $33,3 \pm 1,9$ % bzw. $39,3 \pm 5,4$ %. Während die Kontrollzellen den Spalt nach 38 h zu $51,3 \pm 3,3$ % verschlossen haben, liegt der Wundverschluss in den Galektin-8 *knock down* Zellen bei $45,6 \pm 2,3$ % bzw. $50,5 \pm 4,8$ %. Zum letzten dokumentierten Zeitpunkt (t_{48}) erreichten die Kontrollzellen einen Wundverschluss von $61,6 \pm 3,6$ %. Die Zellen mit der deutlich geringeren Galektin-8 Expression zeigen einen Wundverschluss von $54,2 \pm 2,6$ % bzw. $58,4 \pm 6$ %.

In den 48 h des Versuchszeitraums beträgt die durchschnittliche Wanderungsgeschwindigkeit der Kontrollzellen $6 \pm 0,6$ $\mu\text{m/h}$, die der Gal-8 si-5 bzw. Gal-8 si-8 transfizierten Zellen $5,6 \pm 0,7$ $\mu\text{m/h}$ bzw. $5,8 \pm 0,6$ $\mu\text{m/h}$. Die Unterschiede sind zu keinem gemessenen Zeitpunkt signifikant (2way ANOVA).

In einem zweiten Versuchsansatz wurden die mit Kontroll-siRNA, Gal-8 si-5 und Gal-8 si-8 transfizierten Zellen nach dem *wounding* in DMEM-Medium ohne FCS kultiviert.

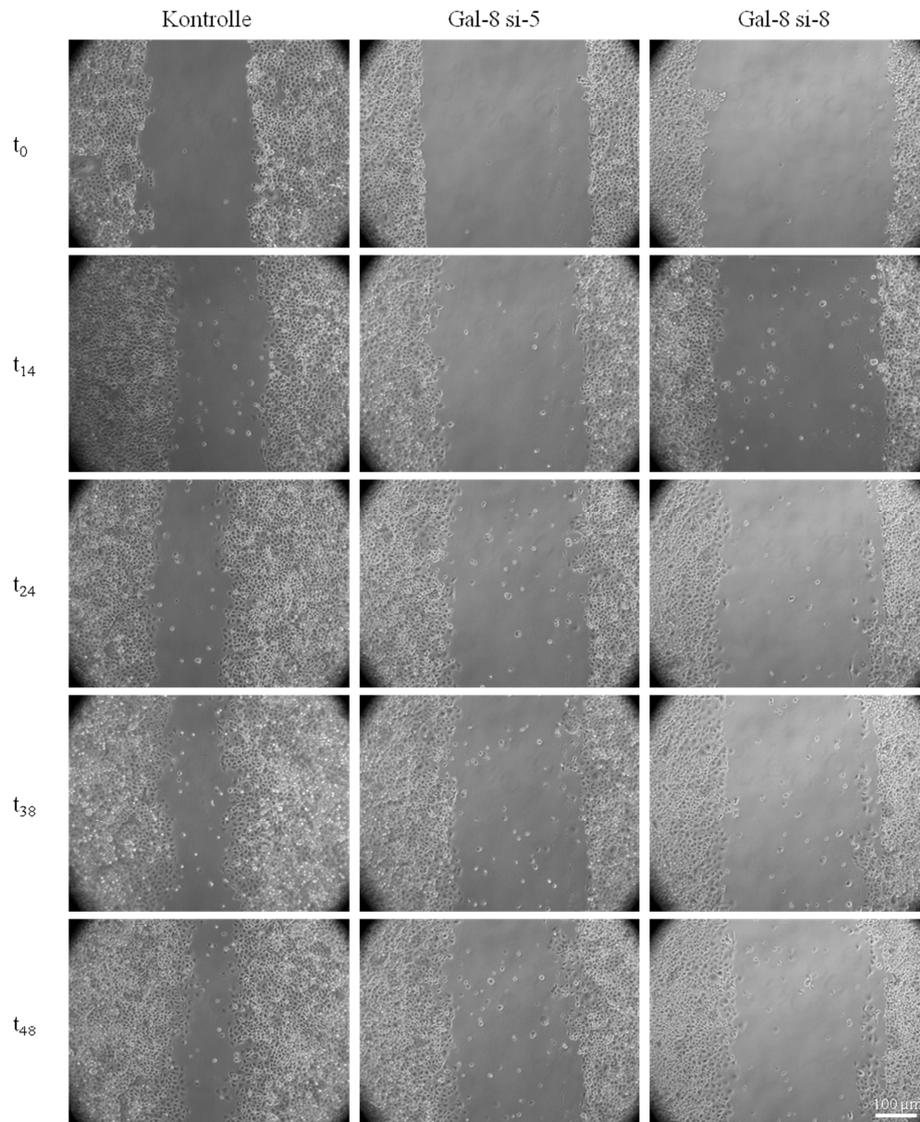


Abb. 4.32: Einfluss von Galektin-8 auf die Migration von PANC-1 Zellen in serumfreiem Medium. PANC-1 Zellen wurden in einer 6-Lochzellkulturplatte (4×10^5 Zellen/Loch) 24 h kultiviert, mit 50 nM Kontroll-siRNA, 100 nM Gal-8 si-5 oder 100 nM Gal-8 si-8 transfiziert und 48 h bis zur Konfluenz kultiviert. Mit einer Pipettenspitze wurde ein Spalt durch den Zellrasen gezogen und die Wanderung der Zellen in serumfreiem Medium beobachtet. Zu den Zeitpunkten t_0 , t_{14} , t_{24} , t_{38} und t_{48} wurden pro Transfektionsansatz je 9 Phasenkontrastaufnahmen gemacht. Hier abgebildet ist jeweils eine repräsentative Aufnahme pro Zeitwert und Transfektionsansatz. Der Messbalken entspricht 100 μm .

Abbildung 4.32 zeigt charakteristische Phasenkontrastaufnahmen eines Spaltes je Versuchsansatz zu den Zeitpunkten t_0 , t_{14} , t_{24} , t_{38} und t_{48} . Verglichen mit den Ergebnissen zum Einfluss von Galektin-8 auf die Migration von PANC-1 Zellen unter Zugabe von 10 % FCS im Wachstumsmedium, zeigten die Zellen eine langsamere Migration.

Zur quantitativen Auswertung wurde jeder dokumentierte Spalt an 20 Stellen vermessen und der prozentuale Wundverschluss ermittelt.

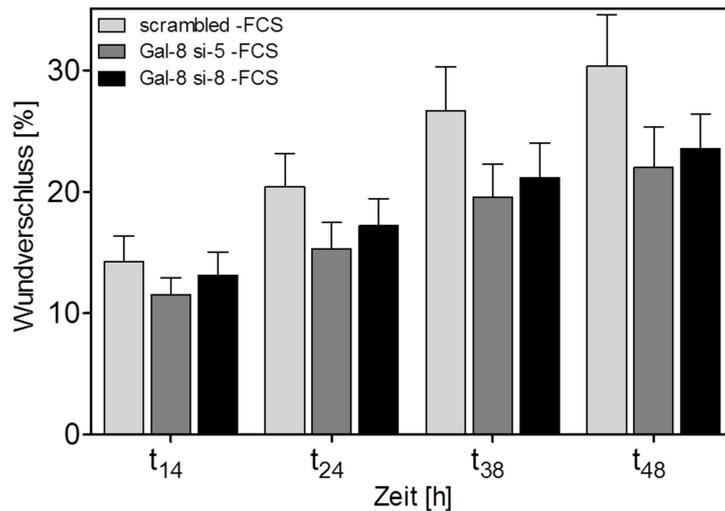


Abb. 4.33: Graphische Darstellung des Einflusses von Galektin-8 auf die Migration von PANC-1 Zellen in serumfreiem Medium. Dargestellt ist der prozentuale Wundverschluss als Mittelwert \pm SEM zu den Zeitpunkten t_0 , t_{14} , t_{24} , t_{38} und t_{48} . Ausgewertet wurden 3 unabhängige Experimente, in denen Zellen mit Gal-8 si-5 bzw. Gal-8 si-8 transfiziert wurden.

In Abbildung 4.33 ist der prozentuale Wundverschluss als Mittelwert \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten in einem Balkendiagramm dargestellt. Zum Zeitpunkt t_{14} haben die Kontrollzellen den Spalt um $14,2 \pm 2,2$ % verschlossen, die Galektin-8 *knock down* Zellen um $11,5 \pm 1,4$ % bzw. $13,1 \pm 2,0$ %. 24 h nach dem *wounding* zeigen die Kontrollzellen einen Wundverschluss von $20,4 \pm 2,8$ %, die Galektin-8 siRNA transfizierten Zellen schließen die Wunde um $15,4 \pm 2,2$ % bzw. $17,2 \pm 2,2$ %. Weitere 12 h später liegt eine Schließung des Spalts durch die Kontrollzellen um $26,7 \pm 3,6$ % und um $19,6 \pm 2,7$ % bzw. $21,2 \pm 2,8$ % durch die Galektin-8-defizienten Zellen vor. Zum Zeitpunkt t_{48} wurde ein Wundverschluss von $30,3 \pm 4,2$ % in der Kontrolle und von $22 \pm 3,3$ % bzw. $23,5 \pm 2,9$ % in den Galektin-8 *knock down* Zellen ermittelt.

Zusammenfassend konnte in 3 Experimenten gezeigt werden, dass verglichen mit den Kontrollzellen, die siRNA-vermittelte Inhibierung der Expression von Galektin-8 zu einem verlangsamten Wundverschluss von PANC-1 Zellen in serumfreiem Medium führt.

Die Kontrollzellen zeigen in den 48 h des Versuchszeitraums eine Wanderungsgeschwindigkeit von $2,7 \pm 0,3$ $\mu\text{m/h}$, während die Gal-8 si-5 bzw. si-8 transfizierten Zellen $2,3 \pm 0,3$ $\mu\text{m/h}$ bzw. $2,3 \pm 0,4$ $\mu\text{m/h}$ gewandert sind. Die Unterschiede sind zu keinem gemessenen Zeitpunkt signifikant (2way ANOVA).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels biochemischer Methoden gezeigt werden, dass die beiden Isoformen Galektin-8 long und Galektin-8 short sowohl mit der konstitutiv aktiven K-Ras(G12V) als auch mit der dominant negativen K-Ras(S17N) Mutante interagiert. Die farnesyldefizienten Mutanten K-Ras(G12V,C185S) und K-Ras(S17N, C185S) waren nicht in der Lage mit Galektin-8 long oder short zu interagieren. Durch Strukturmodellierung wurde eine mögliche hydrophobe Bindungstasche für die Farnesylgruppe von K-Ras in der N-terminalen als auch in der C-terminalen CRD von Galektin-8 identifiziert.

Durch die Verwendung verschiedener pharmakologischer Inhibitoren kann geschlussfolgert werden, dass der Galektin-8 Proteingehalt in PANC-1 Zellen ERK1/2- und Akt/mTOR-abhängig reguliert wird. Eine siRNA-induzierte Inhibierung der Galektin-8 Proteinexpression führte in PANC-1 Zellen zu einer 1,7x gesteigerten Phosphorylierung von Akt und ERK sowie zu einer um 20-25 % verlangsamten Migration.

5.1. Interaktion von K-Ras(G12V) mit Galektin-8 und Galektin-3 in PANC-1 Zellen

In Ko-Immunpräzipitationsstudien wurden Galektin-8 long, Galektin-8 short und Galektin-3 mit EGFP-K-Ras(G12V) und EGFP-K-Ras(S17N), jedoch nicht mit den farnesyldefizienten Mutanten EGFP-K-Ras(G12V,C185S) oder EGFP-K-Ras(S17N,C185S) ko-präzipitiert.

Zur Etablierung der Ko-Immunpräzipitationen wurde zunächst die Bindung des endogenen Galektin-8 und Galektin-3 mit der Farnesylgruppe des stabil exprimierten EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1 Zellen untersucht. Es wurden deutliche Unterschiede bezüglich der Bindung von Galektin-8 bzw. Galektin-3 an EGFP-K-Ras(G12V) festgestellt (Abb. 4.9). Für die Ko-Immunpräzipitationsanalyse von K-Ras(G12V) und Galektin-8 wurden die Zellen in einem Puffer lysiert, der u.a. 50 mM NaCl, 0,5 % Na-Deoxycholat und 1 % TritonTM X-100 als nicht-ionisches Detergenz enthält. Die von Elad-Sfadia beschriebene Interaktion zwischen Galektin-3 und K-Ras(G12V) konnte in diesem Puffer jedoch nicht nachgewiesen werden (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Dieser Nachweis erfolgte in IP-Puffer nach Shalom-Feuerstein mit 200 mM NaCl, 0,5 % Na-Deoxycholat und 0,5 % Nonidet P40 als nicht-ionisches Detergenz. Protein-Protein-Interaktionen ergeben sich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen wie z.B. Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Interaktionen oder hydrophobe Wechselwirkungen (Zhang, 2012). Wie durch Strukturmodellierung gezeigt, bindet vermutlich der Farnesylrest des K-Ras in eine hydrophobe Tasche des Galektins.

Bei schwächeren NaCl Konzentrationen ist es wahrscheinlich, dass die Proteine Aggregate ausbildeten und somit nicht interagieren konnten (Koolmann und Rhöm, 1998). Die erhöhte

Salzkonzentration von 200 mM entspricht in etwa der physiologischen Konzentration von 150 mM. Mit weiter steigenden Salzkonzentrationen sinkt allerdings die Löslichkeit der Proteine und sie bilden einen Niederschlag (Beyer, 1991). TritonTM X-100 und Nonidet P40 lösen Proteine aus eukaryotischen Zellen ohne diese zu denaturieren. Für die Galektin-3/K-Ras Interaktion wurde der Lysepuffer mit nur 0,5 % statt 1 % nicht-ionischem Detergenz versetzt, da sich sonst eventuell die Proteine nicht nur aus den Membranen sondern auch voneinander lösen. Weder der Einfluss der Salzkonzentrationen noch der Detergenzien auf die Löslichkeit der Proteine wurden einzeln untersucht und können somit nur spekulativ diskutiert werden.

Ein weiterer Grund für eine verhinderte Galektin-3/K-Ras Interaktion könnte der pH-Wert sein. Je näher der pH-Wert des Puffers am isoelektrischen Punkt des Proteins liegt, desto geringer ist seine Löslichkeit (Zhang, 2012). Der isoelektrische Punkt von Galektin-3 liegt basal bei 8,58 (www.phosphosite.org; Cell Signaling) und damit sehr nahe am pH-Wert des Gold-Lyse-Puffers (pH 7,9), was ein schwächeres Bindungsverhalten von Galektin-3 erklären könnte. Der isoelektrische Punkt von Galektin-8 liegt basal bei 9,11 (www.phosphosite.org; Cell Signaling) und dadurch weiter vom pH-Wert des Gold-Lyse-Puffers entfernt. Der pH-Wert des IP-Puffers liegt bei 7,6.

