

Entwicklung von multivalenten Sonden zur gezielten Analyse und Beeinflussung Ras-abhängiger Signalwege

Dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena
vorgelegte

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.



seit 1558

von Diplom-Biochemiker Martin Augsten
geboren am 19.10.1975 in Eisenach

Solna, Juli 2005

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	v
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	2
2.1. Allgemeine Betrachtungen zur Ras-Familie.....	2
2.2. Prozessierung und Lokalisation von Ras	4
• <i>Posttranslationale Modifikationen steuern den Transport zur Plasmamembran</i>	<i>4</i>
• <i>Mikrolokalisierung der Ras-Isoformen innerhalb der Plasmamembran</i>	<i>5</i>
2.3. Regulation der Ras-Aktivität durch GEF und GAP	6
• <i>Die G-Domäne als strukturelle Basis der Schalterfunktion.....</i>	<i>6</i>
• <i>GEF fungieren als Aktivatoren von Ras</i>	<i>7</i>
• <i>Die GEF-Reaktion.....</i>	<i>8</i>
• <i>GAP beschleunigen die Inaktivierung von aktiviertem Ras</i>	<i>9</i>
• <i>Die GAP-Reaktion</i>	<i>9</i>
2.4. Signaltransduktion der Ras-Proteine.....	10
2.4.1. Kleines Ras- große Wirkung: Expansion der Ras-Aktivität durch multiple Effektoren.....	11
2.4.2. Ein Klassiker der Signalweiterleitung: die MAPK-Kaskade	13
2.4.3. Strukturelle und biochemische Charakteristika der Ras-bindenden Domäne	13
2.5. Methodische Ansätze zur Detektion der Ras-Aktivität	15
• <i>Bestimmung der Ras-Aktivität mittels pull down-Assays.....</i>	<i>15</i>
• <i>Ras im Fokus: Visualisierung der Aktivierung in vivo</i>	<i>15</i>
• <i>Vor- und Nachteile der verfügbaren Methoden</i>	<i>17</i>
2.6. Die dunkle Seite von Ras: Transformation und Tumorigenese.....	17
• <i>Interspezies-spezifische Unterschiede bei der Transformation</i>	<i>18</i>
• <i>Das transformierende Potential der Ras-Isoformen</i>	<i>19</i>
2.6.1. Elemente der Ras-initiierten zellulären Transformation.....	19
2.6.1.1. Ras-vermittelte Effekte auf den Zellzyklus und die Proliferation.....	19
2.6.1.2. Wirkung von Ras auf den Prozess der Apoptose	20
• <i>Ras supprimiert die Auslösung der Apoptose- einerseits... ..</i>	<i>21</i>
• <i>...andererseits kann Ras auch die Apoptose induzieren</i>	<i>23</i>
• <i>Ras als zellulärer Überlebensfaktor.....</i>	<i>23</i>
2.6.1.3. Verwicklung von Ras in die Tumorigenese	24
• <i>Ras-Hyperaktivität in Tumoren</i>	<i>24</i>
• <i>Umbildung zu einem „aggressiven“ zellulären Phänotyp</i>	<i>25</i>
• <i>Ras und Metastasierung</i>	<i>25</i>
2.6.2. Ras als Zielmolekül in der Krebstherapie	26
2.7. Fragestellung und experimentelles Design	27
3. MATERIAL UND METHODEN	29
3.1. Materialien	29
3.1.1. Chemikalien	29
3.1.2. Verwendete Organismen und Zelllinien	29
3.1.3. Medien.....	29
3.1.3.1. Medium zur Kultivierung von <i>E.coli</i>	29
3.1.3.2. Medium zur Kultivierung von Säugerezellen	30
3.1.4. Primer.....	30

3.1.4.1. Primer für die Amplifikation der RBD.....	30
3.1.4.2. Primer für die Amplifikation von Ras-Varianten.....	30
3.1.4.3. Primer für die Mutagenese von MSOR- und Ras-Varianten	31
3.1.4.4. Sequenzierprimer	31
3.1.5. Konstrukte und Plasmide	31
3.1.5.1. MSOR-Konstrukte.....	31
3.1.5.2. Ras-Konstrukte.....	32
3.1.5.3. Molekulargewichte von MSOR- und Ras-Konstrukten und Proteinen	32
3.1.5.4. Plasmide (allgemein).....	33
3.1.5.5. Donorplasmide für die Konstruktion der MSOR.....	33
3.1.5.6. Donorplasmide für die Konstruktion von DsRed1-Ras.....	33
3.1.6. Antikörper.....	34
3.1.7. Software.....	34
3.2. Methoden.....	35
3.2.1. Kultivierung von <i>E.coli</i>	35
3.2.2. Kultivierung und Manipulation von Säugerzellen.....	35
3.2.2.1. Passagieren von Säugerzellen	35
3.2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen.....	36
3.2.2.3. Bestimmung der Zellzahl.....	36
3.2.2.4. Transfektion von Säugerzellen mit kationischen Lipiden.....	36
• <i>Transfektion von Säugerzellen mit Polyfect™</i>	37
• <i>Transfektion von Säugerzellen mit Metafectene™</i>	37
3.2.2.5. Nachweis des Zellkerns.....	37
3.2.2.6. Stimulation von Säugerzellen mit Mitogenen	37
3.2.2.7. Präparation von Lysaten aus Säugerzellen	38
3.2.3. Zentrifugation	38
3.2.4. Gelelektrophorese.....	39
• <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	39
• <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)</i>	39
3.2.5. Proteinbestimmung nach Bradford.....	40
3.2.6. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	40
3.2.7. Klonierung von MSOR- und Ras-Konstrukten	40
3.2.7.1. Amplifikation von RBD und Ras cDNA mittels PCR.....	40
3.2.7.2. Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Plasmiden	41
3.2.7.3. Isolation von DNA aus Agarosegelen	41
3.2.7.4. Restriktion von DNA	42
3.2.7.5. Dephosphorylierung von Plasmiden	42
3.2.7.6. Ligation	43
3.2.7.7. Transformation von Plasmiden in <i>E.coli</i>	43
3.2.7.8. Präparation von Plasmiden aus <i>E.coli</i>	43
3.2.7.9. Sequenzierung	44
3.2.7.10. PCR-basierte Mutagenese von MSOR- und Ras-Konstrukten.....	44
3.2.8. Charakterisierung der MSOR-Ras-Interaktion <i>in vitro</i>	45
3.2.8.1. Expression von MSOR und H-Ras(G12V) Proteinen als His-Tag Fusionen.....	45
3.2.8.2. Niedrig-Zelldichte-Fermentation.....	46
3.2.8.3. Aufreinigung His-gekoppelter Proteine.....	46
3.2.8.4. Ras/GAP-Assay.....	47
3.2.8.5. Isotherme Titrationskalorimetrie	48
• <i>Das Prinzip der ITC</i>	48
• <i>Beladung von H-Ras(G12V) mit GTP</i>	49
• <i>Aufreinigung von GTP beladenem H-Ras(G12V)</i>	49
• <i>Quantitative Bestimmung des H-Ras(G12V)-gebundenen GTP Anteils</i>	50
• <i>Durchführung der kalorimetrischen Messungen</i>	50
3.2.9. Charakterisierung der MSOR-Ras-Interaktion <i>in vivo</i>	51