Durch die Verwendung des IP-Puffers nach Shalom-Feuerstein konnte in den Ko-Immunpräzipitationsstudien in dieser Arbeit bestätigt werden, dass Galektin-3 mit EGFP-K-Ras(G12V), nicht aber mit der farnesyldefizienten EGFP-K-Ras(G12V,C185S) Mutante interagiert (Abb. 4.10). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Galektin-8 long und short sowohl mit K-Ras(G12V) als auch mit K-Ras(S17N) ko-präzipitierten. Eine fehlende Farnesylierung sowohl des konstitutiv aktiven als auch des dominant negativen EGFP-K-Ras führte zu keiner Interaktion mit Galektin-8 long oder short (Abb. 4.11 und 4.12). Daraus kann gefolgert werden, dass die Interaktion von Galektin-8 bzw. Galektin-3 mit dem farnesylierten K-Ras unabhängig von dessen Aktivierungszustand erfolgt. Die Farnesylierung von K-Ras hingegen ist für die Interaktion mit Galektin-8 und Galektin-3 essentiell. Diese Ergebnisse unterstützen die Resultate von Paz und Elad-Sfadia. Galektin-1 wurde als Begleitprotein von H-Ras(G12V) identifiziert und lenkte dieses zur Plasmamembran. Die Deletion von Galektin-1 hatte zur Folge, dass das aktive H-Ras in intrazellulären Kompartimenten statt an der Plasmamembran lokalisierte (Paz et al., 2001). Diese Funktion konnte auch für die Galektin-3 Interaktion mit K-Ras(G12V) beschrieben werden. Galektin-3 stabilisierte K-Ras in seiner aktiven Konformation, was von der Farnesylgruppe des Ras Proteins abhängig war (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Daraus ergibt sich die Hypothese, dass nicht-farnesyliertes K-Ras nicht an die Plasmamembran rekrutiert werden kann, da es nicht an Galektin-3 binden und an der

Membran stabilisieren werden kann. Im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit generierten Daten kann, analog zur publizierten Galektin-1/H-Ras und Galektin-3/K-Ras Interaktion, die Hypothese aufgestellt werden, dass farnesyldefizientes K-Ras nicht an die Plasmamembran rekrutiert werden kann, da es nicht an Galektin-8 long oder short binden und an der Membran stabilisieren werden kann.

Zusammenfassend belegen sowohl die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse als auch die Literaturangaben die Wichtigkeit der Farnesylierung für die Stabilisierung der Ras Proteine durch die Galektine an der Plasmamembran.

Erste, vorläufige Ergebnisse weisen auf eine Konkurrenz zwischen Galektin-8 und Galektin-3 um die Bindung an K-Ras(G12V) hin (Abb. 4.15). Eine siRNA-vermittelte reduzierte Galektin-8 Proteinexpression führte dazu, dass mehr Galektin-3 mit EGFP-K-Ras(G12V) ko-immunpräzipitierte als in Anwesenheit von Galektin-8. Trotz einer etwa 95 %igen Inhibierung der Galektin-8 Proteinexpression konnte im Vergleich zur Kontrolle etwa die gleiche Menge an verbliebenen Galektin-8 aus den mit Gal-8 siRNA transfizierten Zellen mit K-Ras(G12V) ko-immunpräzipitiert werden. Diese ersten Daten könnten auf eine Präferenz von K-Ras für Galektin-8 hinweisen.

In weiteren Versuchen müsste die Galektin-3 Proteinexpression siRNA-vermittelt inhibiert werden. Sollte im Vergleich zu PANC-1 Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, welche keinerlei Homologie zu bekannten Genen aufweist, etwa gleiche Mengen Galektin-8 aus den mit Gal-3 siRNA transfizierten Zellen ko-immunpräzipitiert werden, würde es für eine Präferenz von K-Ras für Galektin-8 sprechen. Die Präferenz von K-Ras für Galektin-3 wäre demnach schwächer und das Fehlen von Galektin-3 würde kaum Auswirkungen auf die Bindung von Galektin-8 an K-Ras haben. Des Weiteren könnten durch Überexpression von Galektin-8 oder Galektin-3 Verdrängungsstudien durchgeführt werden. Dazu müsste die genaue Konzentration beider Galektine und des K-Ras bestimmt werden. Durch schrittweise Erhöhung der Konzentration des einen Galektins kann ermittelt werden, bei welcher Konzentration das andere Galektin, welches an K-Ras gebunden vorliegt, verdrängt wird.

Wie aus den Abbildungen 4.2 und 4.5 hervorgeht, konnte im Vergleich zu den Immunoblotanalysen nach subzellulärer Fraktionierung (Abbildung 4.4), fluoreszenzmikroskopisch weder ECFP-Galektin-8 long oder short noch mCherry-Galektin-8 long deutlich an der Plasmamembran detektiert werden. Die Proteinexpression konnte in der gesamten Zelle gezeigt werden. Es wäre möglich, dass ein N-terminal fusionierter

Fluoreszenz-*tag* die Lokalisierung an der Plasmamembran sterisch hindert oder zu einer veränderten Faltung des Proteins führt, welches nicht mehr an die Membran transportiert werden kann. Sollte ein C-terminal fusionierter Fluoreszenz-*tag* am Galektin eine Ko-Lokalisierung mit EGFP-K-Ras(G12) an der Plasmamembran zeigen, so könnte die mögliche Konkurrenz zwischen Galektin-8 und Galektin-3 um die Bindung an K-Ras auch fluoreszenzmikroskopisch verifiziert werden. Galektin-8 bzw. Galektin-3, fusioniert mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen wie z.B. ECFP bzw. mCherry, müssten in EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen eine gleichstarke Lokalisierung an der Plasmamembran aufweisen (Kontrolle), um die Verdrängung des einen Galektins durch das andere zu charakterisieren. In weiteren Ansätzen müsste Galektin-8-ECFP bzw. Galektin-3-mCherry stärker exprimiert werden und die Ko-Lokalisierung von Galektin-3-mCherry bzw. Galektin-8-ECFP mit EGFP-K-Ras(G12V) an der Plasmamembran analysiert werden.

5.2. Strukturelle Analyse möglicher hydrophober Bindungstaschen in der N-terminalen und C-terminalen Galektin-8 CRD

Durch die Arbeiten von Hoffman und Mitarbeiter wurde in der Sekundärstruktur von RhoGDI (GDI1, GDI α) eine hydrophobe Bindungstasche für die Geranylgeranylgruppe von Cdc42 identifiziert. Es wurden 12 für diese Interaktion kritischen Aminosäuren beschrieben (Hoffman *et al.*, 2000). Mittels Strukturmodellierung wurden, analog zu RhoGDI, hydrophobe Taschen in der Galektin-1 und Galektin-3 CRD lokalisiert, die vermutlich mit der Farnesylgruppe des H-Ras bzw. K-Ras interagieren. In Aminosäuresequenzvergleichen zwischen RhoGDI und Galektin-1 bzw. -3 waren 6 der für die Interaktion kritischen Aminosäuren identisch oder homolog (Rotblat *et al.*, 2004a; Ashery *et al.*, 2006). In der Sekundärstruktur von RhoGDI und LyGDI, einem Homolog von RhoGDI, wurde eine weitere hydrophobe Vertiefung beschrieben, in der die Isoprenylgruppe von Rac2 bindet (Scheffzek *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Bedeutung der Farnesylierung von EGFP-K-Ras(G12V) und EGFP-K-Ras(S12N) für die Interaktion mit Galektin-8 gezeigt werden. Durch Strukturmodellierung wurde eine mögliche hydrophobe Bindungstasche für die Farnesylgruppe von K-Ras in der N-terminalen als auch C-terminalen CRD von Galektin-8 identifiziert (Abb. 4.16 und 4.17). Für die 6 Teilbereiche der Sekundärstruktur, die vermutlich bei der Interaktion von Galektin-8 mit der Farnesylgruppe des K-Ras eine große Rolle spielen, ergaben sich 4 identische Sekundärteilstrukturen. Die Analyse beider Galektin-8 CRDs ergab, dass je 2 Teilstrukturen leicht von der korrespondierenden Sekundärstruktur in

der Galektin-3 CRD abweichen. Diese Teilstrukturen könnten eine Bindung der Farnesylgruppe erschweren, da sie in die mögliche hydrophobe Tasche ragen. Denkbar wäre jedoch eine Ausdehnung der Tasche. Rotblat errechnete in weiteren Strukturanalysen der vermeintlichen Farnesylbindungstasche von Gal-1 einen hohen atomaren Temperaturfaktor (B-Faktor). Je höher der Temperaturfaktor ist, desto flexibler sind die Atome. Dies würde dafür sprechen, dass sich die hydrophobe Tasche bei Bindung der Ras-Farnesylgruppe ausdehnen kann (Yuan *et al.*, 2003; Rotblat *et al.*, 2004a).

In weiterführenden Studien könnte der Galektin-8/K-Ras Komplex, ähnlich des von Hoffman und Mitarbeiter analysierten Cdc42/RhoGDI Komplexes, mittels Kristallstrukturanalysen untersucht werden. In einem vergleichbaren Ansatz könnte K-Ras(G12V) in Insektenzellen (Sf9) und Galektin-8 in *E. coli* exprimiert werden. Nach der Lyse der Zellen würde das Lysat des posttranslational modifizierten K-Ras(G12V) mit dem Lysat des Galektin-8 vereinigt und zur Komplexbildung inkubiert. Nach der Aufreinigung des Proteinkomplexes sollten die Kristalle in hängenden Tropfen wachsen und die Struktur des Komplexes letztlich durch Röntgenbeugung (Röntgendiffraktion) ermittelt werden. Dieser Versuch könnte Aufschluss darüber geben, ob die N-terminale und/oder C-terminale Galektin-8 CRD eine hydrophobe Tasche ausbildet, in die die Farnesylgruppe des K-Ras binden kann. Dabei könnten sowohl Galektin-8 *full length* oder Verkürzungsmutanten verwendet werden, die die *hinge region*, aber jeweils nur eine der CRDs beinhalten. Durch die Verwendung der Verkürzungsmutanten würde gezeigt, ob beide CRDs die Farnesylgruppe binden könnten. Mittels des *full length* Galektin-8 könnte untersucht werden, ob Galektin-8 in der Lage ist zeitgleich sowohl an der N-terminalen als auch an der C-terminalen CRD die Farnesylgruppe von K-Ras zu binden.

5.3. Regulierung des Galektin-8 Proteingehalts in PANC-1 Zellen

Durch die Verwendung verschiedener pharmakologischer Inhibitoren sollten in der vorliegenden Arbeit die Signaltransduktionswege identifiziert werden, die an der Regulation der Proteinexpression von Galektin-1, -3 und -8 beteiligt sein könnten.

Durch die Inkubation von PANC-1 Zellen mit den pharmakologischen Inhibitoren LY294002, FTS, PD98059, SB203580, Rapamyzin und U0126 konnten in der vorliegenden Arbeit keine Änderungen der Proteinmengen von Galektin-1 und -3 detektiert werden. Demnach wird die Galektin-1 und -3 Proteinexpression nicht p38-, PI3K/Akt-, oder MEK/ERK-abhängig reguliert.

In der Literatur wurde beschrieben, dass die Galektin-1 Proteinexpression in Zellen aus gesundem Pankreas über Zellen aus chronischer Pankreatitis hin zu Zellen aus pankreatischen duktalem Adenokarzinomen (PDAC) zunimmt (Tang *et al.*, 2014). In den Bindegewebszellen des Pankreas, den sogenannten Pankreassternzellen, die bei Krebserkrankungen des Pankreas den Tumorzellen günstige Wachstumsbedingungen schaffen, ist die Galektin-1 Proteinexpression verglichen mit den PDAC Zellen deutlich erhöht (Tang *et al.*, 2014; Omary *et al.*, 2007). Durch die Sekretion von TGF- β 1 stimulieren die PDAC Zellen die Galektin-1 Proteinexpression in den Pankreassternzellen. Die Interaktion zwischen dem aus den Pankreassternzellen-stammendem Galektin-1 und den PDAC Zellen ist noch unklar (Tang *et al.*, 2014). Im Vergleich zu Zellen eines gesunden Pankreas wurde für Galektin-3 eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression in pankreatischen Karzinomzelllinien aufgezeigt, welche jedoch keinen funktionellen Einfluss in der malignen Transformation hat (Hann *et al.*, 2011). Die Regulationsmechanismen der Galektin-1 oder -3 Proteinexpression in pankreatischen Tumorzellen sind nicht beschrieben.

Bei der Detektion der Proteinmenge von Galektin-8 wurden in der vorliegenden Arbeit Unterschiede deutlich (Abb. 4.18 B). Die Verwendung von LY294002 (PI3K Inhibitor), FTS (Ras Antagonist), PD98059 (MEK1 Inhibitor) und SB203580 (p38 MAPK Inhibitor) führte in 3 unabhängigen Versuchen zu keinen verlässlichen Aussagen. Die Inkubation der Zellen mit Rapamycin (mTOR Inhibitor) inhibierte die Phosphorylierung von Akt2 und S6 und erhöhte die Galektin-8 Proteinexpression. U0126, ein MEK1/2 Inhibitor, inhibierte die Phosphorylierung von ERK1/2 sowie den Proteingehalt von Galektin-8. Die Galektin-8 Proteinmenge in PANC-1 Zellen wird durch die MEK1/2-ERK1/2-Signalkaskade positiv und durch den Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg negativ reguliert. Anhand der durchgeführten Versuche war es nicht möglich zu folgern, ob Galektin-8 *upstream* von Akt durch PI3K reguliert wird, da die Verwendung des PI3K Inhibitors LY294002 zu keinem eindeutigen Ergebnis führte.

Es kann nur spekuliert werden, ob Galektin-8 schon auf transkriptioneller Ebene durch Akt oder ERK beeinflusst wird, da viele Studien sich zwar mit dem Galektin-8 Proteingehalt in diversen Tumoren beschäftigen, nicht aber mit der Regulation durch Kinasen. Bekannt ist, dass die Galektin-7 mRNA und Proteinexpression in Brustkarzinomzellen durch die Expression des *CCAAT/enhancer-binding protein beta-2* (CEBP β -2) Proteins induziert wird (Campion *et al.*, 2014). CEBP β -2 wird durch den MAPK-Signaltransduktionsweg reguliert (Marcinkowska *et al.*, 2006). Eine Inhibierung von MEK1/2 könnte zu einer verminderten

CEBP β -2 Expression und eventuell zu einer reduzierten Galektin-8 mRNA und Proteinexpression führen.

In Adenoma der Hypophyse sind die Transkriptionsfaktoren RUNX1 und RUNX2 für die Expression des Galektin-3 Gens LGALS3 verantwortlich, indem sie direkt an die Galektin-3 Promotorregion binden (Zhang *et al.*, 2009; Righi *et al.*, 2013). Sowohl der Smad als auch der p38 Signalweg sind an der Expression und Regulierung von RUNX2 beteiligt (Lee *et al.*, 2002). Denkbar wäre eine negative Regulierung von Galektin-8 durch RUNX1 und/oder RUNX2 bzw. deren Bindung an die Galektin-8 Promotorregion. Der p38 Inhibitor SB203580 erhöhte in der vorliegenden Arbeit den Galektin-8 Proteingehalt in 2 von 3 Versuchen. Demnach könnte die Inhibierung der katalytischen Aktivität von p38 die Expression von RUNX2 inhibieren und dadurch die Expression des Galektin-8 Gens begünstigen.