3.2.9.1. Mikroskopische Untersuchungen.....	51
• <i>Lichtmikroskopie</i>	51
• <i>Konfokale LASER-Scanning-Mikroskopie</i>	51
3.2.9.2. Quantitative Bestimmung apoptotischer Zellen.....	52
• <i>Annexin V-Assay</i>	52
• <i>FACS-Analyse</i>	53
3.2.10. Western-Blot.....	53
3.2.11. Untersuchungen zur Genexpression	54
• <i>MMP-1-Reporter-Gen-Assay</i>	54
• <i>Genexpressionsanalyse mittels cDNA-Array</i>	54
• <i>RNA-Isolierung</i>	54
• <i>Reverse Transkription unter Einbau von Digoxigenin-dUTP</i>	55
• <i>Der cDNA-Array</i>	55
• <i>Hybridisierung der cDNA Proben</i>	56
3.2.12. Untersuchungen zur zellulären Transformation.....	56
• <i>Koloniebildung in Soft-Agar-Assay</i>	56
• <i>Matrigel-Invasions-Assay</i>	57
3.2.13. Densitometrische Auswertung der Signale.....	57
3.2.14. Statistische Analyse.....	58
4. ERGEBNISSE.....	59
4.1. Konstruktion und Charakterisierung der MSOR-Konstrukte.....	59
4.1.1. Konstruktion der MSOR-Konstrukte.....	59
4.1.2. Verhalten der MSOR <i>in vitro</i>	61
4.1.2.1. Rekombinante Expression der MSOR und H-Ras(G12V) als His-Fusionsproteine	61
4.1.2.2. Untersuchung der MSOR/Ras Interaktion mittels Ras/GAP-Assay	61
4.1.2.3. Untersuchung des kooperativen Effekt mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC)	63
4.1.3. Charakterisierung der MSOR <i>in vivo</i>	65
4.1.3.1. Konstruktion von eGFP-MSOR Fusionen.....	65
4.1.3.2. Einfluss der eGFP-MSOR auf die Morphologie von Cos-7 Zellen.....	65
4.1.3.3. Einfluss der eGFP-MSOR auf die Auslösung der Apoptose in Cos-7 Zellen.....	67
4.1.3.4. Beobachtungen bei Koexpression von eGFP-MSOR und dsRed1-Ras/Rap-Konstrukten	68
4.1.3.5. Konstruktion niederaffiner eGFP-MSOR-Varianten	72
4.1.3.6. Charakterisierung der niederaffinen eGFP-MSOR Konstrukte	73
4.1.3.6.1. Beobachtungen zum Verhalten niederaffiner eGFP-MSOR nach Expression in Cos-Zellen	73
4.1.3.6.2. Charakterisierung der Interaktion niederaffiner MSOR und Ras-GTP <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	74
4.1.3.6.3. Beobachtungen bei Koexpression niederaffiner eGFP-MSOR und dsRed1-Ras-Konstrukte	75
4.2. Visualisierung der Ras-Aktivierung in lebenden Zellen.....	78
4.2.1. Anwendung von eGFP-R59A,N64D-3 als Detektor der endogenen Ras-Aktivität	78
4.2.2. Untersuchungen zur Spezifität des Reporters eGFP-R59A,N64D-3	80
4.3. Untersuchungen zur blockierenden Wirkung der MSOR auf Ras-vermittelte zelluläre Prozesse	85
4.3.1. Einfluss der eGFP-MSOR auf die Ras-vermittelte Aktivierung der MAPK-Kaskade	85
4.3.2. Einfluss der eGFP-MSOR auf die Ras-getriebene Genexpression	88
4.3.2.1. Reporter-Gen-Analyse der <i>MMPI</i> -Genexpression.....	88
4.3.2.2. Expressionsprofil transformationsrelevanter Gene mittels cDNA-Array.....	89
4.3.3. Wirkung der eGFP-MSOR auf das substratunabhängige Wachstum transformierter Fibroblasten	90
4.3.4. Einfluss der eGFP-MSOR auf die Invasivität von Cos-7 Zellen	92

5. DISKUSSION.....	93
5.1. Ableitung eines Modells der MSOR-Ras-Interaktion aus den <i>in vitro</i> Untersuchungen	93
5.2. Beobachtungen zum Verhalten der MSOR <i>in vivo</i>	96
5.2.1. Betrachtungen zum pro-apoptischen Effekt hochaffiner MSOR.....	96
5.2.2. Visualisierung der Ras-Aktivierung <i>in vivo</i>	98
• <i>Niederaffine MSOR als geeignete Reporter der Ras-Aktivität</i>	98
• <i>Spezifität des Reporters eGFP-R59A,N64D-3</i>	98
• <i>Detektion der Ras-Aktivierung an der Plasmamembran</i>	99
• <i>Ras-Aktivierung oder nicht- das ist hier die Frage</i>	100
• <i>Ras am Golgi-Apparat: Lokalisation ohne Aktivierung in vivo?</i>	101
• <i>Aktiviertes Ras an anderen Zellorganellen?</i>	103
• <i>Ras-Aktivität im Zellkern-Aufbruch zu neuen Sphären?</i>	103
5.2.3. Modulation und Inhibition der Ras-Hyperaktivität	105
• <i>Differentielles Verhalten der MSOR-Varianten auf die Ras-stimulierte MAPK-Aktivierung</i>	105
• <i>MSOR und die Ras-stimulierte Genexpression transformations-relevanter Faktoren</i>	107
• <i>Das inhibitorische Potential der MSOR gegenüber transformierten Zellen</i>	109
5.3. Betrachtungen zu möglichen Anwendungen der MSOR.....	110
REFERENZEN.....	112
ANHANG	136

ANLAGEN

Selbstständigkeitserklärung

Danksagung

Lebenslauf

Publikationen und wissenschaftliche Präsentationen

Filme (nur auf CD)

Abkürzungsverzeichnis

4E-BPI	Eukaryotischer Translation-initiationsfaktor (eIF)4E-bindendes Protein
A	Annexin V
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain</i>
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
Cdc25	Nukleotidaustausch-Domäne von RasGEF
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CEA	Karzinomembryonales Antigen
CIAP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
CRD	<i>Cysteine rich domain</i>
DAG	Diacylglycerol
DH-Domäne	Dbl-homologe Domäne
DMEM	<i>Dulbecco 's minimal essential medium (eagle)</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant-negativ
dsDNA	doppelsträngige DNA
ECM	Extrazelluläre Matrix
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	EGF-Rezeptor
eGFP	<i>Enhanced GFP</i>
EMT	Epitheliale- mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
Em	Emission
Ex	Excitation
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FPLC	Fluid phase liquid chromatography
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i> (auch: <i>fluorescence RET</i>)
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GEF	<i>GTPase exchange factor</i>
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK3	Glycogen-Synthase-Kinase 3
h	Stunde(n)
HB-EGF	<i>Heparin binding EGF like growth factor</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HVR	Hypervariable Region
Icmt1	Isoprenyl-carboxymethyl-Transferase 1

IKK	<i>I-κB Kinase</i>
IP ₃	Inositol(1,4,5)-Triphosphat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
JNK	Jun N-terminale Kinase
K_A	Assoziationskonstante (auch: Affinitätskonstante)
kb	Kilobasenpaar
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LPA	Lysophosphatidsäure
LSM	<i>LASER-Scanning</i> -Mikroskopie
MAPK (KK)	Mitogen-aktivierte Proteinkinase(-Kinase-Kinase)
MDCK	<i>Madine Darby canine kidney epithelial cells</i>
MEF	Maus embryonale Fibroblasten
MEK	MAP/ERK Kinase
min	Minute(n)
MMP	Matrix-metalloproteinase
MSOR	<i>Multivalent scavengers of oncogenic Ras</i> ; oligomere RBD
MT-MMP	<i>Membrane type</i> Matrix-metalloproteinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiaol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
NF κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NF-1	Neurofibromin 1
NGF	Nerve growth factor
NES	Kernexportsequenz (-signal)
NLS	Kernlokalisationssequenz (-signal)
o.g.	oben genannt
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAI	<i>Plasminogen activator inhibitors</i>
PBR	Polybasische Region
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PDK	<i>3-Phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI	Propidiumiodid
PI(3)K	Phosphatidylinositol(3)-Kinase
PI(3)P	Phosphatidylinositol(3)-Phosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol(4,5)-Diphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B/ Akt
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC ϵ	Phospholipase C ϵ
PLD	Phospholipase D
PM	Plasmamembran
RA-Domäne	Ras-assoziierende Domäne
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Raichu	<i>Ras and interacting protein chimaeric unit</i>
Rb	Retinoblastomprotein
RBD	Ras-Bindedomäne

RIE-1	<i>Rat intestinal epithelial cells</i>
Rce1	<i>Ras and a-factor converting enzyme 1</i>
RNase A	Ribonuklease A
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RSK	90kDa ribosomale S6 Kinase
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase(n)
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
si-RNA	<i>short interfering RNA</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
TACE	<i>Tumor necrosis factor α converting enzyme</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat/ Phorbol-12-myristoyl-13-acetat
TNF	Tumor Nekrosefaktor
TZR	T-Zellrezeptor
u.a.	unter anderem
uPA	<i>Urokinase type plasminogen activator</i>
uPAR	<i>Urokinase type plasminogen activator receptor</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Die kleine GTPase Ras ist ein zentrales Element bei der Regulation vieler zellulärer Prozesse. Ras ist über Lipidanker in Membranen eingebettet und wird intrazellulär durch das Zusammenspiel von GEF und GAP aktiviert bzw. deaktiviert. Aktiviertes, d.h. GTP-beladenes Ras rekrutiert diverse Effektorproteine über deren Ras-bindende Domäne (RBD) an die Membran, wo diese Proteine aktiviert werden und dann die biologischen Aktivitäten von Ras vermitteln. Aufgrund seiner initialen Rolle bei der zellulären Transformation und Tumorigenese wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um die Funktionalität von Ras zu unterdrücken, und um insbesondere der transformierenden Wirkung infolge einer deregulierten Ras-Aktivität entgegenzuwirken. Dabei zielen bisherige Ansätze vorwiegend auf die Suppression der Expression oder der Prozessierung des Proteins ab.

In dieser Arbeit wird die Etablierung eines neuartigen Ansatzes beschrieben, der es erlaubt die Aktivität des vollständig prozessierten, reifen Ras-Proteins zu modulieren. Hierfür wurden RBD des Ras-Effektors Raf-1 zu Oligomeren aus zwei bzw. drei Domänen verknüpft. Um die Variabilität dieser Konstrukte zu erhöhen, wurden Oligomere bestehend aus der wildtypischen oder mutierten RBD, die eine abgeschwächte Affinität gegenüber Ras-GTP aufweisen, entwickelt. Diese Konstrukte werden zusammenfassend als *multivalent scavengers of oncogenic Ras* (MSOR) bezeichnet. Durch *in vitro* Versuche mit rekombinant hergestellten MSOR konnte gezeigt werden, dass die mutierten Varianten eine geringere Affinität für aktives Ras besitzen als die wildtypischen. Diese Versuche demonstrieren aber vor allem, dass die Stärke der Bindung an Ras-GTP mit der Zahl der jeweils miteinander verknüpften Bindedomänen zunimmt, wodurch die Interaktion stabilisiert wird. Die Wechselwirkung von MSOR und Ras ließ sich auch *in vivo* durch Expression fluoreszenzmarkierter Varianten (eGFP-MSOR) demonstrieren. Durch ektopische Expression verschiedener Ras-Varianten in Cos-7 Zellen konnte die GTP-spezifische Interaktion der eGFP-MSOR mit verschiedenen Mitgliedern der Ras-Subfamilie einschließlich der Ras-Isoformen nachgewiesen werden.

Die Modulation der Ras-Aktivität durch MSOR wurde nach Koexpression von MSOR und Ras in verschiedenen Zelllinien durch die Analyse ausgewählter Ras-vermittelter zellulärer Prozesse studiert. Es wurde gezeigt, dass das wildtypische trimere MSOR-Konstrukt (eGFP-WT-3) die Ras(G12V)-vermittelte ERK2-Phosphorylierung und *MMPI*-Genexpression deutlich supprimieren kann. In Übereinstimmung mit der blockierenden Wirkung der MSOR konnte auch die Invasivität sowie das substratunabhängige Wachstum im Soft-Agar mit eGFP-WT-3 unterdrückt werden. Die Befunde korrelieren mit der Fähigkeit dieses MSOR, einerseits die Ras(G12V)-vermittelte Genexpression matrix-degradierender Enzyme wie Cathepsin L oder uPA aufzuheben und andererseits die Expression pro-apoptotischer Faktoren zu fördern. In diesem Zusammenhang wurde zudem beobachtet, dass die Expression oligomerer wildtypischer MSOR in Cos-7 Zellen zur Apoptose dieser Zellen führt. Die Wirksamkeit der MSOR in den Transformationsassays verdeutlicht deren inhibitorisches Potential gegenüber Ras-vermittelten Effekten.

Viele der publizierten Untersuchungen zur Visualisierung der Ras-Aktivität erfolgten ausschließlich unter Bedingungen der Ras-Überexpression. Dies führt jedoch zu unphysiologischen Effekten, weshalb die Inzidenz einiger Befunde für die *in vivo* Situation fraglich ist. Ein besonders wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis, dass MSOR aufgrund ihrer effektiven Bindung an Ras-GTP auch als Reporter *endogener* Ras-Aktivität eingesetzt werden können. Nach Expression von eGFP-R59A,N64D-3 konnte die EGF- und TPA-induzierte Aktivierung des endogenen Ras anhand der Translokation des Reporters mittels konfokaler Mikroskopie in Echtzeit verfolgt werden. Das endogene Ras wird nach Stimulation nahezu ausschließlich an der Plasmamembran aktiviert. Die in der Literatur postulierte stimulus-abhängige Aktivierung von heterolog exprimiertem Ras im perinukleären Bereich, respektive Golgi-Apparat oder in Endosomen konnte hingegen nicht beobachtet werden. Da eGFP-R59A,N64D-3 ein sensitiver Detektor für endogenes Ras ist, belegt dieses Ergebnis die unterschiedliche räumliche Aktivierung von endogenem gegenüber überexprimiertem Ras.

Die entwickelten MSOR-Konstrukte bieten ein Spektrum neuartiger Moleküle, mit denen sich zum einen die Ras-Aktivierung *in vivo* verfolgen lässt, die andererseits aber auch wirksam mit Ras-spezifischen Effekten interferieren können. Durch den modularen Aufbau der Konstrukte aus einzelnen Domänen, deren Affinität für Ras-GTP variiert werden kann, wird eine zielorientierte Anwendung der MSOR möglich.

2. Einleitung

Mehr als zwanzig Jahre sind seit der Entdeckung und Beschreibung von *ras* (*rat sarcoma*) als einem transformierenden Onkogen vergangen (Malumbres und Barbacid, 2003). Im Laufe der Zeit wurde deutlich, dass ca. 20-25% aller menschlichen Tumoren eine aktivierende Punktmutation in einem der *ras*-Gene (*H-ras*, *K-ras* oder *N-ras*) tragen und daraufhin konstitutiv-aktive Varianten exprimieren (Bos, 1989; Shields *et al.*, 2000). Darüber hinaus gibt es viele Tumoren, die zwar keine aktivierenden Mutationen aufweisen, bei denen Ras aber durch Funktionsverlust von Regulatoren oder Störung anderer Signalwege dauerhaft aktiviert wird. In Tumoren stimuliert aberrant aktives Ras verschiedene maligne Prozesse wie z.B. die Hyperproliferation, Invasivität oder die Neubildung von Gefäßen (Neovaskularisation). Bis heute wurde ein detailliertes Wissen darüber erarbeitet, wie Ras seine tiefgreifenden, biologischen Effekte ausübt. Ras-Proteine gehören zu Familie der kleinen GTPasen und übernehmen essentielle Funktionen bei der Kontrolle verschiedener Signalwege, welche u.a. die „normale“ zelluläre Homöostase regulieren. Dabei ist die Ras-Aktivität in Zellen strikt reguliert. Unterhalb einer bestimmten Schwelle trägt die periodische Aktivierung von Ras zur Homöostase bei (Basalaktivität). Eine leicht erhöhte Aktivität wirkt mitogen und regt die Proliferation der Zellen an, jedoch ohne protektive Signalwege zu aktivieren, die zu einem Wachstumsstopp führen. Dagegen induziert eine stark erhöhte, permanente Aktivität einen Zellzyklus-Arrest, Seneszenz oder Apoptose (Joneson und Bar-Sagi, 1999). Die Untersuchungen von Willingham *et al.* (1980) ergaben, dass Ras in der Innenseite der Plasmamembran, in endozytären Vesikeln nahe der Plasmamembran und kleinen Mengen im Bereich des Golgi-Apparates nicht aber im Zellkern oder anderen intrazellulären Strukturen lokalisiert ist. Die biologische Aktivität von Ras ist elementar an seine Lokalisation in der Plasmamembran geknüpft (Leevers *et al.*, 1994; Stokoe *et al.*, 1994). Kürzlich wurde beschrieben, dass Ras auch intrazellulär, vom Golgi-Apparat aus, verschiedene Signalwege initiieren sowie einen Beitrag zur zellulären Transformation leisten kann (Bivona und Philips, 2003). Diese Entdeckung Ras-vermittelter Signale vom Golgi-Apparat aus wurde gar als zelluläres Gegenstück für „Leben auf dem Mars“ betitelt (Di Fiore, 2003). Obwohl damit bereits der Aufbruch in neue Sphären angekündigt wird, ist das „irdische“ Verständnis der Ras-Signaltransduktion jedoch keineswegs vollständig. So ist die entscheidende Frage, in wie weit diese Beobachtungen auch auf *in vivo* Bedingungen übertragbar sind, bislang unbeantwortet. Die Einbindung von Ras in die verschiedensten, zellbiologischen Prozesse ist zwar beschrieben- der Beitrag des *endogenen* Ras daran aber nur wenig erforscht. Ebenso ist beispielsweise ungeklärt, wie die räumlich-zeitliche Ras-Aktivierung durch die Ca^{2+} -Oszillation in der Zelle erfolgt. Und auch die spezifische Wechselwirkung einzelner Ras-Proteine untereinander bzw. mit diversen Effektoren als Grundlage spezifischer zellulärer Prozesse/Effekte ist bisher nur wenig verstanden. Das liegt vor allem auch daran, dass spezifische und effiziente Reporter für die Detektion der *endogenen* Ras-Aktivierung in lebenden Zellen fehlen.

2.1. Allgemeine Betrachtungen zur Ras-Familie

Die Ras-Proteine waren die ersten Mitglieder einer heute über 150 Proteine umfassenden Superfamilie von kleinen GTPasen, so bezeichnet um sie von den heterotrimeren G-Proteinen abzugrenzen. Diese Proteine wirken als molekulare Schalter: im GTP-gebundenen Zustand sind sie „angeschaltet“, d.h. befähigt nachgeschaltete Effektoren zu binden und zu aktivieren; im GDP-gebundenen Zustand hingegen sind sie „abgeschaltet“ und damit inaktiv. Diese Prozesse werden intrazellulär durch das Zusammenspiel von *guanine nukleotide exchange factors* (GEF) und *GTPase-activating proteins* (GAP) stark beschleunigt. Letztere stimulieren die GTP-Hydrolyse und somit die rasche Inaktivierung der GTPase. Auf der anderen Seite katalysieren GEF die Freisetzung des gebundenen Nukleotids und ermöglichen dadurch die Beladung mit GTP, dem in der Zelle überwiegenden Guanin-Nukleotid (Abschnitt 2.3.). Der Austausch von GDP gegen GTP führt zu einer Konformationsänderung im Protein, die eine spezifische Interaktion mit nachgeschalteten Effektoren ermöglicht (Abschnitt 2.3.).