Zur weiteren Klärung der Frage, ob Galektin-8 bereits transkriptionell durch die Inhibierung der Kinasen Akt, mTOR, MEK oder p38 beeinflusst wird, könnten sowohl quantitative *real-time* PCRs als auch Promotorstudien Aufschluss geben. Mittels der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) könnte analysiert werden, ob Transkriptionsfaktoren wie z.B. FOXO1 oder CREB, welche durch Akt bzw. ERK phosphoryliert werden, an die Promotorregion des Galektin-8 Gens binden und dessen Genexpression regulieren (Rena *et al.*, 1999; Costes *et al.*, 2006).

5.4. Aktivierung von Akt2 und ERK1/2 durch Inhibierung der Galektin-8 Proteinexpression in PANC-1 Zellen

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Ras-Effektor-Signaltransduktionswege der PI3K/Akt- und Raf/MEK/ERK-Kaskade großen Einfluss auf die zelluläre Transformation und Tumorgenese haben (Downward, 1998; Khosravi-Far *et al.*, 1998; Brazil und Hemmings, 2001). Die stabile Expression von EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1 Zellen führt zu einer Verdopplung der Akt-abhängige Migrationsrate, hat aber jedoch keinen Einfluss auf die Aktivierung von ERK (Dissertation, Dr. rer. nat. Monika Unger, Universität Ulm, 2006). Die EGF-abhängige Aktivierung des N-Ras/Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionswegs reguliert in PANC-1 Zellen Proliferation und Migration (Giehl *et al.*, 2000).

Ein Aspekt dieser Arbeit war es den Einfluss von Galektin-8 und Galektin-3, als Interaktionspartner von K-Ras, auf diese beiden Ras-induzierten Signalkaskaden zu analysieren. Eine Inhibierung der Proteinexpression von Galektin-8 in PANC-1 Zellen durch siRNAs führte zu einer ca. 1,7x gesteigerten Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2. Daraus

kann die Hypothese gefolgert werden, dass Galektin-8 die Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2 inhibiert. Die Inhibierung von Galektin-3 hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung von Akt, aber es konnte eine 1,3x Steigerung der ERK1/2 Phosphorylierung detektiert werden (Abb. 4.20).

Eine Publikation belegt, dass ein transients *knock down* der Galektin-3 Expression in einer nur moderaten Inhibierung der Proliferation, Migration oder Wachstum in verschiedenen pankreatischen Tumorzelllinien resultiert und dass Galektin-3 noch keine klare Rolle in Pankreaskarzinomzellen zugeschrieben werden kann (Hann *et al.*, 2011).

Eine weitere Arbeitsgruppe veröffentlichte hingegen, dass eine Galektin-3 Inhibierung in EGF-stimulierten pankreatischen Tumorzellen (CAPAN-1) die Interaktion zwischen dem EGFR und dem Transmembranprotein MUC1 erhöhte. Die EGF-Stimulierung bewirkte eine 2fach erhöhte Phosphorylierung des EGFR an Position Y1173, welche als Bindungsstelle für Adapterproteine dient, die in der Phosphorylierung von ERK1/2 involviert sind. Die Galektin-3 Inhibierung resultierte in einer gesteigerten EGF-induzierten ERK1/2 Phosphorylierung (Merlin *et al.*, 2011). Dieses publizierte Ergebnis könnte die gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 nach einem Galektin-3 *knock down* in jedoch EGF-unstimulierten PANC-1 Zellen in der vorliegenden Arbeit erklären.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 durch den Galektin-3 *knock down* könnte der *cross talk* zwischen dem Ras/PI3K/Akt- und dem Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg sein. Durch die Inhibierung des mTORC1 durch Rapamzin kann die S6 Kinase nicht mehr phosphoryliert werden, was über einen negativen *feedback loop* zu einer Aktivierung von ERK1/2 führt (Carracedo *et al.*, 2008). Die Reduzierung der Galektin-3 Proteinexpression könnte dazu beitragen, dass vermehrt Galektin-8 Proteine an K-Ras binden. Der aufgestellten Hypothese nach würde Galektin-8 die Phosphorylierung von Akt und somit indirekt die Phosphorylierung des mTORC1 und von S6 inhibieren. Der negative *feedback loop* würde dann die Phosphorylierung von ERK1/2 nach einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-3 Proteinexpression verstärken.

In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Giehl wurde bereits gezeigt, dass die stabile Transfektion von EGFP-K-Ras(G12V) den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert, aber nicht die Aktivität des Raf/MEK/ERK-Signalweges in PANC-1 Zellen beeinflusst, da keine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 festgestellt wurde (Dissertation von Dr. rer. nat. Monika Unger, Universität Ulm, 2006). Es wird vermutet, dass K-Ras in PANC-1 Zellen Signale nicht über cRaf-1 und MEK an ERK weiterleitet, sondern andere Signalkaskaden aktiviert (Dissertation von Dr. med. Ute Dreissigacker, Universität Ulm, 2005). Ebenfalls wurde

beschrieben, dass MAPK durch MAPK Phosphatasen (MKP) dephosphoryliert und somit inaktiviert werden können (Keyse, 1998). Aktives ERK kann die Expression der MKPs stimulieren (Pouyssegur *et al.*, 2002). MKP-3 wird durch aktives ERK2 induziert, was zu einer Inaktivierung von ERK2 führt (Brondello *et al.*, 1999; Camps *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001; Zhao und Zhang, 2001).

Die siRNA-induzierte Inhibierung der Proteinexpression von Galektin-8 und Galektin-3 in stabil EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen resultierte in dieser Arbeit in einer verstärkten Phosphorylierung von Akt2 (Abb. 4.22). Die stabile Expression von EGFP-K-Ras(G12V) führte zu einer erhöhten Akt2 Phosphorylierung, die durch die Inhibierung von Galektin-8 gesteigert werden konnte.

In der Arbeitsgruppe konnte weiterhin publiziert werden, dass die transiente Transfektion von HA-ERK2 und EGFP-K-Ras(G12V) in PANC-1 Zellen eine EGFP-K-Ras(G12V)-vermittelte Aktivierung von HA-ERK2 zur Folge hatte (Dreissigacker *et al.*, 2005). Die Versuche in dieser Arbeit belegen, dass in PANC-1 Zellen weder eine ECFP-Galektin-8 long noch eine ECFP-Galektin-8 short Überexpression die K-Ras(G12V)-vermittelte Phosphorylierung von HA-ERK2 beeinflusste (Abb. 4.28). Aufgrund der erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 nach einer siRNA-vermittelten Inhibierung der Galektin-8 Expression, wäre bei einer ektopten Galektin-8 Expression eine reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 zu erwarten gewesen.

In der Literatur gibt es keine Hinweise auf die Auswirkungen einer gesteigerten Galektin-8 Proteinexpression in Karzinomzelllinien. Die stabile Expression von Galektin-3 in der humanen Brustkrebszelllinie BT-549 führt zu einer vermehrten Formation der K-Ras.GTP Nanocluster, sowie zu einer signifikanten Erhöhung phosphorylierter ERK Proteine (Shalom-Feuerstein *et al.*, 2008). Ob dieses auch in Pankreaskarzinomzellen zutrifft könnte durch die ektope Expression von Galektin-3 in PANC-1 Zellen überprüft werden.

Eine Galektin-1 Proteinüberexpression in HEK 293T Zellen erhöhte das Membran-assoziierte H-Ras.GTP und die Phosphorylierung von ERK (Paz *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden HEK293 Zellen auf ihren Galektin-Proteingehalt untersucht. Die Zellen exprimierten weder Galektin-1, -3 noch -8 (Daten nicht gezeigt). Daher ist es möglich, dass überexprimiertes Galektin-1, als einziges vorhandenes Galektin in HEK293 Zellen, den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg stimuliert. Deshalb müsste in PANC-1 Zellen gezeigt werden, dass überexprimiertes Galektin-1 auch in Anwesenheit von Galektin-8 H-Ras-vermittelt die Phosphorylierung von ERK erhöht.

Die durch ECFP-Galektin-8 unveränderte EGFP-K-Ras(G12V)-vermittelte Phosphorylierung von HA-ERK2 könnte durch eine Akkumulierung der Galektin-8 Proteine im Zytoplasma zu

erklären sein. Für diese Vermutung würden die in Abbildung 4.6 dargestellten Ergebnisse der subzellulären Lokalisation von EGFP-K-Ras(G12V) und mCherry-Galektin-8 long in EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie sprechen. mCherry-Galektin-8 konnte im Zytosol lokalisiert werden. Eventuell kann Galektin-8 nicht vermehrt an K-Ras binden und eine Überexpression hat somit keinen Einfluss auf die Ras/Raf/MEK/ERK-Signaltransduktion.

Eine siRNA-vermittelte Inhibierung der Galektin-8 Proteinexpression in den Lungenkarzinomzelllinien A549 und A427 hatte in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt1 und ERK1/2 (Abb. 4.24 und 4.26). Arbeiten anderer Arbeitsgruppen befassen sich überwiegend mit der Funktion von Galektin-1 in Lungenkarzinomzelllinien. So konnte gezeigt werden, dass Galektin-1 in A549 Zellen mit H-Ras interagiert und die Expression von p38, MAPK und ERK steigert (Chung *et al.*, 2012). Galektin-1 erhöht des Weiteren die Expression von Integrin $\beta 4$. Die gesteigerte Assoziation beider Proteine verstärkt die Phosphorylierung von FAK und Akt. Demnach fördert Galektin-1 die Tumorprogression durch Integrin $\beta 4$ und den FAK/Akt-Signaltransduktionsweg (Hsu *et al.*, 2013). Eine kürzlich veröffentlichte Studie verdeutlicht die Rolle der intrazellulären Sphingosinkinase 1 (SPHK1) bei der Phosphorylierung von Akt in NSCLC (Zhu *et al.*, 2014). Diese publizierten Ergebnisse lassen vermuten, dass Galektin-1 und SPHK1, nicht aber Galektin-8 an der Regulierung der Phosphorylierung von Akt1 und/oder ERK1/2 in A549 Zellen beteiligt sind.

Es wäre denkbar, dass extrazelluläres Galektin-8 in Lungenkarzinomzelllinien von größerer Bedeutung ist. Hadari und Mitarbeiter identifizierten große Mengen an sekretiertem Galektin-8 in NSCLC H1299 Zellen. Extrazellulär interagiert Galektin-8 selektiv mit Zelloberflächenintegrinen wie $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$. Dabei modulierte Galektin-8 die Interaktion zwischen den Integrinen und der extrazellulären Matrix und regulierte die Zelladhäsion und das Überleben der Zelle (Hadari *et al.*, 2000). Dies deutet auf eine Rolle von Galektin-8 in Integrin-vermittelten Signalkaskaden wie FAK und Src/JNK/c-Jun hin (Zick *et al.*, 2004; Wheeler *et al.*, 2009).

5.5. Einfluss von Galektin-8 auf die Migration von PANC-1 Zellen

Eine Inhibierung der Galektin-8 Proteinexpression führte, wie in Kapitel 4.8 beschrieben, zu einer erhöhten Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2 in PANC-1 Zellen. Sowohl der Raf/MEK/ERK- als auch der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg werden K-Ras-vermittelt aktiviert. Onkogenes K-Ras erhöht die Zellmigration von PANC-1 Zellen (Dissertation von Dr. med. Ute Dreissigacker, Universität Ulm, 2005). In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Giehl konnte eine Beteiligung von Akt2 an der Regulation der EGFP-K-Ras(G12V)-induzierten Migration demonstriert werden (Dissertation, Dr. rer. nat. Monika Unger, Universität Ulm, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss einer siRNA-vermittelten Inhibierung des K-Ras Interaktionspartners Galektin-8 auf das Wanderungsverhalten von PANC-1 Zellen untersucht. In *Wounding assays* zeigten die Zellen, die mit Galektin-8 siRNA transfiziert worden waren, im Vergleich zur Kontrolle nach 48 h eine um 20-25 % verlangsamte Migration (Abb. 4.33). Galektin-8 trägt demnach zur Migration von PANC-1 Zellen bei.

Für extrazelluläres Galektin-8 wurde bereits beschrieben, dass es Dosis-abhängig die Migration von Serum-gehungerten vaskulären, epithelialen Zellen (EC) induziert. Dazu bindet Galektin-8 extrazellulär direkt an CD166, einem Transmembranglykoprotein, das in Zellinteraktionen und trans-EC Migration involviert ist. Der pro-migratorische Effekt von Galektin-8 konnte teilweise durch spezifische Zucker wie Laktose und Thiodigalaktoside inhibiert werden (Troncoso *et al.*, 2014). In Trabekelwerk Zellen konnte eine Interaktion zwischen Galektin-8 und Integrinen gezeigt werden, die zur Ausbreitung der Zellen durch Reorganisation des Aktinzytoskeletts und Bildung von Stressfasern führte. Galektin-8 begünstigte die Ausbildung der Stressfasern durch die Aktivierung der Rho/ROCK-Signalkaskade. Diese Befunde zeigen, dass Galektin-8 das Rho *signaling* modulieren kann (Diskin *et al.*, 2012).

Über die Rolle des intrazellulären Galektin-8 bei der Migration in PANC-1 Zellen ist bisher nichts bekannt. Galektin-3, einem weiteren K-Ras Interaktionspartner, werden keine Funktionen in der Proliferation oder Migration zugesprochen (Hann *et al.*, 2011).

Zur näheren Charakterisierung des Einflusses von Galektin-8 auf die Migration in PANC-1 Zellen könnte des Weiteren untersucht werden, ob eine Galektin-8 Proteinüberexpression die Migration in PANC-1 Zellen erhöht.

Weiterhin könnte analysiert werden, ob PANC-1 Zellen Galektin-8 sezernieren und Galektin-8 extrazellulär mit Integrinen interagiert und dadurch die Migration reguliert wird.

In einem anderen Versuchsansatz könnte der Einfluss von Galektin-8 auf Rho bzw. Rac analysiert werden. Rac1 ist ein Mitglied der Rac Unterfamilie innerhalb der Familie der Rho GTPasen und spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei der Zellmotilität und beim Zellwachstum. Manipulationen der Rac1 Expression beeinflussen selektiv die Proteinexpression einzelner Galektine und Aspekte der Zelloberflächenglykosylierung in der humanen Kolonadenokarzinomzelllinie SW620. Zellen mit reduzierter Rac1 Expression weisen eine erhöhte Galektin-8 Proteinexpression auf (Andre *et al.*, 2014). Eine Rac1-abhängige Expression und vielleicht auch Sekretion von Galektin-8 wäre ein möglicher Ansatz, um die migrationsfördernde Funktion von extrazellulärem Galektin-8 zu inhibieren.