2. Einleitung

Die Ras-Superfamilie wird basierend auf der Struktur in fünf Familien unterteilt: Ras, Rho, Ran, Rab und Arf. Ras-Proteine übertragen die Aktivität von u.a. Rezeptor- und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK bzw. NRTK) auf ein breitgefächertes Arsenal von Effektor-Signalwegen. Diese wiederum steuern, abhängig vom Zelltyp, dem Kontext oder den Konditionen, Prozesse wie die zelluläre Proliferation (Abschnitt 2.6.1.1.), Apoptose (Abschnitt 2.6.1.2.), Transformation (Abschnitt 2.6.), Seneszenz (Lee *et al.*, 1999) oder Differenzierung (Ridley und Hall, 1992). Die Rho-Familie (Rho-Proteine, Rac1/2/3, Cdc42, Tc10, Rnd1/2) ist u.a. in die Organisation des Zytoskeletts involviert. Dabei steuern Rac und Rho die Bildung sogenannter *ruffles*, unregelmäßig fluktuierender Ausstülpungen am Rand der Zelloberfläche, die durch Polymerisation von Aktin an der Innenseite der Plasmamembran entstehen und durch Mitogene wie EGF, PDGF, Insulin, TPA induziert werden (Ridley und Hall, 1992). *Ruffles* formieren sich aus nicht adhärennten Lamellipodien und schieben sich rückwärtig auf der dorsalen Oberfläche dem Zellkörper entgegen. Diese Strukturen können sich aber auch unabhängig von Lamellipodien auf der dorsalen Seite ausbilden. Welche genauen Funktionen diese Strukturen allerdings haben, ist bislang nicht geklärt, aber möglicherweise stehen sie mit der Makropinozytose in Verbindung. Aktiviertes Ras ist in der Lage *membrane ruffling* und Makropinozytose auszulösen (Bar-Sagi und Feramisco, 1986). Die Morphologie von *ruffles* variiert abhängig vom eingesetzten Zelltyp und Stimulus (Nishiyama *et al.*, 1994). Rho stimuliert zudem die Bildung von *stress fibres*, während Cdc42 die Formation von Filopodien induziert. Ran steuert den nukleären Import bzw. Export von Proteinen. Die Mitglieder der Rab- und Arf-Familie wiederum regulieren den intrazellulären Vesikeltransport (Takai *et al.*, 2001). Trotz der individuellen Funktionen der einzelnen Familien, gibt es doch eine mannigfaltige Kooperation zwischen verschiedenen Mitgliedern einer Familie und auch zwischen den distinkten Familien im Hinblick auf die Ausbildung zellulärer Phänotypen. So kooperiert beispielsweise die Rho- mit der Ras-Familie bei der zellulären Transformation (Burridge und Wennerberg, 2004).

Die Ras-Familie selbst besteht aus mindestens 21 Mitgliedern: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und 4B, R-Ras, R-Ras2/TC21, R-Ras3/M-Ras, Rap1A, Rap1B, Rap2A, Rap2B und Rap2C, Rit, Rin, Rheb, Noey2, DiRas1/Rig und DiRas2, E-Ras, RalA und RalB, RasD1/DexRas und RasD2/Rhes. Viele dieser Proteine sind bislang kaum untersucht und über ihre Eigenschaften und Funktionen ist wenig bekannt. Die verschiedenen Mitglieder der Ras-Familie teilen sich in verschiedenen Zellsystemen einige biologische Eigenschaften mit Ras, haben aber auch ganz andere Funktionen (Suzuki *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1996). So sind auch Mitglieder der R-Ras-Subfamilie (R-Ras, M-Ras, TC21) in der Lage verschiedene Zelltypen zu transformieren oder die Differenzierung zu beeinflussen (Cox *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1995; Kimmelman *et al.*, 2002).

Säugerzellen verfügen über drei funktionelle *ras*-Protoonkogene, *H-ras*, *N-ras* und *K-ras*. Diese kodieren vier Proteine: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B, die als Ras-Isoformen oder p21^{Ras} bezeichnet werden. K-Ras4A und K-Ras4B entstehen durch alternatives Spleißen von *K-ras* und unterscheiden sich im C-Terminus, was sich auf deren intrazelluläre Lokalisation auswirkt (Abschnitt 2.2.). Die Transkription von *K-ras4B* ist in manchen Geweben um das 10-20-fache gegenüber *K-ras4A* erhöht, in anderen wie dem Kolon aber vergleichbar (Fiorucci und Hall, 1988; Pells *et al.*, 1997). Auf Proteinebene sind die ersten 80 Aminosäuren (AS) zwischen den Ras-Isoformen identisch, die nächsten 80 Reste sind bis zu 85% konserviert, während im Bereich des C-Terminus lediglich 10-15% der 25 AS konserviert sind (Abb. 1A). Aufgrund dessen wird der C-Terminus als hypervariable Region (HVR) bezeichnet. Die HVR vermittelt den Transport der Ras-Proteine zur Plasmamembran und deren Mikrolokalisierung (s. Abschnitt 2.2.). Die Bindungsstellen für GTP, GEF, GAP und Effektorproteine hingegen befinden sich alle im Bereich des hochkonservierten N-Terminus der Ras-Proteine. Trotz der starken strukturellen Homologie kristallisiert sich immer deutlicher heraus, dass die einzelnen Ras-Isoformen individuelle Funktionen innehaben, die partiell auch überlappen können (s. Abschnitt 2.6.). Diese spiegeln sich auf Ebene der Signaltransduktion aber auch Transformation (Tabellen A1 und A2) und Tumorigenese wieder (Malumbres und Pellicer, 1998). So sind z.B. in diversen Tumortypen verschiedene *ras*-Gene mutiert (Bos, 1989). *Knockout*-Mäuse der verschiedenen Ras-Isoformen prägen unterschiedliche Phänotypen aus. Weder *N-ras* noch *H-ras* allein oder in Kombination sind essentiell für die normale Entwicklung, Fertilität oder Hämatopoese in Mäusen (Esteban *et al.*, 2001; Umanoff *et al.*, 1995). Auch Mäuse ohne funktionelles M-Ras entwickeln sich weitgehend normal und sind fruchtbar (Ehrhardt *et al.*, 2002). Dagegen ist K-Ras essentiell für die murine Embryonalentwicklung. Das zeigt auch, dass weder H-Ras noch N-Ras die Funktion(en) von K-Ras

kompensieren können (Koera *et al.*, 1997). *K-ras-knockout* Mäuse sterben im Uterus durch massiven Zelltod neuronalen oder Herzgewebes. Bis jetzt ist allerdings unklar, ob diese spezifische Eigenschaft von K-Ras auf der überwiegenden Expression dieser Isoform während der Entwicklung beruht (Pells *et al.*, 1997) oder ob es eine K-Ras spezifische Funktion widerspiegelt. N-Ras gilt als ein elementarer Faktor für das Überleben von Fibroblasten (s. Abschnitt 2.6.1.2.) und spielt eine wichtige Rolle für die Funktion von T-Zellen. *N-ras* defiziente T-Zellen weisen z.B. eine geringe Anzahl CD8⁺-positiver Zellen auf, die Proliferation ist vermindert und die IL-2 Produktion nach Aktivierung der Zellen signifikant erniedrigt (de Castro *et al.*, 2003). Die Gründe für diese spezifischen Funktionen der Ras-Isoformen liegen einmal in ihrer Lokalisation in unterschiedlichen Mikrodomänen der Plasmamembran (s. Abschnitt 2.2.) und neueren Studien zufolge in einer differentiellen subzellulären Verteilung (Bivona und Philips, 2003), die zu einem unterschiedlichen Profil in der Aktivierung der Effektoren führt.

2.2. Prozessierung und Lokalisation von Ras

- ***Posttranslationale Modifikationen steuern den Transport zur Plasmamembran***

Nach der Synthese reichert sich Ras zunächst im Zytosol an, wobei für MDCK Zellen die Halbwertszeit dieses Anteils bei ca. 2h liegt. Davon erscheinen weniger als 10% in Membranfraktionen, was vermuten lässt, dass die Membranrekrutierung überraschend ineffizient ist und der Hauptteil des neusynthetisierten Ras ohne Membranbindung abgebaut wird. In MDCK Zellen ist der Anteil von Ras im Zytosol und der Plasmamembran ungefähr gleich, während er für den Golgi-Apparat ca. 3x höher liegt (Choy *et al.*, 1999). Der C-Terminus der p21^{Ras}-Proteine (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und 4B) wird posttranslational mehrfach modifiziert, was essentiell für den gerichteten Transport zur Plasmamembran ist. Zunächst wird im Zytosol an den Cystein-Rest (C186 in H-Ras) des C-terminalen CAAX-Motivs über eine irreversible Thioether-Bindung ein Farnesylrest geknüpft. Dieser Schritt ist entscheidend für die Funktion von Ras und die weiteren Prozessierungsschritte, denn die Proteine werden über diesen Membrananker in die Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eingebaut (Choy *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 1999) werden die drei letzten Aminosäuren des CAAX-Motivs (AAX) durch die Endopeptidase Rce1 (*Ras and a-factor converting enzyme*) abgespalten. Danach wird der Cysteinrest durch Icmt1 (Isoprenyl-carboxymethyl-Transferase 1) methyliert, wodurch der C-Terminus von Ras hydrophober wird und dadurch wohl auch spezifische Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht werden. Rce1 und Icmt1 sind wichtig für die korrekte Translokalisierung von Ras zur Plasmamembran, dessen biologische Aktivität (Bergo *et al.*, 2000; Bergo *et al.*, 2002; Choy *et al.*, 1999) sowie für die murine Embryonalentwicklung, da eine vollständige Deletion von *Rce1* oder *Icmt1* zu einem embryonal-letalen Phänotyp führt (Bergo *et al.*, 2001; Kim, 1999). Für den Transport aus dem Endomembransystem zur inneren Seite der Plasmamembran (Willingham *et al.*, 1980), ist ein noch zweites Transportsignal notwendig (Hancock *et al.*, 1990). Dieses besteht bei H-Ras, N-Ras und K-Ras4A aus Palmitoylierungen an einem (N-Ras, K-Ras4A) oder zwei weiteren Cysteinresten (C181 und C184 bei H-Ras) und erfolgt am Übergang vom ER zum Golgi-Apparat (Abb. 1A). Der Austausch von Cystein gegen Serin an diesen Positionen führt zur Akkumulation der mutierten Proteine im ER/Golgi-Apparat. Die vollständig prozessierten Formen von H-Ras und N-Ras gelangen anschließend auf dem klassischen, sekretorischen Transportweg zur Plasmamembran (Apolloni *et al.*, 2000). Die Palmitoylierung allerdings stellt eine instabile Modifikation dar mit einer Halbwertszeit von weniger als 10min für H-Ras-GTP (Baker *et al.*, 2003). Einer neuen Studie zufolge wird darüber ein Zyklus angetrieben, der zu einem schnellen Austausch von H- und N-Ras zwischen Plasmamembran und Golgi-Apparat führt. Durch Depalmitoylierung werden H-bzw. N-Ras von der Plasmamembran gelöst, assoziieren aber über den Farnesylanker mit dem Golgi-Apparat. Dort werden sie wiederum palmitoyliert und gelangen auf dem sekretorischen Transportweg wiederum zur Plasmamembran (Rocks *et al.*, 2005). K-Ras4B gelangt zwar wie die anderen Isoformen ins Endomembransystem, reichert sich aber dort nicht an. Das liegt vermutlich an einem unterschiedlichen Transportmechanismus und einer daraus resultierenden anderen Kinetik für den Übergang vom ER/Golgi zur Plasmamembran (Choy *et al.*, 1999). K-Ras4B besitzt, anders als die anderen Isoformen, N-terminal vom Farnesyl-modifizierten Cysteinrest gelegen eine polybasische Region (PBR) aus mehreren Lysinresten. Dieser Abschnitt ermöglicht auch die Interaktion des

Proteins mit Mikrotubuli (Chen *et al.*, 2000), die als mögliche Strukturen für den Transport von K-Ras4B zur Plasmamembran diskutiert werden (Thissen *et al.*, 1997). Aufgrund der engen Nachbarschaft von ER und Plasmamembran in den meisten Zellen könnten die K-Ras4B-Moleküle auch durch die PBR-vermittelte Diffusion entlang eines elektrostatischen Gradienten zur negativ geladenen Plasmamembran gelangen (Roy *et al.*, 2000). Hierbei wirkt die PBR von K-Ras4B nicht als ein spezifisches Transportsignal, sondern liefert die nötige Ladung um die Diffusion anzutreiben.

- ***Mikrolokalisierung der Ras-Isoformen innerhalb der Plasmamembran***

Bislang ist nicht geklärt, wie der Einbau der p21^{Ras}-Proteine in die Plasmamembran erfolgt und ob dies beispielsweise durch spezielle Plasmamembran-ständige Rezeptoren vermittelt wird (Silvius, 2002). Innerhalb der Plasmamembran konzentrieren sich die Ras-Proteine aber in verschiedenen Mikrodomänen (Prior *et al.*, 2003). Hierbei sind ca. 50% des GDP-gebundenen H-Ras in sogenannten *lipid rafts* lokalisiert. Dabei handelt es sich um Strukturen mit einem Radius von ca. 22nm, die einen hohen Anteil an Sphingolipid-Cholesterol Komplexen aufweisen (Simons und Ikonen, 1997). Die Interaktion von H-Ras mit *lipid rafts* wird durch den Farnesyl-Lipidanker und die Palmitoylierung vermittelt (Prior und Hancock, 2001). H-Ras befindet sich allerdings in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen *lipid rafts* und *non-raft* Bereichen der Plasmamembran, wobei das Gleichgewicht durch die GTP-Beladung reguliert wird (Prior und Hancock, 2001). Die GTP-Beladung von H-Ras wirkt nämlich der Affinität für *rafts* entgegen und ein Abschnitt innerhalb der HVR vermittelt stabilen Einbau von H-Ras-GTP in *non-raft* Bereiche (Rotblat *et al.*, 2004). Dort rekrutiert aktives H-Ras verschiedene Proteine und formt so eine Mikrodomäne, die durch weitere zytosolische Komponenten oder Membranbestandteile stabilisiert wird (Hancock, 2003). Für die laterale Segregation von aktivem H-Ras scheint Galectin-1 ein wichtiges Protein zu sein. Einerseits wird die GTP-Beladung von H-Ras bei Überexpression von Galectin-1 stabilisiert (Elad-Sfadia *et al.*, 2002), während die Hemmung der Galectin-1 Expression die Gruppierung von H-Ras(G12V) an der Plasmamembran verhindert und zur partiellen Mislokalisierung im Zytosol führt (Prior *et al.*, 2003). Darüber hinaus wird die H-Ras(G12V)-vermittelte Transformation durch Inhibition von Galectin-1 geblockt (Paz *et al.*, 2001). Der Austausch von H-Ras zwischen *lipid rafts* und *non-raft* Bereichen ist zudem wichtig für die Aktivierung von Effektoren und die biologische Aktivität von H-Ras. Mutationen in der HVR von Ras, die zur Akkumulation der aktivierten Form in *rafts* führen, schränken die Fähigkeit Raf-1 und PI(3)K zu aktivieren ein und verhindern die Differenzierung von PC12 Zellen. Raf-1 kann allerdings inner- und außerhalb von *rafts* aktiviert werden (Chen und Resh, 2001; Prior *et al.*, 2001). Die Aktivierung von Raf ist ein mehrstufiger Prozess, der wahrscheinlich durch die transiente Assoziation von Ras mit *rafts* eingeleitet wird und sich an anderen Stellen der Plasmamembran vervollständigt (Hancock, 2003).

Die Mikrolokalisierung von K-Ras4B hängt vom Farnesylrest und der PBR ab. Dabei verteilt sich GDP- bzw. GTP-beladenes K-Ras4B in verschiedenen *non-raft* Mikrodomänen. Diese sind mit einem Radius von ca. 16nm kleiner als die für H-Ras-GTP und diese Isoformen kolokalisieren auch nicht in diesen *non-raft* Abschnitten (Prior *et al.*, 2003). Über seinen polybasischen C-Terminus interagiert K-Ras4B eventuell mit sauren Phospholipiden wie PI(4,5)P₂ und Phosphatidylserin in der Plasmamembran, die eine „saure“ Mikrodomäne ausbilden (Murray *et al.*, 1999). Die Interaktion von K-Ras4B mit PI(4,5)P₂ wird aber durch die PKC-vermittelte Phosphorylierung der PBR oder Anbindung von Ca²⁺/Calmodulin daran aufgehoben. Letzteres blockiert außerdem die GTP-Beladung von K-Ras4B und verhindert die Aktivierung von Signalwegen (Villalonga *et al.*, 2001 und 2002).