5.6. Lokalisation von Galektin-8 und K-Ras(G12V) in PANC-1 Zellen mittels Immunoblot- und fluoreszenzmikroskopischer Analyse

Galektine können in unterschiedlichen Kompartimenten der Zellen lokalisiert sein. Sie wurden in der extrazellulären Matrix, im Zytoplasma, im Nukleus als auch an der Plasmamembran detektiert und besitzen weder eine Membranankerdomäne noch eine klassische N-terminale Signalsequenz (Cooper und Barondes, 1990). Sie interagieren an der Plasmamembran mit Ras Proteinen (Paz *et al.*, 2001; Elad-Sfadia *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation von K-Ras(G12V) mit dem von Frau Dr. Monika Unger neu identifizierten Interaktionspartner Galektin-8 näher untersucht. Immunoblotanalysen nach einer subzellulären Fraktionierung von EGFP- und EGFP-K-Ras(G12V)-exprimierenden PANC-1 Zellen belegen eine Lokalisation des ektopen EGFP-K-Ras(G12V) und des endogenen Galektin-8 in den partikulären, membranhaltigen Fraktionen. Nur kleine Mengen des endogenen Galektin-8 konnten auch in den löslichen, zytosolischen Fraktionen detektiert werden (Abb. 4.4). Demnach wären beide Interaktionspartner an Membranen lokalisiert. Die zytosolische Lokalisierung von Fluoreszenzproteinen wie z.B. GFP wurde u.a. von Nakahara beschrieben (Nakahara *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnten ECFP und mCherry erwartungsgemäß im Zytoplasma detektiert werden, doch weder ECFP-Galektin-8 long oder short noch mCherry-Galektin-8 long konnten in PANC-1 Zellen, im Vergleich zum endogenen Galektin-8, deutlich an der Plasmamembran detektiert werden. ECFP-Galektin-8 und mCherry-Galektin-8 wurde in der gesamten Zelle detektiert (Abb. 4.2 und 4.5). Stabil exprimiertes EGFP-K-Ras(G12V) wurde in PANC-1 Zellen fluoreszenzmikroskopisch an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 4.6). EGFP und mCherry zeigten erwartungsgemäß eine zytosolische Lokalisation. Auch in diesen Zellen wurde mCherry-Galektin-8 long in der gesamten Zelle detektiert, was die Literaturangaben der

Galektin Expression in diversen Zellkompartimenten, wie z.B. Zytoplasma, ER, Plasmamembran oder Nukleus stützt (Cooper und Barondes, 1990). Galektine werden an freien Polysomen im Zytoplasma synthetisiert und akkumulieren dort bis zu ihrer Sekretion (Cleves *et al.*, 1996). Sollten PANC-1 Zellen ebenfalls Galektin-8 sekretieren, würde es im Zytoplasma akkumulieren und eventuell eine Trennung der Proteine in die oben erwähnten einzelnen Kompartimente nicht mehr erlauben.

Eine weitere Ursache für die nicht eindeutige Detektion von ECFP-Galektin-8 bzw. mCherry-Galektin-8 an der Plasmamembran könnte die Position der Fluoreszenz-*tags* sein. In dieser Arbeit wurden die *tags* mit den N-Termini der Galektin-8 Proteine fusioniert. Auch andere Arbeitsgruppen generierten Galektine mit N-terminalen *tags* wie beispielsweise ECFP-Galektin-3, YFP-Galektin-8 oder mCherry-Galektin-8 Proteine. All diese Fusionsproteine waren funktionell aktiv (Balan *et al.*, 2010; Thurston *et al.*, 2012). Diese Publikationen würden die Wahl der Fusionierung am Galektin-8 N-Terminus unterstützen. Eine weitere Arbeitsgruppe hingegen verwendete Galektin-3 mit einem C-terminalen EGFP-*tag* (Galektin-3-EGFP) und konnte durch mikroskopische Analysen den Import von Galektin-3 in den Nukleus untersuchen (Davidson *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass der Galektin-3 N-Terminus für die Lokalisierung im Nukleus verantwortlich ist (Gong *et al.*, 1999). Falls der Galektin-8 N-Terminus eine Rolle bei der Lokalisierung des Proteins an der Plasmamembran spielen sollte, könnte ein N-terminaler *tag* dies verhindern. Des Weiteren könnte die Lokalisierung von ECFP-Galektin-8 bzw. Galektin-8-ECFP mittels Konfokalmikroskopie oder anderen hoch-auflösenden Mikroskopen analysiert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen die unterschiedlichen und komplexen Funktionen von Galektin-8 als Regulator der K-Ras-vermittelten Signaltransduktion und Migration in der pankreatischen Adenokarzinomzelllinie PANC-1. Weiter tragen sie zum Verständnis der Bindung bzw. Interaktion von K-Ras an Galektin-8 bei.

6. Zusammenfassung/ Abstract

Aktivierende, onkogene Punktmutationen in *ras* Genen treten in 30 % aller humanen Tumoren auf. *K-ras* weist die höchste Mutationsrate auf und betrifft 90 % aller Pankreaskarzinome. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen K-Ras und Galektin-8, einem in der Arbeitsgruppe identifizierten Interaktionspartner, sowie der Einfluss von Galektin-8 auf die Aktivität der Kinasen Akt und ERK und auf die K-Ras-induzierte Migration untersucht.

In HEK293 Zellen konnte Galektin-8 mit EGFP-K-Ras(G12V) und EGFP-K-Ras(S17N) nach ektopter Expression der Proteine ko-immunpräzipitiert werden. Dies zeigt, dass K-Ras unabhängig seines Aktivierungszustandes mit Galektin-8 interagiert. Das Fehlen der posttranslationalen Farnesylierung von K-Ras hingegen führte dazu, dass Galektin-8 nicht im Komplex mit K-Ras ko-immunpräzipitiert wurde. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Farnesylgruppe für die Interaktion von K-Ras mit Galektin-8 essentiell ist. Daraus ergab sich die Frage, welche strukturellen Eigenschaften in Galektin-8 für die Bindung der Farnesylgruppe verantwortlich sein könnten. Durch *in silico* Analysen der Sekundärstrukturen der Galektin-8 N- bzw. C-terminalen CRD wurden Bereiche identifiziert, die hydrophobe Bindungstaschen für die Farnesylgruppe des K-Ras ausbilden könnten. Diese Taschen beinhalten 6 Aminosäuren, von denen bekannt ist, dass sie für die Interaktion der Farnesylgruppe des H-Ras mit der hydrophoben Tasche von Galektin-1 von Bedeutung sind. Neben der Interaktion mit K-Ras wurde die Regulierung des Galektin-8 Proteingehalts in PANC-1 Zellen analysiert. Durch die Inkubation der Zellen mit pharmakologischen Inhibitoren, die die Phosphorylierung der Kinasen MEK1, MEK2, PI3K, Akt und mTOR oder die katalytische Aktivität von p38 hemmten konnte gezeigt werden, dass die Expression von Galektin-8 durch den MEK/ERK- und mTOR-Signaltransduktionsweg reguliert wird.

In der Transformation verschiedener Zelltypen und Tumorgenese spielen die Ras-abhängigen Signaltransduktionswege Raf/MEK/ERK und PI3K/Akt eine bedeutende Rolle. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Galektin-8 auf die Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2 in PANC-1 Pankreaskarzinomzellen untersucht. Die siRNA-vermittelte Inhibierung der Galektin-8 Expression resultierte in einer gesteigerten Phosphorylierung von Akt2 und ERK1/2, während eine reduzierte Galektin-3 Expression die Phosphorylierung von ERK1/2 erhöhte, aber keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt2 hatte. Die stabile Expression von EGFP-K-Ras(G12V) verstärkte die Phosphorylierung von Akt2 in Zellen, die mit siRNAs gegen Galektin-8 und -3 transfiziert worden waren. Die Überexpression von

ECFP-Galektin-8 führte zu keiner veränderten EGFP-K-Ras(G12V)-induzierten HA-ERK2 Phosphorylierung.

In den Lungenadenokarzinomzelllinien A549 und A427 führte eine verminderte Galektin-8 Expression durch siRNAs zu keiner Änderung der Phosphorylierung von Akt1 und ERK1/2. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass in diesen Zellen weder der PI3K/Akt- noch der Raf/MEK/ERK-Signalweg durch Galektin-8 reguliert wird.

Um den Einfluss von Galektin-8 auf die Migration von PANC-1 Zellen zu untersuchen, wurden *Wounding-Assays* durchgeführt. Zellen, die zuvor mit Gal-8 siRNAs transfiziert worden waren, zeigten einen um 20-25 % verringerten Wundverschluss verglichen mit Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert worden waren.

In Immunoblotanalysen nach subzellulären Fraktionierungsexperimenten von PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) Zellen wurden endogenes Galektin-8 und Ras sowie EGFP-K-Ras(G12V) in der partikulären Fraktion detektiert. Die Membranlokalisierung konnte fluoreszenzmikroskopisch für EGFP-K-Ras(G12V), nicht aber für ektopes ECFP-Galektin-8 bestätigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Relevanz der Farnesylgruppe für die Interaktion zwischen K-Ras und Galektin-8 sowie die Auswirkungen von Galektin-8 als Regulator der K-Ras-induzierte Phosphorylierung von Akt und ERK als auch auf die Migration von PANC-1 Zellen beschrieben werden.

Abstract

Activating, oncogenic point mutations in *ras* genes occur in 30 % of all human tumours. A K-*ras* mutation was found in 90 % of all pancreatic carcinomas. In the present study the interaction between K-Ras and Galectin-8, an in our group identified interacting partner, as well as the influence of Galectin-8 on the activity of the kinases Akt and ERK and the K-Ras-induced migration was analysed.

In HEK293 cells Galectin-8 was co-immunoprecipitated with ectopically expressed EGFP-K-Ras(G12V) and EGFP-K-Ras(S17N). These experiments revealed that K-Ras interacted with Galectin-8 fully independent of its activation state. In contrast, the lack of the posttranslational farnesylation of K-Ras showed that Galectin-8 was not co-immunoprecipitated in a complex with K-Ras. This study demonstrated the importance of the farnesylation for the interaction between K-Ras and Galectin-8 and raised the question what structural characteristics in Galectin-8 are responsible for the interaction. In *in silico* analyses of the secondary structure of the Galectin-8 N- and C-terminal CRD respectively, structures were identified that may form hydrophobic pockets in which the farnesyl group could bind. These pockets comprise 6 amino acids known to be relevant for the interaction between the H-Ras farnesyl group and the hydrophobic pocket of Galectin-1.

Additionally the regulation of the Galectin-8 protein content in PANC-1 cells was investigated. The cells were incubated with pharmacological inhibitors that prevent the phosphorylation of the kinases MEK1, MEK2, PI3K, Akt, and mTOR or the catalytic activity of p38. These results lead to the conclusion that the expression of Galectin-8 is regulated through MEK/ERK and mTOR.

The Ras-dependent signal transduction pathways Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt play an important role during transformation of different cell types and tumourigenesis. In the present study the influence of Galectin-8 on the phosphorylation of Akt2 and ERK1/2 in PANC-1 cells was examined. The siRNA-induced inhibition of the Galectin-8 expression resulted in an increased phosphorylation of Akt2 and ERK1/2 whereas a reduced Galectin-3 expression increased the phosphorylation of ERK1/2 but had no influence on the phosphorylation of Akt2. Stably expressed EGFP-K-Ras(G12V) further increased the phosphorylation of Akt2 in cells transfected with siRNAs against Galectin-8 and -3. Overexpression of Galectin-8 had no impact on the EGFP-K-Ras(G12V)-induced phosphorylation of HA-ERK2.

A siRNA-mediated reduced Galectin-8 expression in A549 and A427 lung adenocarcinomas cell lines showed no alterations in the phosphorylation of Akt1 and ERK1/2. These

experiments suggested that neither the PI3K/Akt nor the Raf/MEK/ERK pathway is regulated by Galectin-8 in these cell lines.

Wounding assays were performed to investigate the influence of Galectin-8 on the migration of PANC-1 cells. Cells transfected with siRNAs against Galectin-8 exhibited a 20-25 % decelerated wound closure compared to cells transfected with control siRNA.

Immunoblot analyses after subcellular fractionation of PANC-1/EGFP-K-Ras(G12V) cells demonstrated a particulate localisation of Galectin-8, Ras and, EGFP-K-Ras(G12V). By using fluorescence microscopy the membrane localisation of EGFP-K-Ras(G12V) but not ECFP-Galectin-8 was confirmed.

In the present study the relevance of the farnesyl group for the interaction between K-Ras and Galectin-8 was demonstrated. Furthermore the impact of Galectin-8 as a regulator of the K-Ras-induced phosphorylation of Akt and ERK as well as the influence on migration of PANC-1 cells were described.

7. Literaturverzeichnis

- Alessi D.R., Cohen P. (1998): Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 55-62.
- Andjelkovic M., Alessi D.R., Meier R., Fernandez A., Lamb N.J., Frech M., Cron P., Cohen, P., Lucocq J.M., Hemmings B.A. (1997): Role of translocation in the activation and function of protein kinase. *B. J. Biol. Chem.* **272**, 31515-31524.
- André S., Singh T., Lacal J.C., Smetana K. Jr, Gabius H.J. (2014): Rho GTPase Rac1: molecular switch within the galectin network and for N-glycan α 2,6-sialylation/O-glycan core 1 sialylation in colon cancer in vitro. *Folia Biol.* **60**, 95-107.
- Ashery U., Yizhar O., Rotblat B., Elad-Sfadia G., Barkan B., haklai R., Kloog Y. (2006): Spatiotemporal organization of ras signaling rasoosomes and the galectin switch. *Cell. Mol. Neurobiol.* **26**, 471-495.
- Balan V., Nangia-Makker P., Jung Y.S., Wang Y., Raz A. (2010): Galectin-3: A novel substrate for c-Abl kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1803**, 1198-1205.
- Barbacid M. (1987): Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779-827.
- Barkan B., Cox A.D, Kloog Y. (2013): Ras inhibition boosts galectin-7 at the expense of galectin-1 to sensitize cells to apoptosis. *Oncotarget* **4**, 256-268.
- Barondes S.H., Castronovo V., Cooper D.N.W., Cummings R.D., Drickamer K., Felzi T., Gitt M.A., Hirabayashi J., Hughes C., Kasai K.I., Leffler H., Liu F.T., Lotan R., Mercurio A.M., Monsigny M., Pillai S., Poirer F., Raz A., Rigby P.W.J., Rini J.M., Wang J.L. (1994a): Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* **76**, 597-598.
- Barondes S.H., Cooper D.N., Gitt M.A., Leffler H. (1994b): Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* **269**, 20807-20810.
- Beau-Faller M., Legrain M., Voegeli A.C., Guérin E., Lavaux T., Ruppert A.M., Neuville A., Massard G., Wihlm J.M., Quoix E., Oudet P., Gaub M.P. (2009): Detection of K-Ras mutations in tumour samples of patients with non-small cell lung cancer using PNA-mediated PCR clamping. *Br. J. Cancer* **100**, 985-992.
- Belanis L., Plowman S.J., Rotblat B., Hancock J.F., Kloog Y. (2008): Galectin-1 is a novel structural component and a major regulator of h-ras nanoclusters. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1404-1414.
- Bellacosa A., Testa J.R., Moore R., Larue L. (2004): A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. A portrait of Akt kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer. Biol. Ther.* **3**, 268-275.
- Berberat P.O., Friess H., Wang L., Zhu Z., Bley T., Frigeri L., Zimmermann A., Büchler M.W. (2001): Comparative analysis of galectins in primary tumors and tumor metastasis in human pancreatic cancer. *J. Histochem. Cytochem.* **49**, 539-549.
- Beyer W. (1991): Lehrbuch der organischen Chemie, S. Hirzel Verlag Stuttgart, 22. Auflage
- Birnboim H.C., Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bleeker F.E., Felicioni L., Buttitta F., Lamba S., Cardone L., Rodolfo M., Scarpa A., Leenstra S., Frattini M., Barbareschi M., Grammastro M.D., Sciarrotta M.G., Zanon C., Marchetti A., Bardelli A. (2008): AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene* **27**, 5648-5650.
- Bos J.L. (1989): *ras* oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* **49**, 4682-4689.

- Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F. (1990): The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132.
- Bräse S., Bülle J., Hüttermann A. (2008): Organische und bioorganische Chemie. *Wiley-VCH*, Weinheim.
- Brazil D.P., Hemmings B.A. (2001): Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 657-664.
- Brewer C.F., Miceli M.C., Baum L.G. (2002): Clusters, bundles, arrays and lattices: Novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 616-623.
- Brondello J.M., Pouyssegur J., McKenzie F.R. (1999): Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* **286**, 2514-2517.
- Brondello M., Brunet A., Pouyssegur J., McKenzie F.R. (1997): The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *J. Biol. Chem.* **272**, 1368-1376.
- Burgering B.M., Coffey P.J. (1995): Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* **376**, 599-602.
- Camby I., Le Mercier M., Lefranc F., Kiss R. (2006): Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* **16**, 137R-157R.
- Campion C.G., Labrie M., Grosset A.A., St-Pierre Y. (2014): The CCAAT/enhancer-binding protein beta-2 isoform (CEBP β -2) upregulates galectin-7 expression in human breast cancer cells. *PLoS One* **9**, e95087.
- Camps M., Nichols A., Gillieron C., Antonsson B., Muda M., Chabert C., Boschert U., Arkinstall S. (1998): Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* **280**, 1262-1265.
- Canesin G., Gonzalez-Peramato P., Palou J., Urrutia M., Cordon-Cardo C., Sánchez-Carbayo M. (2010): Galectin-3 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Tumour Biol.* **31**, 277-285.
- Carlsson S., Oberg C.T., Carlsson M.C., Sundin A., Nilsson U.J., Smith D., Cummings R.D., Almkvist J., Karlsson A., Leffler H. (2007): Affinity of galectin-8 and its carbohydrate recognition domains for ligands in solution and at the cell surface. *Glycobiology* **17**, 663-676.
- Carracedo A., Ma L., Teruya-Feldstein J., Rojo F., Salmena L., Alimonti A., Egia A., Sasaki A.T., Thomas G., Kozma S.C., Papa A., Nardella C., Cantley L.C., Baselga J., Pandolfi P.P. (2008): Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* **118**, 3065-3074.
- Casar B., Pinto A., Crespo P. (2009): ERK dimers and scaffold proteins: unexpected partners for a forgotten (cytoplasmic) task. *Cell Cycle* **8**, 1007-1013.
- Castronovo V., van den Brûle F.A., Jackers P., Clausse N., Liu F.T., Gillet C., Sobel M.E. (1996): Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J. Pathol.* **179**, 43-48.
- Chang Y.S., Yeh K.T., Hsu N.C., Lin S.H., Chang T.J., Chang J.G. (2009): Detection of N-, H-, and KRAS codons 12, 13, and 61 mutations with universal RAS primer multiplex PCR and N-, H-, and KRAS-specific primer extension. *Clin. Biochem.* **43**, 296-301.
- Chappell W.H., Steelman L.S., Long J.M., Kempf R.C., Abrams S.L., Franklin R.A., Bäsecke J., Stivala F., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Mazzarino M.C., Nicoletti F., Libra M.,

- Maksimovic-Ivanic D., Mijatovic S., Montalto G., Cervello M., Laidler P., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Evangelisti C., Cocco L., Martelli A.M., McCubrey J.A. (2011): Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* **2**, 135-64.
- Chen W.S., Xu P.Z., Gottlob K., Chen M.L., Sokol K., Shiyanova T., Roninson I., Weng W., Suzuki R., Tobe K., Kadowaki T., Hay N. (2001): Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes & Development* **15**, 2203-2208.
- Chen Z., Otto J. C., Bergo M. O., Young S. G., Casey, P. J. (2000): The C-terminal polylysine region and methylation of K-ras are critical for the interaction between K-ras and microtubules. *J. Biol. Chem.* **275**, 41251–41257.
- Cho H., Thorvaldsen J.L., Chu Q., Feng F., Birnbaum M.J. (2001): Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 38349-38352.
- Choy E., Chiu V.K., Silletti J., Feoktistov M., Morimoto T., Michaelson D., Ivanov I.E., Philips M.R. (1999): Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* **98**, 69–80.
- Chung L.Y., Tang S.J., Sun G.H., Chou T.Y., Yeh T.S., Yu S.L., Sun K.H. (2012): Galectin-1 promotes lung cancer progression and chemoresistance by upregulating p38 MAPK, ERK, and cyclooxygenase-2. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4037-4047.
- Clark A.R., Toker A. (2014): Signalling specificity in the Akt pathway in breast cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1349-1355.
- Cleves A.E., Cooper D.N., Barondes S.H., Kelly R.B. (1996): A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **133**, 1017-2106.
- Colicelli J. (2004): Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* **250**, RE 13.
- Cooper D.N., Barondes S.H. (1990): Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J. Cell Biol.* **110**, 1681-1691.
- Cooper D.N.W. (2002): Galectinomics: finding the themes in complexity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1572**, 209-231.
- Costes S., Broca C., Bertrand G., Lajoix A.D., Bataille D., Bockaert J., Dalle S. (2006): ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* **55**, 2220-2230.
- Cox A.D., Der C.J. (2010): Ras history: The saga continues. *Small GTPases* **1**, 2-27.
- Cummings R.D., Liu F.T. (2009): Galectins. *Essentials of Glycobiology*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 33.
- Dancer J.Y., Truong L.D., Zhai Q., Shen S.S. (2010): Expression of Galectin-3 in renal neoplasms: a diagnostic, possible prognostic marker. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **134**, 90-94.
- Davidson P.J., Li S.Y., Lohse A.G., Vandergaast R., Verde E., Pearson A., Patterson R.J., Wang J.L., Arnoys E.J. (2006): Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. I. Conditions and signals for nuclear import. *Glycobiology* **16**, 602-611.
- Dhillon A.S., Hagan S., Rath O., Kolch W. (2007): MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**, 3279–3290.

- Dhillon S., Meikle S., Yazici Z., Eulitz M., and Kolch W. (2002): Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J.* **21**, 64-71.
- Diaz-Meco M.T., Lozano J., Municio M.M., Berra E., Frutos S., Sanz L., Moscat J. (1994): Evidence for the *in vitro* and *in vivo* interaction of Ras with protein-kinase C zeta. *J. Biol. Chem.* **269**, 31706-31710.
- Diskin S., Chen W.S., Cao Z., Gyawali S., Gong H., Soza A., González A., Panjwani N. (2012): Galectin-8 promotes cytoskeletal rearrangement in trabecular meshwork cells through activation of Rho signaling. *PLoS One* **7**, e44400.
- Downward J. (1998): Signal transduction. New exchange, new target. *Nature* **396**, 416-417.
- Downward J. (2003): Role of receptor tyrosine kinases in G-protein-coupled receptor regulation of Ras: transactivation or parallel pathways? *Biochem. J.* **376**, e9-10.
- Downward J. (2004): PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 177-182.
- Dreissigacker U., Mueller M.S., Unger M., Siegert P., Genze F., Gierschik P., Giehl K. (2005): Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. *Cell Signal.* **18**, 1156-1168.
- Dumic J., Dabelic S., Flögel M. (2006): Galectin-3: an open-ended story. *Biochim. Biophys. Acta.* **1760**, 616-635.
- Eisenberg S., Shvartsman D.E., Ehrlich M., Henis Y.I. (2006): Clustering of raft-associated proteins in the external membrane leaflet modulates internal leaflet H-Ras diffusion and signaling. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7190-7200.
- Elad-Sfadia G., Haklai R., Balan E., Kloog Y. (2004): Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 34922-34930.
- Elad-Sfadia G., Haklai R., Ballan E., Gabius H. J., Kloog, Y. (2002): Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **277**, 37169-37175.
- Elola M.T., Wolfenstein-Todel C., Troncoso M.F., Vasta G.R., Rabinovich G.A. (2007): Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1679-1700.
- Farmer J.L., Burghardt R.C., Jousan F.D., Hansen P.J., Bazer F.W., Spencer T.E. (2008): Galectin 15 (LGALS15) functions in trophectoderm migration and attachment. *Federation of American Societies of Experimental Biology J.* **22**, 548-560.
- Fehrenbacher N., Bar-Sagi D., Philips M. (2009): Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Mol. Oncol.* **3**, 297-307.
- Fensterer H., Giehl K., Buchholz M., Ellenrieder V., Buck A., Kestler HA., Adler G., Gierschik P., Gress T.M. (2004): Expression profiling of the influence of RAS mutants on the TGFβ1-induced phenotype of the cancer cell line PANC-1. *Genes Chromosomes Cancer* **39**, 224-235.
- Ferro R., Falasca M. (2014): Emerging role of the KRAS-PDK1 axis in pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* **20**, 10752-10757.
- Franke T.F., Kaplan D.R., Cantley L.C., Toker A. (1997): Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**, 665-668.

- Franklin W.A., Haney J., Sugita M., Bemis L., Jimeno A., Messersmith W.A. (2010): KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. *J. Mol. Diagn.* **12**, 43-50.
- Galli S., Jahn O., Hitt R., Hesse D., Opitz L., Plessmann U., Urlaub H., Poderoso J.J., Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. (2009): A new paradigm for MAPK: structural interactions of hERK1 with mitochondria in HeLa cells. *PLoS ONE* **4**, e7541.
- Garofalo R.S., Orena S.J., Rafidi K., Torchia A.J., Stock J.L., Hildebrandt A.L., Coskran T., Black S.C., Brees D.J., Wicks J.R., McNeish J.D., Coleman K.G. (2003): Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J. Clin. Invest.* **112**, 197-208.
- Gautschi O., Huegli B., Ziegler A., Gugger M., Heighway J., Ratschiller D., Mack P.C., Gumerlock P.H., Kung H.J., Stahel R.A., Gandara D.R., Betticher D.C. (2007): Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients. *Cancer Lett.* **254**, 265-273.
- Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H., Parks W.P. (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1417-1423.
- Giehl K. (2005): Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol. Chem.* **386**, 193-205.
- Giehl K., Skripczynski B., Mansard A., Menke A., Gierschik P. (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**, 2930-2942.
- Goldberg L., Haklai R., Bauer V., Heiss A., Kloog Y. (2009): New derivatives of farnesylthiosalicylic acid (salirasib) for cancer treatment: farnesylthiosalicylamide inhibits tumor growth in nude mice models. *J. Med. Chem.* **52**, 197-205.
- Gong H.C., Honjo Y., Nangia-Makker P., Hogan V., Mazurak N., Bresalier R.S., Raz A. (1999): The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res.* **59**, 6239-6245.
- Gonzalez-Garcia A., Pritchard C.A., Paterson H.F., Mavria G., Stamp G., Marshall C.J. (2005): RalGDS is required for tumor transformation in a model of skin carcinogenesis. *Cancer Cell* **7**, 219-226.
- Goodsell D.S. (1999): The molecular perspective: the ras oncogene. *Stem Cells* **17**, 235-236.
- Grabinski N., Möllmann K., Milde-Langosch K., Müller V., Schumacher U., Brandt B., Pantel K., Jücker M. (2014): AKT3 regulates ErbB2, ErbB3 and estrogen receptor α expression and contributes to endocrine therapy resistance of ErbB2(+) breast tumor cells from Balb-neuT mice. *Cell Signal.* **26**, 1021-1029.
- Graham F.L., Smiley J., Russel W.C., Nairn R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74.
- Haas-Kogan D., Shalev N., Wong M., Mills G., Yount G., Stokoe D. (1998): Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr. Biol.* **8**, 1195-1198.
- Hadari Y.R., Arbel-Goren R., Levy Y., Amsterdam A., Alon R., Zakut R., Zick Y. (2000): Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J Cell Sci* **113**, 2385-2397.

- Hadari Y.R., Paz K., Dekel R., Mestrovic T., Accili D., Zick Y. (1995): Galectin-8. A new rat lectin, related to galectin-4. *J. Biol. Chem.* **270**, 3447–3453.
- Hageman C. and Rapp U.R. (1999): Isotopic-specific functions of Raf kinases. *Exp. Cell Res.* **253**, 34-46.
- Hall A. (1990): The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**, 635-640.
- Hallberg B., Raiter S.I., Downward J. (1994): Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 3913-3916.
- Han J., Luby-Phelps K., Das B., Shu X., Xia Y., Mostseller R.D., Krishna U.M., Falck J.R., White M.A., Broeck D. (1998): Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* **279**, 558-560.
- Han L., Collicelli J (1995): A human protein selected for interference with Ras function interacts directly with Ras and competes with Raf1. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1318-1323.
- Hancock J.F. (2003): Ras proteins: different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 373-384.
- Hancock J.F., Cadwallader K., Paterson H., Marshall C.J. (1991): A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO J.* **10**, 4033-4039.
- 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**, 133-139.
- Hann A., Gruner A., Chen Y., Gress T.M., Buchholz M. (2011): Comprehensive analysis of cellular galectin-3 reveals no consistent oncogenic function in pancreatic cancer cells. *PLoS One* **6**, e20859.
- Hariharan D., Saied A., Kocher H.M. (2008): Analysis of mortality rates for pancreatic cancer across the world. *HPB (Oxford)* **10**, 58-62.
- He J., Baum L.G. (2006): Galectin interactions with extracellular matrix and effects on cellular function. *Methods Enzymol* **417**, 247–256.
- Henno S., Brichory F., Langanay T., Desrues B., Bidon N., Delaval P., Ramee M.P., Dazord L., Caulet-Maugendre S. (2002): Expression of Po66-CBP, a galectin-8, in different types of primary and secondary broncho-pulmonary tumors. *Oncol Report* **9**, 177–180.
- Hernandez J.D., Baum L.G. (2002): Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology* **12**, 127R–136R.
- Herrmann C. (2003): Ras-effector interactions: after one decade. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 122-129.
- Hidalgo L., Repiso A., Romero M., Navajas J., Sánchez-Simón R., Gómez-Rodríguez R., Carrobbles J.M. (2010): Obstructive jaundice as a complication of a peptic duodenal ulcer mimicking pancreatic cancer. *Endoscopy* **42 Suppl 2**, E294-295.
- Hittelet A., Legendre H., Nagy N., Bronckart Y., Pector J.C., Salmon I., Yeaton P., Gabius H.J., Kiss R., Camby I. (2003): Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. *Int. J. Cancer* **103**, 370–379.
- 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**, 345–356.
- Hsu D.K., Dowling C.A., Jeng K.C., Chen J.T., Yang R.Y., Liu F.T. (1999): Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **81**, 519-526.