Durch Einzelmolekülanalyse konnten Murakoshi *et al.* (2004) zeigen, dass die Mobilität von H-Ras und K-Ras4B nach der Aktivierung deutlich herabgesetzt wird, wobei ca. 50% der aktivierten Ras-Moleküle gar immobil sind. An dieser Immobilisierung ist auch das Aktin-Zytoskelett beteiligt. Durch Rekrutierung einer Reihe von Interaktionspartnern und Gerüstproteinen organisiert die kleine GTPase Rab5 die Zusammensetzung des Endosoms (Zerial und McBride, 2001). In Analogie dazu unterbreiten Murakoshi *et al.* (2004) ein Modell, wonach die aktivierten Ras-Moleküle durch Ras-spezifische Gerüstproteine wie SUR-8, spred und Galectin-1 innerhalb eines Aktinnetzwerkes an der Membran gebunden werden. Dadurch wird die kooperativen Bildung eines transienten Signalkomplexes initiiert, der neben Ras-GTP auch Effektoren

2. Einleitung

wie Raf-1 und Ras-GAP Proteine beinhaltet. Tatsächlich konnte eine vom Aktin-Zytoskelett-abhängige Immobilisierung von p120RasGAP nach EGF-Stimulation aufgezeichnet werden (Murakoshi *et al.*, 2004). N-Ras befindet sich in der Plasmamembran in einem latenten Komplex mit Raf-1 und PKC ϵ . Wahrscheinlich reagiert dieser Komplex auf proliferative Signale und setzt diese in die Aktivierung der MAPK um (Hamilton *et al.*, 2001). Möglicherweise variiert innerhalb der verschiedenen Mikrodomänen auch die Verteilung von Effektoren oder Kofaktoren derselben, die dadurch Ras-Isoform-spezifisch stimuliert werden. K-Ras4B ist z.B. ein stärkerer Aktivator von Raf-1 als H-Ras (Yan *et al.*, 1998). Daher sind vermutlich Kofaktoren der Raf-1-Aktivierung wie z.B. Phosphatidylserin stärker in Mikrodomänen von K-Ras als H-Ras angereichert (Prior *et al.*, 2003). Des Weiteren ist K-Ras4B(G12V) ein viel stärkerer Aktivator von Rac als H-Ras(G12V) und stimuliert auch das *membrane ruffling*, die Pinozytose und die Motilität viel stärker. Diese Phänotypen werden vollständig durch den C-Terminus und folglich durch die Membranlokalisation hervorgerufen, denn eine H-Ras-Chimäre mit der HVR von K-Ras4B verhält sich identisch wie K-Ras4B (Walsh und Bar-Sagi, 2001). Demnach verändert die unterschiedliche Lokalisation und Verteilung der Ras-Isoformen in Mikrodomänen der Plasmamembran den Gebrauch von Effektoren. Dies bietet eine adäquate Erklärung dafür, wie diese stark homologen Proteine spezifische Signalwege selektiv aktivieren und ihre verschiedenen biologischen Effekte vermitteln (Tabelle A2).

2.3. Regulation der Ras-Aktivität durch GEF und GAP

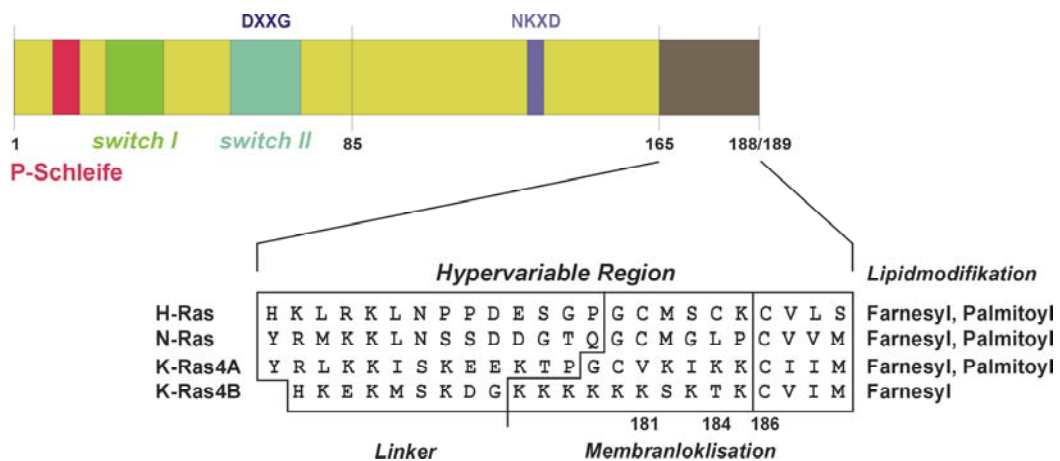
- ***Die G-Domäne als strukturelle Basis der Schalterfunktion***

In Ras findet sich eine minimale Struktureinheit, die allen GTPasen wie den α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, dem Elongationsfaktor Tu oder auch Dynamin-ähnlichen Proteinen eigen ist. Dieses universelle Strukturmotiv, die sogenannte G-Domäne, vermittelt die Bindung von GTP, dessen Hydrolyse sowie Protein-Protein-Interaktion (Abb. 1B). Die Spezifität für Guanin wird wesentlich durch einen Alanin-Rest determiniert, die Nukleotidbase wird durch das N/TKXD-Motiv gebunden und der β -Phosphatrest des GDP bzw. die $\beta\gamma$ -Phosphatreste des GTP werden durch die P-Schleife (Rest 10-17) kontaktiert. Während die Struktur der G-Domäne zwischen verschiedenen Ras-ähnlichen Proteinen im GDP-gebundenen Zustand sehr stark variiert, ist sie im GTP-gebundenen sehr ähnlich. Die Konformationsänderungen im Zuge der Aktivierung umfassen zwei Regionen, die als *switch I* (AS 32-38 in Ras) und *II* (AS 59-67 in Ras) bezeichnet werden. Gly60 in *switch II* und Thr35 in *switch I* interagieren im GTP-gebundenen Zustand über Wasserstoffbrücken mit den Sauerstoffatomen des γ -Phosphatrestes. Zudem ist Thr35 an der Bindung von Mg^{2+} beteiligt. Effektoren interagieren spezifisch mit der veränderten Konformation der *switch I*-Region. Dies führt zu einer verringerten Nukleotiddissoziation, schränkt aber nicht die intrinsische GTP-Hydrolyse-Aktivität ein. An der GTP-Hydrolyse sind *switch I* und *switch II* ebenfalls beteiligt, wobei beide Schalter wie eine Klammer wirken, die das γ -Phosphat „festhalten“. Nach der Hydrolyse-Reaktion springt diese Klammer auf (*loaded spring mechanism*), wobei der γ -Phosphatrest freigesetzt wird und die G-Domäne in die GDP-Form übergeht (Vetter und Wittinghofer, 2001).

Ras besitzt als GTPase selbst eine intrinsische Hydrolyseaktivität (basale GTPase Aktivität), die zur Umwandlung von GTP in GDP führt. Die Geschwindigkeit der basalen Hydrolyse ist allerdings sehr niedrig, die Geschwindigkeitskonstanten liegen im Bereich von 10^{-4} sec^{-1} (Gideon *et al.*, 1992). Deshalb stellt Ras eher ein GTP-bindendes Protein als ein Enzym dar. Die Proteine der GEF- bzw. GAP-Familien beschleunigen gezielt die Austauschaktivität des gebundenen Nukleotids um das ca. 10^5 -fache (Gideon *et al.*, 1992).

2. Einleitung

A



B

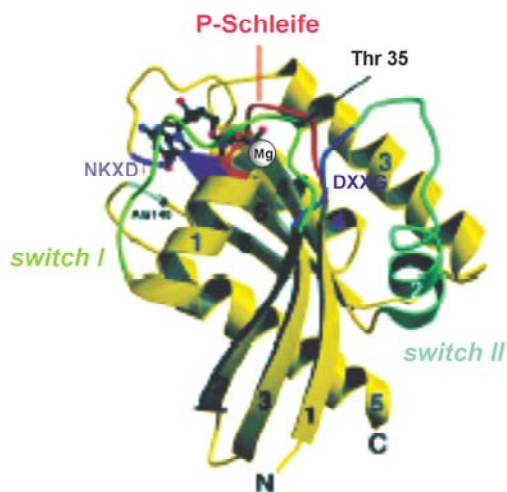


Abb. 1. **Die Struktur von Ras.** (A) Die Sequenz der Ras-Proteine ist im Bereich des N-Terminus hoch, im Bereich des C-Terminus aber nur sehr wenig konserviert. Letzterer wird als hypervariable Region (HVR) bezeichnet, da die Sequenzidentität zwischen den Ras-Isoformen lediglich 10-15% beträgt. Die Membranassoziation der Ras-Proteine wird durch die CAAX-Box und vorgeschaltete Signalsequenzen vermittelt. Diese umfassen Palmitoylierungsstellen bei H-Ras (C181,C184), N-Ras (C181), K-Ras4A (C180) oder eine polybasische Domäne (PBR) in K-Ras4B (unterstrichen). Abb. modifiziert nach Prior und Hancock (2001). (B) Im N-Terminus von Ras liegt die G-Domäne (in gelb). Dieses universelle Strukturmotiv enthält Regionen (N/TKXD-Motiv, *switch I* und *II*), welche die Bindung des GTP und die Interaktion mit von GEF, GAP und Effektorproteinen an Ras ermöglichen. (nach Vetter und Wittinghofer, 2001)

- **GEF fungieren als Aktivatoren von Ras**

Es gibt eine große Zahl von Austauschfaktoren, welche durch die verschiedensten Stimuli aktiviert werden können. Zu diesen gehören die Phosphorylierungen von Proteinen (z.B. Rezeptoren) und Lipiden oder *second messenger* wie Kalzium. Die Reaktion der RasGEF auf die diversen Signale wird durch eine Reihe von verschiedenen Strukturmotiven ermöglicht (Ehrhardt *et al.*, 2002). Die Komplexität der Ras-Signalübertragung erhöht sich u.a. auf Ebene der RasGEF. Denn mit einigen wenigen Ausnahmen wirken die RasGEF auf multiple Mitglieder der Ras-Subfamilie und manche darüber hinaus auch auf andere Proteine der Ras-Superfamilie. Deswegen werden RasGEF im weiteren Text als GEF bezeichnet. Mit einer Ausnahme aktivieren alle GEF aus Säugerzellen Ras durch die katalytische CDC25 Domäne. Diese ist homolog zur minimalen Ras-Aktivierungsdomäne des GEF CDC25 aus *S. cerevisiae*. Die GEF unterscheiden sich in ihrer Spezifität (Substratspektrum), die u.a. durch Strukturelemente des/der Substrate (C-Terminus, Prenylierung) definiert wird.

Die GEF Sos1/2 oder RasGRF1/2 besitzen neben der CDC25-Domäne auch eine DH-Domäne (Dbl-homologe Domäne), die den Nukleotidaustausch von Proteinen der Rho-Familie katalysiert. Damit integrieren diese Proteine die Aktivierung von Mitgliedern der Ras- und Rho-Familie. Sos1/2 wird infolge einer Aktivierung von RTK an die Plasmamembran rekrutiert und katalysiert dort die GTP-Beladung der p21^{Ras}-Proteine (H-

2. Einleitung

Ras, N-Ras, K-Ras4A und 4B) sowie von M-Ras aber nicht von R-Ras oder TC21 (Nielsen *et al.*, 2001). RasGRF1 (auch als CDC25^{Mm} bezeichnet) aktiviert selektiv H-Ras, M-Ras und R-Ras nicht jedoch N-Ras oder K-Ras4B (Jones und Jackson, 1998; Ohba *et al.*, 2000). Die Fähigkeit von RasGRF1 H-Ras nicht aber K-Ras4B zu aktivieren hängt von AS-Resten im C-Terminus von Ras ab (Jones und Jackson 1998). Einige der GEF ermöglichen auch die Reaktion auf Änderungen im intrazellulären Ca²⁺-Spiegel. So besitzt Ras-GRF1 neben der C-terminal gelegenen CDC25- eine DH- und PH-Domäne sowie ein IQ-Motiv. Letzteres ist ein Strukturmotiv, das die Interaktion mit Calmodulin vermittelt. RasGRF2 aktiviert H-Ras nicht aber R-Ras (Gotoh *et al.*, 2001). Arozarena *et al.* (2004) konnten zeigen, dass RasGRF1 und RasGRF2 H-Ras an der Plasmamembran und dem ER, nicht jedoch am Golgi-Apparat aktivieren. Kalzium- und DAG (Diacylglycerol)-bindende Domänen sind charakteristisch für die vier Mitglieder der RasGRP-Familie. Diese Proteine binden DAG über die C1-Domäne, was die Translokation an Plasma- und Endomembranen ermöglicht. RasGRP1 (auch als CalDAG-GEFII bezeichnet) aktiviert H-Ras, N-Ras, K-Ras4B, R-Ras, TC21, schwach M-Ras und Rap1A (Ohba *et al.*, 2000), während RasGRP2 den Nukleotidaustausch von N-Ras und K-Ras4B stimuliert, nicht jedoch von H-Ras. RasGRP3 (CalDAG-GEFII) aktiviert H-Ras, R-Ras, Rap1A und 2A, aber nicht RalA (Yamashita *et al.*, 2000). RasGRP4 aktiviert H-Ras *in vitro*, was durch die Anwesenheit von Kalzium blockiert wird (Reuther *et al.*, 2002). Epac1 und 2 werden durch cAMP reguliert und fungieren wahrscheinlich als Rap-spezifische GEF (Kawasaki *et al.*, 1998).

SmgGDS war der erste in Säugern identifizierte Austauschfaktor und besitzt die breiteste Spezifität (Kaibuchi *et al.*, 1991). Dieses Protein weist als einziger bekannter GEF eine Reihe von Armadillo (ARM)-Motiven auf. Mitglieder der ARM-Proteinfamilie pendeln zwischen Zellkern und Zytoplasma, was auch für SmgGDS gefunden wurde (Lanning *et al.*, 2003). SmgGDS besitzt jedoch keine CDC25-ähnliche Domäne und aktiviert offenbar nur kleine GTPasen mit einer PBR wie K-Ras4B, Rap1A und Ral, RhoA, Cdc42 und Rac1 (Takai *et al.*, 1993). H-Ras, N-Ras oder K-Ras4A, die keine PBR tragen, werden dagegen nicht aktiviert.

- **Die GEF-Reaktion**

Die GEF-Proteine binden zunächst GDP-beladenes Ras. Das Nukleotid wird anschließend freigesetzt, wobei die Austauschfaktoren zunächst einen nukleotidfreien Zustand stabilisieren, der durch den GTP-gebundenen abgelöst wird. Abschließend dissoziiert der GEF. Die einzelnen Reaktion erfolgen schnell und sind reversibel. Die Austauschfaktoren interagieren mit *switch I* und *II* (Quilliam *et al.*, 1996). Während das Nukleotid im GTP/GDP-gebundenen Zustand zwischen *switch I* und der P-Schleife eingebettet liegt, ist *switch I* im Ras-GEF-Komplex vollständig von der Nukleotid-Bindestelle entfernt. Wahrscheinlich wichtiger für die Reaktion ist jedoch die Interaktion der GEF mit der P-Schleife und dem Mg²⁺-bindenden Bereich. Dabei besetzen zwei Reste des GEF direkt die Magnesium- und Phosphatbindestelle, wodurch die Bindung von Metallionen inhibiert wird. Zudem führt der Zutritt des GEF zu einer Umverteilung von Wasserstoffbrücken der P-Schleife- weg vom β -Phosphatrest hin zum GEF. Dadurch wird die feste Bindung des β -Phosphatrestes destabilisiert und die Affinität des gesamten GDP-Moleküls stark geschwächt. Die an der Koordination der β - und γ -Phosphatreste beteiligten Aminosäuren Gly60 (*switch II*) und Lys16 verschieben sich nach Bindung des GEF ebenfalls, so dass sie keine Wasserstoffbrücken zu den Phosphatgruppen ausbilden können. Letztlich wird die Wasserstoffbrückenbindung von Arg68, über welche die Methylgruppe von Ala59 aus der Magnesiumbindestelle herausgehalten wird, durch Bindung an einen Glu-Rest des GEF umgelagert. Dadurch ist Ala59 nicht so fixiert und dessen Methylgruppe dreht sich in die Position, an der das Magnesiumion im Nukleotidkomplex gebunden ist. Wie genau der Austritt des GDP erfolgt ist jedoch anhand der vorhandenen Strukturen bislang nicht zu erklären. Der Komplex zwischen Ras und dem Austauschfaktor ist auch ohne gebundenes Nukleotid sehr stabil und dissoziiert erst nach Nukleotidbindung. Die Affinität zwischen Sos1 und nukleotidfreiem Ras ist sogar um einige Größenordnungen höher als für Ras-GTP/GDP. Die prinzipielle Rolle der GEF ist es also den Austritt des Ras-gebundenen GDP zu ermöglichen. Dabei scheint der Austauschfaktor keinen Einfluss darauf zu nehmen, ob in der Folge GTP oder GDP gebunden wird. Da jedoch die intrazelluläre Konzentration von GTP gegenüber GDP etwa 10x höher ist, erfolgt die Beladung von Ras bevorzugt mit GTP (Boriack-Sjodin *et al.*, 1998; Vetter und Wittinghofer, 2001).

2. Einleitung

- **GAP beschleunigen die Inaktivierung von aktiviertem Ras**

Es gibt mindestens sechs verschiedene GAP Proteine für Ras, die ähnlich wie GEF auf eine ganze Reihe sehr unterschiedlicher Signale reagieren (Donovan *et al.*, 2002). RasGAP beschleunigen die GTP-Hydrolyse um das bis zu 10^5 -fache und diese Reaktion ist grundsätzlich irreversibel. Die Hydrolyserate z.B. von N-Ras beträgt $1 \cdot 10^{-4}$ bis $3,4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und wird durch NF1 auf $19,5 \text{ s}^{-1}$ erhöht (Neal *et al.*, 1988; Phillips *et al.*, 2003). Dabei interagieren GAP gleichermaßen wie die RBD der Effektoren (Abschnitt 2.4.3.) mit der *switch I* von Ras nahe dem gebundenen GTP (Scheffzek *et al.*, 1997).

p120RasGAP wird durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über seine C2-Domäne (eine Ca^{2+} -abhängige Phospholipid-bindende Domäne) zu Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) rekrutiert und deaktiviert Ras an der Plasmamembran (Pawson, 2004), agiert aber gleichfalls als Ras-Effektor (Adari *et al.*, 1998). GAP1^m bindet hochaffin PI(3,4,5)P₃ an der Plasmamembran (Lockyer *et al.*, 1999) und an G_{α12} (Jiang *et al.*, 1998) und verbindet so möglicherweise heterotrimere und monomere G-Proteine. CAPRI (*Ca²⁺-promoted Ras inactivator*) besitzt ebenfalls C2-Domänen (Tandem-Struktur am N-Terminus) und wird nach Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an die Plasmamembran rekrutiert, wo es Ras inaktiviert und so die Aktivierung des MAPK-Signalweges unterdrückt (Bivona *et al.*, 2003). Es gibt jedoch auch intrazellulär aktive RasGAP, wie z.B. Neurofibromin (NF-1), das *in vivo* auch mit Mitochondrien (Roudebush *et al.*, 1997) und Mikrotubuli (Gregory *et al.*, 1993) assoziiert ist. Die hier vorgestellten GAP sind alle gegenüber den Ras-Isoformen, M-Ras, R-Ras und TC21 nicht jedoch gegenüber Rap1A aktiv (Ohba *et al.*, 2000).