- Hsu Y.L., Wu C.Y., Hung J.Y., Lin Y.S., Huang M.S., Kuo P.L. (2013): Galectin-1 promotes lung cancer tumor metastasis by potentiating integrin $\alpha\beta 4$ and Notch1/Jagged2 signaling pathway. *Carcinogenesis* **34**, 1370-1381.
- Hughes R.C. (1999): Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta*. **1473**, 172-185.
- Ideo H., Matsuzaka T., Nonaka T., Seko A., Yamashita K. (2011): Galectin-8-Ndomain recognition mechanism for sialylated and sulfated glycans. *J. Biol. Chem.* **286**, 11346–11355.
- Idikio H. (1998): Galectin-3 expression in human breast carcinoma: correlation with cancer histologic grade. *Int. J. Oncol.* **12**, 1287-1290.
- Ikediohi O.N., Davies H., Bignell G., Edkins S., Stevens C., O'Meara S., Santarius T., Avis T., Barthorpe S., Brackenbury L., Buck G., Butler A., Clements J., Cole J., Dicks E., Forbes S., Gray K., Halliday K., Harrison R., Hills K., Hinton J., Hunter C., Jenkinson A., Jones D., Kosmidou V., Lugg R., Menzies A., Mironenko T., Parker A., Perry J., Raine K., Richardson D., Shepherd R., Small A., Smith R., Solomon H., Stephens P., Teague J., Tofts C., Varian J., Webb T., West S., Widaa S., Yates A., Reinhold W., Weinstein J.N., Stratton M.R., Futreal P.A., Wooster R. (2006): Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 2606-2612.
- Illarregui J.M., Rabinovich G.A. (2010): Tolerogenic dendritic cells in the control of autoimmune neuroinflammation: an emerging role of protein-glycan interactions. *Neuroimmunomodulation* **17**, 157-160.
- Irie H.Y., Pearline R.V., Grueneberg D., Hsia M., Ravichandran P., Kothari N., Natesan S., Brugge J.S. (2005): Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* **171**, 1023-1034.
- Jaumot M., Yan J., Clyde-Smith J., Sluimer, J., Hancock J. F. (2002): The linker domain of the Ha-Ras hypervariable region regulates interactions with exchange factors, Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **277**, 272–278.
- Karnoub A.E., Weinberg R.A. (2008): Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 517-531.
- Keyse S.M. (1998): Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin Cell Dev. Biol.* **9**, 143-152.
- Khalid A. (2009): Differentiating neoplastic from benign lesions of the pancreas: translational techniques. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, S55-58.
- Khan K.H., Yap T.A., Yan L., Cunningham D. (2013): Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer. *Chin. J. Cancer.* **32**, 253-265.
- Khosravi-Far R., Campbell S., Rossman K.L., Der C.J. (1998): Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv. Cancer Res.* **72**, 57-107.
- Kim B.W., Hong S.B., Kim J.H., Kwon do H., Song H.K. (2013): Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nat. Commun.* **4**, 1613.
- Kim E.K., Choi E.J. (2010): Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 396–405.

- Kolch W. (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* **351**, 289-305.
- Koolmann J., Rhöm K.H. (1998): Taschenatlas der Biochemie, 2. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, 76-77.
- Kopitz J., von Reitzenstein C., Andre S., Kaltner H., Uhl J., Ehemann V., Cantz M., Gabius H.J. (2001): Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. *J. Biol. Chem.* **276**, 35917–35923.
- Krontiris T., Cooper G.M. (1981): Transforming activity in human tumor DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1181-1184.
- Kumar S., Frank M., Schwartz-Albiez R. (2013): Understanding the specificity of human Galectin-8C domain interactions with its glycan ligands based on molecular dynamics simulations. *PLoS One* **8**, e59761.
- Kumar S., Liang M.S., Adams J.L., Lee J.C. (1999): Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 825-831.
- Kuriyama M., Harada N., Kuroda S., Yamamotu T., Nakafuku M., Iwamatsu A., Yamamoto D., Prasad R., Croce C., Canaani E., Kaibuchi K. (1995): Identification of AF-6 and canoe as putative targets for Ras. *J. Biol. Chem.* **271**, 607-610.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-687.
- Lahm H., Andre S., Hoeflich A., Kaltner H., Siebert H.-C., Sordat B., von der Leith C.-W., Wolf E., Gabius H.-J. (2004): Tumor galectinology: Insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj. J.* **20**, 227-238.
- Le Mercier M., Mathieu V., Haibe-Kains B., Bontempi G., Mijatovic T., Decaestecker C., Kiss R., Lefranc F. (2008): Knocking down galectin 1 in human hs683 glioblastoma cells impairs both angiogenesis and endoplasmic reticulum stress responses. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **67**, 456–469.
- Lee J.W., Song S.Y., Choi J.J., Choi C.H., Kim T.J., Kim J., Lee J.H., Kim B.G., Bae D.S. (2006): Decreased galectin-3 expression during the progression of cervical neoplasia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **132**, 241-247.
- Lee K.S., Hong S.H., Bae S.C. (2002): Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene* **21**, 7156-7163.
- Leffler H. (2001): Galectins structure and function—a synopsis. *Results Probl. Cell Differ.* **33**, 57–83.
- Leffler H., Carlsson S., Hedlund M., Qian Y., Poirier F. (2004): Introduction to galectins. *Glycoconj. J.* **19**, 433–440.
- Levy Y., Arbel-Goren R., Hadari Y.R., Eshhar S., Ronen D., Elhanany E., Geiger B., Zick Y. (2001): Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J Biol Chem* **17**, 31285–31295.
- Levy Y., Auslender S., Eisenstein M., Vidavski R.R., Ronen D., Bershadsky A.D., Zick Y. (2006): It depends on the hinge: a structure-functional analysis of galectin-8, a tandem-repeat type lectin. *Glycobiology* **16**, 463-476.

- Lieber M., Smith B., Szakal A., Nelson-Rees W., Todaro G. (1976): A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* **17**, 62-70.
- Lin G., Fuji R.N., Yang W., Cerione R.A. (2003): RhoGDI is required for Cdc42-mediated cellular transformation. *Curr. Biol.* **13**, 1469-1479.
- Linder M.E., Deschenes R.J. (2007): Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 74-84.
- Liu F.T., Rabinovich G.A. (2005): Galectins as modulators of tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.* **5**, 29-41.
- Lu Z., Hu L., Evers S., Chen J., Shen Y. (2004): Differential expression profiling of human pancreatic adenocarcinoma and healthy pancreatic tissue. *Proteomics* **4**, 3975-3988.
- Luo J., Manning B.D., Cantley L.C. (2003): Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. *Cancer Cell* **4**, 257-262.
- Ma J., Siegel R., Jemal A. (2013): Pancreatic cancer death rates by race among US men and women, 1970-2009. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1694-1700.
- Malumbres M., Barbacid M. (2003): RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 459-465.
- Marcinkowska E., Garay E., Gocek E., Chrobak A., Wang X., Studzinski G.P. (2006): Regulation of C/EBPbeta isoforms by MAPK pathways in HL60 cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Exp. Cell Res.* **312**, 2054-2065.
- Martin K.A., Blenis J. (2002): Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways. *Adv. Cancer Res.* **86**, 1-39.
- Mascaux C., Iannino N., Martin B., Paesmans M., Berghmans T., Dusart M., Haller A., Lothaire P., Meert A.P., Noel S., Lafitte J.J., Sculier J.P. (2005): The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br. J. Cancer.* **92**, 131-139.
- Matsuda Y., Yamagiwa Y., Fukushima K., Ueno Y., Shimosegawa T. (2008): Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.* **38**, 1098-1111.
- Meier R., Alessi D.R., Cron P., Andjelkovic M., Hemmings, B.A. (1997): Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B β . *J. Biol. Chem.* **272**, 30491-30497.
- Merlin J., Stechy L., de Beaucé S., Monté D., Leteurtre E., von Seuning I, Huet G., Pigny P. (2011): Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells. *Oncogene* **30**, 2514-2525.
- Mitchell C.E., Belinsky S.A., Lechner J.F. (1995): Detection and quantitation of mutant K-ras codon 12 restriction fragments by capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* **224**, 148-153.
- Montagut C., Settleman J. (2009): Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett.* **283**, 125-134.

- Moore P.S., Sipos B., Orlandini S., Sorio C., Real F.X., Lemoine N.R., Gress T., Bassi C., Klöppel G., Kalthoff H., Ungefroren H., Löhr M., Scarpa A. (2001): Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch.* **439**, 798-802.
- Morrison D. K., Cutler R. E. (1997): The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 174–179.
- Nagy N., Bronckart Y., Camby I., Legendre H., Lahm H., Kaltner H., Hadari Y., Van Ham P., Yeaton P., Pector J.C., Zick Y., Salmon I., Danguy A., Kiss R., Gabius H.J.(2002): Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human cancer cell migration as a suppressor, *Gut* **50**, 392–401.
- Nakahara S., Oka N., Raz A. (2005): On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* **10**, 267–275.
- Nave B.T., Ouwens M., Withers D.J., Alessi D.R., Shepherd P.R. (1999): Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem. J.* **344**, 427-431.
- Niv H., Gutman O., Kloog Y., Henis Y.I. (2002): Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells. *J. Cell. Biol.* **157**, 865–872.
- Omary M.B., Lugea A., Lowe A.W., Pandol S.J. (2007): The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J. Clin. Invest.* **117**, 50-59.
- Ostrem J.M., Peters U., Sos M.L., Wells J.A., Shokat K.M. (2013): K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* **503**, 548-551.
- Paz A., Haklai R., Elad-Sfadia G., Ballan E., Kloog, Y. (2001): Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* **20**, 7486–7493.
- Perillo N.L., Marcus M.E., Baum L.G. (1998): Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J. Mol. Med.* **76**, 402–412.
- Perillo N.L., Pace K.E., Seilhamer J.J., Baum L.G. (1995): Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* **378**, 736–739.
- Perucho M., Goldfarb M., Shimizu K., Lama C., Fogh J., Wigler M. (1981): Human tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell* **27**, 467-476.
- Peyssonaux C., Eychene A. (2001): The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell.* **93**, 53-62.
- Plotnikov A., Zehorai E., Procaccia S., Seger R. (2010): The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear Translocation. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1619-1633.
- Plowman S.J., Ariotti N., Goodall A., Parton R.G., Hancock J.F. (2008): Electrostatic interactions positively regulate K-Ras nanocluster formation and function. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4377–4385.
- Populo H., Tavares S., Faustino A., Nunes J.B., Lopes J.M., Soares P. (2013): GNAQ and BRAF mutations show differential activation of the mTOR pathway in human transformed cells. *PeerJ.* **23**, e104

- Porr A. (2010): Expression und Lokalisation von Galektin-1, Galektin-3 und Galektin-8 in Pankreaskarzinomzelllinien. Med. Dissertation, Universität Ulm.
- Pouysségur J., Volmat V., Lenormand P. (2002): Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 755-763.
- Prior I.A., Harding A., Yan J., Sluimer J., Parton R.G., Hancock J.F. (2001): GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nature Cell Biol.* **3**, 368–375.
- Prior I.A., Lewis P.D., Mattos C. (2012): A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* **72**, 2457-2467.
- Prior I.A., Muncke C., Parton R.G., Hancock J.F. (2003): Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell. Biol.* **160**, 165–170.
- Querings S., Altmüller J., Ansén S., Zander T., Seidel D., Gabler F., Peifer M., Markert E., Stemshorn K., Timmermann B., Saal B., Klose S., Ernestus K., Scheffler M., Engel-Riedel W., Stoelben E., Brambilla E., Wolf J., Nürnberg P., Thomas R.K. (2011): Benchmarking of mutation diagnostics in clinical lung cancer specimens. *PLoS One* **6**, e19601.
- Rabinovich G.A., Baum L.G., Tinari N., Paganelli R., Natoli C., Liu F.T., Iacobelli S. (2002): Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* **23**, 313–320.
- Radosavljevic G., Volarevic V., Jovanovic I., Milovanovic M., Pejnovic N., Arsenijevic N., Hsu D.K., Lukic M.L. (2012): The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol. Res.* **52**, 100-110.
- Rapp U.R., Fensterle J., Albert S., Gotz R. (2003): Raf kinases in lung tumor development. *Adv. Enzyme Regul.* **43**, 183-195.
- Rena G., Guo S., Cichy S.C., Unterman T.G., Cohen P. (1999): Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **274**, 17179-17183.
- Repasky G.A., Chenette E.J., Der C.J. (2004): Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol.* **14**, 639-647.
- Riccardo F., Arigoni M., Buson G., Zago E., Iezzi M., Longo D., Carrara M., Fiore A., Nuzzo S., Bicciato S., Nanni P., Landuzzi L., Cavallo F., Calogero R., Quaglino E. (2014): Characterization of a genetic mouse model of lung cancer: a promise to identify Non-Small Cell Lung Cancer therapeutic targets and biomarkers. *BMC Genomics* **15** doi: 10.1186/1471-2164-15-S3-S1.
- Righi A., Morandi L., Leonardi E., Farnedi A., Marucci G., Sisto A., Frank G., Faustini-Fustini M., Zoli M., Mazzatenta D., Agati R., Foschini M.P. (2013): Galectin-3 expression in pituitary adenomas as a marker of aggressive behavior. *Hum. Pathol.* **44**, 2400-2409.
- Rodriguez-Viciano P., Warne P.H., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry M.J., Watfield M.D., Downward J. (1994): Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**, 527-532.
- Rosen L.B., Ginty D.D., Weber M.J., Greenberg M.E. (1994): Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron.* **12**, 1207-1221.

- Rotblat B., Niv H., André S., Kaltner H., Gabius H.J., Kloog Y. (2004a): Galectin-1(L11A) predicted from a computed galectin-1 farnesyl-binding pocket selectively inhibits Ras-GTP. *Cancer Res.* **64**, 3112-3118.
- Rotblat B., Prior I.A., Muncke C., Parton R.G., Kloog Y., Henis Y.I., Hancock J.F. (2004b): Three separable domains regulate GTP-dependent association of H-ras with the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6799–6810.
- Rozenblum E., Schutte M., Goggins M., Hahn S.A., Panzer S., Zahurak M., Goodman S.N., Sohn T.A., Hruban R.H., Yeo C.J. (1997): Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* **57**, 1731-1734.
- Rychahou P.G., Kang J., Gulhati P., Doan H.Q., Chen L.A., Xiao S.Y., Chung D.H., Evers B.M. (2008): Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20315-20320.
- Sakaki M., Fukumori T., Fukawa T., Elsamman E., Shiirevnyamba A., Nakatsuji H., Kanayama H.O. (2010): Clinical significance of Galectin-3 in clear cell renal cell carcinoma. *J. Med. Invest.* **57**, 152-157.
- Sasaki H., Okuda K., Kawano O., Endo K., Yukiue H., Yokoyama T., Yano M., Fujii Y. (2007): Nras and Kras mutation in Japanese lung cancer patients: Genotyping analysis using LightCycler. *Oncol. Rep.* **18**, 623-628.
- Schaffert C., Pour P.M., Chaney W.G. (1998): Localization of galectin-3 in normal and diseased pancreatic tissue. *Int. J. Pancreatol.* **23**, 1-9.
- Schartl M., Gessler M., von Eckardstein A. (2009): Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. *Urban und Fischer*, 637-640.
- Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W., Wiesmuller L., Lautwein A., Schmitz F., Wittinghofer A. (1997): The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333–338.
- Scheffzek K., Stephan I., Jensen O.N., Illenberger D., Gierschik P. (2000): The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 122-126.
- Schreiber S.C., Giehl K., Kastilan C., Hasel C., Mühlenhoff M., Adler G., Wedlich D., Menke A. (2008): Polysialylated NCAM represses E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* **134**, 1555-1566.
- Schubbert S., Shannon K., Bollag G. (2007): Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 295-308.
- Schwartz-Albiez R. (2009): Inflammation and Glycosciences. In: Gabius H-J, editor. *The Sugar Code*. Weinheim: *Wiley-VCH*, 447–467.
- Shalom-Feuerstein R., Levy R., Makovski V., Kloog Y. (2008): Galectin-3 regulates RasGRP4-mediated activation of N-Ras and H-Ras. *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**, 985–993.
- Shih C., Weinberg R.A. (1982): Isolation of transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* **29**, 161-169.
- Shimizu K., Goldfarb M., Suard Y., Perucho M., Li Y., Kamata T., Feramisco J., Stavnezer E., Fogh J., Wigler M.H. (1983): Three human transforming genes are related to the viral *ras* oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **80**, 2112-2116.
- Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. (2014): Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **64**, 9–29.

- Singh A., Greninger P., Rhodes D., Koopman L., Violette S., Bardeesy N., Settleman J. (2009): A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* **15**, 489-500.
- Song S., Byrd J.C., Mazurek N., Liu K.F., Koo J.S., Bresalier R.S. (2005): Galectin-3 modulates MUC2 mucin expression in human colon cancer cells at the level of transcription via AP-1 activation. *Gastroenterology* **129**, 1581–1591.
- Song S., Ji B., Ramachandran V., Wang H., Hafley M., Logsdon C., Bresalier R.S. (2012): Overexpressed galectin-3 in pancreatic cancer induces cell proliferation and invasion by binding Ras and activating Ras signaling. *PLoS One* **7**, e42699.
- Stahle M., Veit C., Bachfischer U., Schierling K., Skripczynski B., Hall A., Gierschik P., Giehl K. (2003): Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK. *J. Cell Sci.* **116**, 3835-3846.
- Stokoe D., Stephens L.R., Copeland T., Gaffney P.R., Reese C.B., Painter G.F., Holmes A.B., McCormick F., Hawkins P.T. (1997): Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* **277**, 567-570.
- Stowell S.R., Arthur C.M., Slanina K.A., Horton J.R., Smith D.F., Cummings R.D. (2008): Dimeric Galectin-8 induces phosphatidylserine exposure in leukocytes through polylectosamine recognition by the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **283**, 20547–20559.
- Strik H.M., Kolodziej M., Oertel W., Basecke J. (2012): Glycobiology in malignant gliomas: expression and functions of galectins and possible therapeutic options. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 2299-2307.
- Takai Y., Kaibuchi K., Kikuchi A., Kawata, M. (1992): Small GTP-binding proteins. *Int. Rev. Cytol.* **133**, 187-230.
- Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. (2001): Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* **81**, 154-172.
- Tang D., Zhang J., Yuan Z., Gao J., Wang S., Ye N., Li P., Gao S., Miao Y., Wang D., Jiang K. (2014): Pancreatic satellite cells derived galectin-1 increase the progression and less survival of pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One* **9**, e90476.
- Tanti J.F., Jager J. (2009): Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stressregulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 753–762.
- Teis D., Taub N., Kurzbauer R., Hilber D., de Araujo M.E., Erlacher M., Offterdinger M., Villunger A., Geley S., Bohn G., Klein C., Hess M.W., Huber L.A. (2006): p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis. *Cell Biol.* **175**, 861–868.
- Teng D.H., Hu R., Lin H., Davis T., Iliev D., Frye C., Swedlund B., Hansen K.L., Vinson V.L., Gumpfer K.L., Ellis L., El-Naggar A., Frazier M., Jasser S., Langford L.A., Lee J., Mills G.B., Pershouse M.A., Pollack R.E., Tornos C., Troncso P., Yung W.K., Fujii G., Berson A., Bookstein R., Bolen J.B., Tavtigian S.V., Steck P.A. (1997): MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res.* **57**, 5221-5225.
- Thijssen V.L., Postel R., Brandwijk R.J., Dings R.P., Nesselova I., Satijn S., Verhofstad N., Nakabeppu Y., Baum L.G., Bakkers J., Mayo K.H., Poirier F., Griffioen A.W. (2006): Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 15975–15980.

- Thissen J., Gross J., Subramanian K., Meyer T., Casey P. (1997): Prenylation dependent association of Ki-Ras with microtubules. *J. Biol. Chem.* **272**, 30367–30370.
- Thurston T.L., Wandel M.P., von Muhlinen N., Foeglein A., Randow F. (2012): Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* **482**, 414-418.
- Tidyman W.E., Rauen K.A. (2009): The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 230–236.
- Tinari N., Kuwabara I., Huflejt M.E., Shen P.F., Iacobelli S., Liu F.T. (2001): Glycoprotein 90K/MAC-2BP interacts with galectin-1 and mediates galectin-1-induced cell aggregation. *Int. J. Cancer* **91**, 167–72.
- Torii S., Kusakabe M., Yamamoto T., Maekawa M., Nishida E. (2004): Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev. Cell* **7**, 33–44.
- Troncoso M.F., Ferragut F., Bacigalupo M.L., Cárdenas Delgado V.M., Nugnes L.G., Gentilini L., Laderach D., Wolfenstein-Todel C., Compagno D., Rabinovich G.A., Elola M.T. (2014): Galectin-8: a matricellular lectin with key roles in angiogenesis. *Glycobiology* **24**, 907-914.
- Tschopp O., Yang Z.Z., Brodbeck D., Dummler B.A., Hemmings-Mieszczak M., Watanabe T., Michaelis T., Frahm J., Hemmings B.A. (2005): Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132**, 2943-1954.
- Unger M. (2006): Charakterisierung des Einflusses von konstitutiv aktivem K-Ras(G12V) auf die Signaltransduktion und die Migration von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen. Biol. Dissertation, Universität Ulm.
- Valenzuela D.M., Groffen J. (1986): Four human carcinoma cell lines with novel mutations in position 12 of c-K-ras oncogene. *Nucleic Acids Res.* **14**, 843-852.
- van den Brule F., Califice S., Castronovo V. (2004): Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj. J.* **19**, 537-42.
- van den Brule F.A., Buicu C., Baldet M., Sobel M.E., Cooper D.N., Marschal P., Castronovo V. (1995): Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 760–767.
- van den Brule F.A., Buicu C., Berchuck A., Bast R.C., Deprez M., Liu F.T., Cooper D.N., Pieters C., Sobel M.E., Castronovo V. (1996): Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* **27**, 1185-1191.
- van den Brûle F.A., Price J., Sobel M.E., Lambotte R., Castronovo V. (1994): Inverse expression of two laminin binding proteins, 67LR and galectin-3, correlates with the invasive phenotype of trophoblastic tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 388-393.
- Vavas D., Li X., Avruch J., Zhang X.F. (1998): Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J. Biol. Chem.* **273**, 5439-5442.
- Vetter I.R., Wittinghofer A. (2001): The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-1304.
- Vivanco I., Sawyers C.L. (2002): The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 489-501.
- Vokhmyanina O.A., Rapoport E.M., Andre S., Severov V.V., Ryzhov I., Pazynina G.V., Korchagina E., Gabius H.J., Bovin N.V. (2012): Comparative study of the glycan

- specificities of cell-bound human tandemrepeat-type galectin-4, -8 and -9. *Glycobiology* **22**, 1207–1217.
- Vokhmyanina O.A., Rapoport E.M., Ryzhov I.M., Korchagina E.Y., Pazynina G.V., Severov V.V., Kaltner H., André S., Gabius H.J., Bovin N.V. (2011): Carbohydrate specificity of chicken and human tandem-repeat-type galectins-8 in composition of cells. *Biochemistry (Moscow)* **76**, 1185–1192.
- Weisz B., Giehl K., Gana-Weisz M., Egozi Y., Ben-Baruch G., Marciano D., Gierschik P., Kloog Y. (1999): A new functional Ras antagonist inhibits human pancreatic tumor growth in nude mice. *Oncogene* **18**, 2579–2588.
- Wells A., (2000): Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv. Cancer Res.* **78**, 31–101.
- Wennerberg K., Rossman K.L., Der C.J. (2005): The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 843–846.
- Wheeler D.L., Iida M., Dunn E.F. (2009): The role of Src in solid tumors. *Oncologist* **14**, 667–678.
- Wittinghofer A., Waldmann H. (2000): Ras—ein molekularer Schalter bei der Tumorentstehung. *Angew. Chem.* **112**, 4360–4383.
- Wolthuis R.M., Zwartkruis F., Moen T.C., Bos J.L. (1998): Ras-dependent activation of the small GTPase Ral. *Curr. Biol.* **8**, 471–474.
- Wu M.H., Hong T.M., Cheng H.W., Pan S.H., Liang Y.R., Hong H.C., Chiang W.F., Wong T.Y., Shieh D.B., Shiau A.L., Jin Y.T., Chen Y.L. (2009): Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol. Cancer Res.* **7**, 311–318.
- Wymann M.P., Zvelebil M., Laffargue M. (2003): Phosphoinositide 3-kinase signalling— which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 366–376.
- Xie D., Lan L., Huang K., Chen L., Xu C., Wang R., Shi Y., Wu X., Wang L., Liu Y., Lu B. (2014): Association of p53/p21 expression and cigarette smoking with tumor progression and poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Oncol. Rep.* **32**, 2517–2526.
- Yang J., Zhu L., Cai Y., Suo J., Jin J. (2014): Role of downregulation of galectin-9 in the tumorigenesis of gastric cancer. *Int. J. Oncol.* **45**, 1313–1320.
- Yang R.Y., Liu F.T. (2003): Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 267–276.
- Yang R.Y., Rabinovich G.A., Liu F.T. (2008): Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **10**, e17.
- Ye L., Varamini B., Lamming D.W., Sabatini D.M., Baur J.A. (2013): Rapamycin has a biphasic effect on insulin sensitivity in C2C12 myotubes due to sequential disruption of mTORC1 and mTORC2. *Front Genet.* **11**, 177.
- Yip-Schneider M.T., Lin A.L., Marshall M.S. (2001): Pancreatic Tumor Cells with Mutant K-ras Suppress ERK Activity by MEK-Dependent Induction of MAPKinase Phosphatase-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 992–997.
- Yoon S., Seger, R. (2006): The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21–44.
- Yoshida H., Yamashita S., Teraoka M., Itoh A., Nakakita S., Nishi N., Kamitori S. (2012): X-ray structure of a protease-resistant mutant form of human galectin-8 with two carbohydrate recognition domains. *FEBS J.* **279**, 3937–3951.

- Yu J., Wjasow C., Backer J. (1998): Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J. Biol. Chem.* **273**, 30199-30203.
- Yuan Z., Zhao J., Wang Z.X. (2003): Flexibility analysis of enzyme active sites by crystallographic temperature factors. *Protein Eng.* **16**, 109-114.
- Zhang H.Y., Jin L., Stilling G.A., Ruebel K.H., Coonse K., Tanizaki Y., Raz A., Lloyd R.V. (2009): RUNX1 and RUNX2 upregulate Galectin-3 expression in human pituitary tumors. *Endocrine* **35**, 01-11.
- Zhang X., Chen T., Zhang J., Mao Q., Li S., Xiong W., Qiu Y., Xie Q., Ge J. (2012): Notch1 promotes glioma cell migration and invasion by stimulating β -catenin and NF- κ B signaling via AKT activation. *Cancer Sci.* **103**, 181-90.
- Zhao Y., Zhang Z.Y. (2001): The mechanism of dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 by mitogen-activated protein kinase phosphatase 3. *J. Biol. Chem.* **276**, 32382-32391.
- Zhou B., Wu L., Shen K., Zhang J., Lawrence D.S., Zhang Z.Y. (2001): Multiple regions of MAP kinase phosphatase 3 are involved in its recognition and activation by ERK2. *J. Biol. Chem.* **276**, 6506-6515.
- Zhou Y., Hancock J.F. (2014): Ras nanoclusters: Versatile lipid-based signaling platforms. *Biochim. Biophys. Acta.* pii: S0167-4889(14)00333-4. doi: 10.1016.
- Zhu L., Wang Z., Lin Y., Chen Z., Liu H., Chen Y., Wang N., Song X. (2014): Sphingosine kinase 1 enhances the invasion and migration of non-small cell lung cancer cells via the AKT pathway. *Oncol. Rep.* **33**, 1257-1263.
- Zick Y., Eisenstein M., Goren R.A., Hadari Y.R., Levy Y., Ronen D. (2004): Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconj J.* **19**, 517-526.

8. Anhang

Dargestellt sind die cDNA und Aminosäuresequenzen der unter 4.2. generierten und sequenzierten Plasmide.

In rot gekennzeichnet sind die Nukleotide bzw. Aminosäuren, die nicht mit den Galektin-8 long (NCBI: NM_006499.4) bzw. Galektin-8 short (NCBI: BC016486.2) Sequenzen der Datenbank *pubmed* übereinstimmen.

8.1. cDNA und Aminosäuresequenz pECFP-C1/Galektin-8 long

```

289 CTA AAA GGA GAA AAG TCT TTT GAG ATC GTG ATT ATG GTG CTA AAG GAC
 97 L K G E K S F E I V I M V L K D
337 AAA TTC CAG GTG GCT GTA AAT GGA AAA CAT ACT ATG CTG TAT GGC CAC
113 K F Q V A V N G K H T M L Y G H
385 AGG ATC GGC CCA GAG AAA ATA GAC ACT CTG GGC ATT TAT GGC AAA GTG
129 R I G P E K I D T L G I Y G K V
433 AAT ATT CAC TCA ATT GGT TTT AGC TTC AGC TCG GAC TTA CAA AGT ACC
145 N I H S I G F S F S S D L Q S T
481 CAA GCA TCT AGT CTG GAA CTG ACA GAG ATA AGT AGA GAA AAT GTT CCA
161 Q A S S L E L T E I S R E N V P
529 AAG TCT GGC ACG CCC CAG CTT CCT AGT AAT AGA GGA GGA GAC ATT TCT
177 K S G T P Q L P S N R G G D I S
577 AAA ATC GCA CCC AGA ACT GTC TAC ACC AAG AGC AAA GAT TCG ACT GTC
193 K I A P R T V Y T K S K D S T V
625 AAT CAC ACT TTG ACT TGC ACC AAA ATA CCA CCT ATG AAC TAT GTG TCA
209 N H T L T C T K I P P M N Y V S
673 AAG AGC CTG CCA TTC GCT GCA AGG TTG AAC ACC CCC ATG GGC CCT GGA
225 K S L P F A A R L N T P M G P G
721 CGA ACT GTC GTC GTT AAA GGA GAA GTG AAT GCA AAT GCC AAA AGC TTT
241 R T V V V K G E V N A N A K S F
769 AAT GTT GAC CTA CTA GCA GGA AAA TCA AAG GAT ATT GCT CTA CAC TTG
257 N V D L L A G K S K D I A L H L
817 AAC CCA CGC CTG AAT ATT AAA GCA TTT GTA AGA AAT TCT TTT CTT CAG
273 N P R L N I K A F V R N S F L Q
865 GAG TCC TGG GGA GAA GAA GAG AGA AAT ATT ACC TCT TTC CCA TTT AGT
289 E S W G E E E R N I T S F P F S
913 CCT GGG ATG TAC TTT GAG ATG ATA ATT TAT TGT GAT GTT AGA GAA TTC
305 P G M Y F E M I I Y C D V R E F
961 AAG GTT GCA GTA AAT GGC GTA CAC AGC CTG GAG TAC AAA CAC AGA TTT
321 K V A V N G V H S L E Y K H R F
1009 AAA GAG CTC AGC AGT ATT GAC ACG CTG GAA ATT AAT GGA GAC ATC CAC
337 K E L S S I D T L E I N G D I H
1057 TTA CTG GAA GTA AGG AGC TGG TAG GAT GGG ATC CAC CGG ATC TAG ATA
353 L L E V R S W Stop D G I H R I Stop I
1105 ACT GAT CAA ATC AGC CCA ATA ATC C
369 T D Q I S P I I

```

8.2. Aminosäuresequenz pECFP-C1/Galektin-8 short

49 ATT CCG TTT GTT GGC ACC ATT CCT GAT CAG CTG GAT CCT GGA ACT TTG
 17 I P F V G T I P D Q L D P G T L
 97 ATT GTG ATA CGT GGG CAT GTT CCT AGT GAC GCA GAC AGA TTC CAG GTG
 33 I V I R G H V P S D A D R F Q V
 145 **G**CT CTG CAG AAT GGC AGC AGC ATG AAA CCT CGA GCC GAT GTG GCC TTT
 49 **G** L Q G N S S M K P R A D V A F
 193 CAT TTC AAT CCT CGT TTC AAA AGG GCC GGC TGC ATT GTT TGC AAT ACT
 65 H F N P R F K R A G C I V C N T
 241 TTG ATA AAT GAA AAA TGG GGA CGG GAA GAG ATC ACC TAT GAC ACG CCT
 81 L I N E K W G R E E I T Y D T P
 289 TTC AAA AGA GAA AAG TCT TTT GAG ATC GTG ATT ATG GTG CTG AAG GAC
 97 F K R E K S F E I V I M V L K D
 337 AAA TTC CAG GTG GCT GTA AAT GGA AAA CAT ACT CTG CTC TAT GGC CAC
 113 K F Q V A V N G K H T L L Y G H
 385 AGG ATC GGC CCA GAG AAA ATA GAC ACT CTG GGC ATT TAT GGC AAA GTG
 129 R I G P E K I D T L G I Y G K V
 433 AAT ATT CAC TCA ATT GGT TTT AGC TTC AGC TCG GAC TTA CAA AGT ACC
 146 N I H S I G F S F S S D L Q S T
 481 CAA GCA TCT AGT CTG GAA CTG ACA GAG ATA AGT AGA GAA AAT GTT CCA
 161 Q A S S L E L T E I S R E N V P
 529 AAG TCT GGC ACG CCC CAG CTT AGG CTG CCA TTC GCT GCA AGG TTG AAC
 177 K S G T P Q L R L P F A A R L N
 577 ACC CCC ATG GGC CCT GGA CGA ACT GTC GTC GTT AAA GGA GAA **A**TG AAT
 193 T P M G P G R T V V V K G E **M** N
 625 GCA AAT GCC AAA AGC TTT AAT GTT GAC CTA CTA GCA GGA AAA TCA AAG
 209 A N A K S F N V D L L A G K S K
 673 GAT ATT GCT CTA CAC TTG AAC CCA CGC CTG AAT ATT AAA GCA TTT GTA
 225 D I A L H L N P R L N I K A F V
 721 AGA AAT TCT TTT CTT CAG GAG TCC TGG GGA GAA GAA GAG AGA AAT ATT
 241 R N S F L Q E S W G E E E R N I
 769 ACC **C**CT TTC CCA TTT AGT CCT GGG ATG TAC TTT GAG ATG ATA ATT TAT
 257 T **P** F P F S P G M Y F E M I I Y
 817 TGT **G**GT GTT AGA GAA TTC AAG GTT GCA GTA AAT GGC GTA CAC AGC CTG
 273 C **G** V R E F K V A V N G V H S L
 865 GAG TAC AAA CAC AGA TTT AAA GAG CTC AGC AGT ATT GAC ACG CTG GAA
 289 E Y K H R F K E L S S I D T L E
 913 ATT AAT GGA GAC ATC CAC TTA CTG GAA GTA AGG AGC TGG TAC GAG GGG
 305 I N G D I H L L E V R S W Y E G
 961 ATC CAC CGG ATC TAG ATA ACT GAT CAA ATC AGC CAT CAC CTT TT
 321 I H R I Stop I T D Q I S H H L

8.3. Aminosäuresequenz pmCherry-C1/Galektin-8 long

```

1 ATG ATG TTG TCC TTA AAC AAC CTA CAG AAT ATC ATC TAT AAC CCG GTA
1 M M L S L N N L Q N I I Y N P V
49 ATC CCG TTT GTT GGC ACC ATT CCT GAT CAG CTG GAT CCT GGA ACT TTG
17 I P F V G T I P D Q L D P G T L
97 ATT GTG ATA CGT GGG CAT GTT CCT AGT GAC GCA GAC AGA TTC CAG GTG
33 I V I R G H V P S D A D R F Q V
145 GAT CTG CAG AAT GGC AGC AGT GTG AAA CCT CGA GCC GAT GTG GCC TTT
49 D L Y N G S S V K P R A D V A F
193 CAT TTC AAT CCT CGT TTC AAA AGG GCC GGC TGC ATT GTT TGC AAT ACT
65 H F N P R F K R A G C I V C N T
241 TTG ATA AAT GAA AAA TGG GGA CGG GAA GAG ATC ACC TAT GAC ACG CCT
81 L I N E K W G R E E I T Y D T P
289 TTC AAA AGA GAA AAG TCT TTT GAG ATC GTG ATT ATG GTG CTA AAG GAC
97 F K R E K S F E I V I M V L K D
337 AAA TTC CAG GTG GCT GTA AAT GGA AAA CAT ACT CTG CTC TAT GGC CAC
113 K F Q V A V N G K H T L L Y G H
385 AGG ATC GGC CCA GAG AAA ATA GAC ACT CTG GGC ATT TAT GGC AAA GTG
129 R I G P E K I D T L G I Y G K V
433 AAT ATT CAC TCA ATT GGT TTT AGC TTC AGC TCG GAC TTA CAA AGT ACC
145 N I H S I G F S F S S D L Q S T
481 CAA GCA TCT AGT CTG GAA CTG ACA GAG ATA AGT AGA GAA AAT GTT CCA
161 Q A S S L E L T E I S R E N V P
529 AAG TCT GGC ACG CCC CAG CTT CCT AGT AAT AGA GGA GGA GAC ATT TCT
177 K S G T P Q L P S N R G G D I S
577 AAA ATC GCA CCC AGA ACT GTC TAC ACC AAG AGC AAA GAT TCG ACT GTC
193 K I A P R T V Y T K S K D S T V
625 AAT CAC ACT TTG ACT TGC ACC AAA ATA CCA CCT ATG AAC TAT GTG TCA
209 N H T L T C T K I P P M N Y V S
673 AAG AGC CTG CCA TTC GCT GCA AGG TTG AAC ACC CCC ATG GGC CCT GGA
225 K S L P F A A R L N T P M G P G
721 CGA ACT GTC GTC GTT AAA GGA GAA GTG AAT GCA AAT GCC AAA AGC TTT
241 R T V V V K G E V N A N A K S F
769 AAT GTT GAC CTA CTA GCA GGA AAA TCA AAG GAT ATT GCT CTA CAC TTG
257 N V D L L A G K S K D I A L H L
817 AAC CCA CGC CTG AAT ATT AAA GCA TTT GTA AGA AAT TCT TTT CTT CAG
273 N P R L N I K A F V R N S F L Q
865 GAG TCC TGG GGA GAA GAA GAG AGA AAT ATT ACC TCT TTC CCA TTT AGT
289 E S W G E E E R N I T S F P F S
913 CCT GGG ATG TAC TTT GAG ATG ATA ATT TAC TGT GAT GTT AGA GAA TTC
305 P G M Y F E M I I Y C D V R E F
961 AAG GTT GCA GTA AAT GGC GTA CAC AGC CTG GAG TAC AAA CAC AGA TTT
321 K V A V N G V H S L E Y K H R F
1009 AAA GAG CTC AGC AGT ATT GAC ACG CTG GAA ATT AAT GGA GAC ATC CAC
337 K E L S S I D T L E I N G D I H
1057 TTA CTG GAA GTA AGG AGC TGG TAG GAT GGG ATC CAC CGG ATC TAG ATA
353 L L E V R S W Stop D G I H R I Stop I
1105 ACT GAT CAT ATC ACC ACC CCT C
369 I D H I T T P

```

8.4. Aminosäuresequenz pmCherry-C1/Galektin-8 short

1 ATG ATG TTG TCC TTA AAC AAC CTA CAG AAT ATC ATC TAT AAC CCG GTA
 1 M M L S L N N L Q N I I Y N P V
 49 ATC CCG TTT GTT GGC ACC ATT CCT GAT CAG CTG GAT CCT GGA ACT TTG
 17 I P F V G T I P D Q L D P G T L
 97 ATT GTG ATA CGT GGG CAT GTT CCT AGT GAC GCA GAC AGA TTC CAG GTG
 33 I V I R G H V P S D A D R F Q V
 145 **GGT** CTG CAG AAT **GAG** AGC AGC ATG AAA CCT CGA GCC GAT GTG GCC TTT
 49 **G** L Q N **E** S S M K P R A D V A F
 193 CAT TTC AAT CCT CGT TTC AAA AGG GCC GGC TGC ATT GTT TGC AAT ACT
 65 H F N P R F K R A G C I V C N T
 241 TTG ATA AAT GAA AAA TGG GGA CGG GAA GAG ATC ACC TAT GAC ACG CCT
 81 L I N E K W G R E E I T Y D T P
 289 TTC AAA AGA GAA AAG TCT TTT GAG ATC GTG ATT ATG GTG CTG AAG GAC
 97 F K R E K S F E I V I M V L K D
 337 AAA TTC CAG GTG GCT GTA AAT GGA AAA CAT ACT CTG CTC TAT GGC CAC
 113 K F Q V A V N G K H T L L Y G H
 385 AGG ATC GGC CCA GAG AAA ATA GAC ACT CTG GGC ATT TAT GGC AAA GTG
 129 R I G P E K I D T L G I Y G K V
 433 AAT ATT CAC TCA ATT GGT TTT AGC TTC AGC TCG GAC TTA CAA AGT ACC
 145 N I H S I G F S F S S D L Q S T
 481 CAA GCA TCT AGT CTG GAA CTG ACA GAG ATA AGT AGA GAA AAT GTT CCA
 161 Q A S S L E L T E I S R E N V P
 529 AAG TCT GGC ACG CCC CAG CTT AGG CTG CCA TTC GCT GCA AGG TTG AAC
 177 K S G T P Q L R L P F A A R L N
 577 ACC CCC ATG GGC CCT GGA CGA ACT GTC GTC GTT AAA GGA GAA **ATG** AAT
 193 T P M G P G R T V V V K G E **M** N
 625 GCA AAT GCC AAA AGC TTT AAT GTT GAC CTA CTA GCA GGA AAA TCA AAG
 209 A N A K S F N V D L L A G K S K
 673 GAT ATT GCT CTA CAC TTG AAC CCA CGC CTG AAT ATT AAA GCA TTT GTA
 225 D I A L H L N P R L N I K A F V
 721 AGA AAT TCT TTT CTT CAG GAG TCC TGG GGA GAA GAA GAG AGA AAT ATT
 241 R N S F L Q E S W G E E E R N I
 769 ACC **CCT** TTC CCA TTT AGT CCT GGG ATG TAC TTT GAG ATG ATA ATT **TAC**
 257 T **P** F P F S P G M Y F E M I I Y
 817 TGT **GGT** GTT AGA GAA TTC AAG GTT GCA GTA AAT GGC GTA CAC AGC CTG
 273 C **G** V R E F K V A V N G V H S L
 865 GAG TAC AAA CAC AGA TTT AAA GAG CTC AGC AGT ATT GAC ACG CTG GAA
 289 E Y K H R F K E L S S I D T L E
 913 ATT AAT GGA GAC ATC CAC TTA CTG GAA GTA AGG AGC TGG TAG
 305 I N G D I H L L E V R S W Stop

9. Danksagungen

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

Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl für ihre Betreuung, ihr Engagement und ihre Hilfsbereitschaft. Ihre Anregungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Andre Menke für die Mitbetreuung meiner Arbeit und die Unterstützung im Labor.

Herrn Prof. Dr. Dammann für die Übernahme des Erstgutachtens.

Weiter bedanke ich mich bei dem ganzen Laborteam für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Kollegialität.

Des Weiteren möchte ich mich bei Nicola Kuse bedanken, die seit 10 Jahren immer ein offenes Ohr und aufmunternde Worte parat hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung und schier endlose Geduld.

10. Konferenzbeiträge

1. Barnard S.J., Chakraborty S., Menke A., Giehl K. (2011): Characterisation of Galectin-3 and Galectin-8-induced signal transduction in carcinoma cells. 15th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes. 07.-10.11.2011, Weimar.
2. Barnard S.J., Giehl K. (2012): Regulation of K-Ras-induced signal transduction by Galectin-3 and Galectin-8 in adenocarcinoma cell lines of lung and pancreas. 6. Treffen des wissenschaftlichen Nachwuchses der Studiengruppe Biochemische Pharmakologie und Toxikologie gemeinsam mit der Studiengruppe Rezeptoren und Signaltransduktion der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM). 15.-16.06.2012, Günzburg/Donau.
3. Barnard S.J., Beilke S., Menke A., Giehl K. (2012): Regulation of K-Ras-induced signal transduction by Galectin-3 and Galectin-8 in adenocarcinoma cell lines of lung and pancreas. Symposium Remodeling, Repair and Regeneration in Lung Diseases of the UGMLC/DZL. 21.-23.06.2012, Marburg.
4. Barnard S.J., Menke A., Giehl K. (2012): Regulation of K-Ras-induced signal transduction by galectins in adenocarcinoma cell lines of lung and pancreas. 5th Annual Conference of the International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences (GGL). 18.-19.09.2012, Giessen.
5. Barnard S.J., Menke A., Giehl K. (2012): Regulation of K-Ras-induced signal transduction by Galectin-3 and Galectin-8 in adenocarcinoma cell lines of lung and pancreas. 16th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS): Signal Transduction, Receptors, Mediators and Genes. 05.-07.11.2012, Weimar.
6. Barnard S.J., Menke A., Giehl K. (2013): Ras-induced signal transduction is regulated by Galectins in adenocarcinoma cells. 6th Annual Conference of the International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences (GGL). 11.-12.09.2013, Giessen.
7. Barnard S.J., Klinke J., Porr A., Menke A., Giehl K. (2012): Galectins regulate Ras-induced signal transduction in adenocarcinoma cells. Molecular Life Sciences, International Symposium of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM). 03.06.10.2013, Frankfurt.
8. Barnard S.J., Menke A., Giehl K. (2014): Galectin-8 is a new regulator of K-Ras-induced signal transduction and tumour cell migration. 7. Treffen des wissenschaftlichen Nachwuchses der Studiengruppe Biochemische Pharmakologie und Toxikologie gemeinsam mit der Studiengruppe Rezeptoren und Signaltransduktion der Gesellschaft für

Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM). 12.-13.09.2014, Günzburg/Donau.

9. Barnard S.J., Menke A., Giehl K. (2014): Galectin-8 is a new regulator of K-Ras-induced signal transduction and tumour cell migration. 7th Annual Conference of the International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences (GGL). 17.-18.09.2014, Giessen.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, 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 Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den _____

Sarah-Jane Barnard