- **Die GAP-Reaktion**

Der Reaktionsverlauf der GAP-vermittelten GTP-Hydrolyse kann am Beispiel von NF-1 wie folgt beschrieben werden (nach Phillips *et al.*, 2003):



Bislang fehlen dreidimensionale Strukturen des initialen GAP-Ras-GTP und des finalen GAP-Ras-GDP Komplexes um den vollständigen Reaktionsverlauf strukturell nachzuvollziehen. Insbesondere eine finale Struktur sollte zeigen, ob zuerst GAP oder P_i aus dem Komplex austritt. Ein wichtiges Element vieler (z.B. NF-1), aber nicht aller GAP ist ein Argininrest (Arginin-Finger-Motiv), der in die aktive Seite des Ras-Proteins ragt (Ahmadian *et al.*, 1997; Daumke *et al.*, 2004). Dessen genaue Rolle bei der Hydrolyse wurde in Echtzeit durch Allin *et al.* (2001) mittels Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie analysiert. Dabei stehen der Arginin-Finger (Arg789 in p120GAP) sowie Lys16 von Ras in enger räumlicher Nähe zum β-Phosphatrest des Ras-gebundenen GTP (Abb. 2). Durch die positiven Ladungen der Seitenketten und das vorhandene Mg²⁺ werden die negativen Ladungen vom γ-Phosphatrest in Richtung der beiden „freien“ Sauerstoffatome des β-Phosphatrestes verschoben. Diese Ladungsverschiebung stellt einen dissoziativen Übergangszustand dar. In der Folge kommt es zu einem nukleophilen Angriff eines an Ras-gebundenen Wassermoleküls auf das γ-Phosphat, was letztlich zu dessen Abspaltung führt. Die Aktivierung des Wassermoleküls, das über Wasserstoffbrücken mit Thr35 und Gln60 an Ras fixiert ist, könnte nach einem Modell durch Gln61 erfolgen, das als Base fungiert und ein Proton des Wassers bindet. (Pai *et al.*, 1990). Für NF-1 konnte gezeigt werden, dass das GAP sowohl die Spaltung des GTP als auch den Austritt des P_i beschleunigt, was als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Gesamtreaktion angesehen wird. Die P_i-Freisetzung löst die Dissoziation von NF-1 aus. Wie NF-1 allerdings die Freisetzung des P_i steuert, ist strukturell bislang nicht belegt (Phillips *et al.*, 2003).

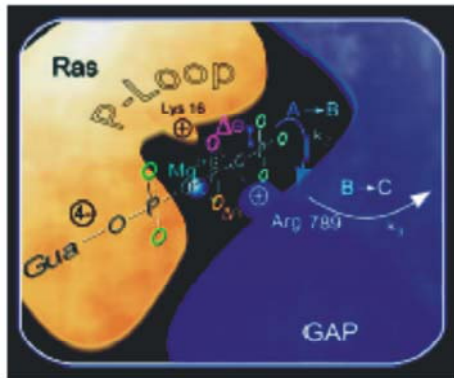


Abb. 2. Die GAP-katalysierte Hydrolyse des Ras-gebundenen GTP. GAP-Proteine wie p120RasGAP oder NF-1 steuern einen Arg-Rest bei. Dieser kooperiert mit Lys16 von Ras und dem gebundenen Mg^{2+} und bewirkt eine Verschiebung negativer Ladungen vom γ - zum β -Phosphat des GTP. Dadurch wird die Aktivierungsenergie für die Spaltung der β - γ -Bindung deutlich herabgesetzt. A>B bzw. B>C stellen Übergangszustände bei der Abspaltung des P_i dar. (aus Allin *et al.*, 2001)

Die onkogenen Ras Varianten (G12R, G12V, Q61H und Q61L) weisen in ihrer Bindung an GAP unterschiedliche K_D -Werte gegenüber wildtypischem Ras ($6,6\mu M$) auf. Während die Affinität von G12V und G12R 3- bzw. 5-fach schwächer ist, bilden Q61H ($K_D= 2\mu M$) und Q61L ($K_D= 0,1\mu M$) einen sehr stabilen Komplex mit dem GAP aus. Die molekulare Ursache der onkogenen Wirkung dieser Mutanten wurde in einer Arbeit von Krenkel *et al.* (1990) beschrieben. Allgemein wirken sich diese Mutationen nur geringfügig auf die Gesamtstruktur von Ras aus. Im Fall von Ras(G12R) ist die Guanidinium-Gruppe des Arg direkt am γ -Phosphatrest positioniert und nimmt den Platz des Wassermoleküls ein, das als Nukleophil bei der GTP-Hydrolyse wirkt. Außerdem ist das Arg so platziert, dass der Austritt des freien Phosphatrestes aus der Nukleotidbindetasche blockiert wird. Tatsächlich erfolgt die Nukleotid dissoziation bei dieser Mutante langsamer. In Ras(G12V) ist es die verzweigte, hydrophobe Seitenkette des Val12, die dem negativ geladenen γ -Phosphatrest zu nahe kommt. Die resultierenden Spannungen werden durch Verschiebungen in der P-Schleife und von Gly60 und Gln61, die beide in die GTP-Hydrolyse involviert sind, kompensiert. Folglich wird der nukleophile Angriff des Wassers auf den γ -Phosphatrest gestört. Beide G12-Mutanten sind onkogen, da ihre längeren Seitenketten mit der „aktiven Konformation“ von Ras interferieren, wenngleich durch verschiedene Mechanismen.

2.4. Signaltransduktion der Ras-Proteine

Ras fungiert als eine Art intrazellulärer Knotenpunkt, an dem eine Vielzahl verschiedenster externer Stimuli zusammenlaufen und das selbst ein Netzwerk kaskadenartiger Signalwege speist (Abb.3). Zu diesen äußeren Stimuli gehören Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, HGF), Zytokine, Chemokine, Hormone oder Stress, die auf entsprechende Rezeptoren wie Rezeptor-Tyrosinkinasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, den T- und B-Zell-Rezeptor, Src-ähnliche Kinasen oder PKC wirken (Downward *et al.*, 1990; Ehrhardt *et al.*, 2002; Gutkind, 2000; Kolch, 2000; Liebmann, 2001; Martin, 2001). Diese wiederum vermitteln u.a. über verschiedene Adaptorproteine und GEF die Aktivierung von Ras. Einen klassischen Signalweg der Ras-Aktivierung stellt der über Rezeptor-Tyrosinkinasen dar. Hierbei führt die Ligandenbindung zur Dimerisierung/Oligomerisierung und Autophosphorylierung der Rezeptoren. Die phosphorylierten Tyrosinreste fungieren als Bindestellen für SH2-Domänen-tragende Adaptorproteine wie Grb2 (Lowenstein *et al.*, 1992). Grb2 ist über seine SH3-Domäne an den GEF Sos1 gebunden, der durch Aktivierung des Rezeptors an die Plasmamembran gelangt. Dort ist Sos1 in der Lage mit dem membranständigen Ras zu interagieren und stimuliert den Guanin-Nukleotidaustausch an Ras. Durch die Beladung mit GTP wird Ras „angeschaltet“ und rekrutiert in seiner aktivierten Form verschiedene Effektoren, die daraufhin selbst aktiviert werden (s. Abschnitt 0.). Die Aktivierung von Ras beginnt ca. 30s nach EGF-Stimulation, erreicht ihren Höhepunkt nach ca. 1,5-3,5min und fällt anschließend (bis 6min) wieder ab. Dabei weisen H-Ras und K-Ras4B einen vergleichbaren Verlauf in der Aktivierung auf (Murakoshi *et al.*, 2004). Für die Signalweiterleitung scheint eher die durch ein Signal generierte Anzahl der Ras-GTP Zyklen als die reine Ras-GTP-Beladung entscheidend zu sein, wobei es möglicherweise auch in der Zyklenzahl Unterschiede

zwischen den Ras-Isoformen gibt. Das Ausmaß der Ras-vermittelten Aktivierung hängt zudem von der Stabilität des Ras-GTP/Effektor-Komplexes ab (Wolfman, 2001).

Neben der Stimulus-vermittelten Ras-Aktivierung spielt offenbar auch die Basalaktivität/-aktivierung des Proteins eine elementare Rolle (Rubio *et al.*, 2003; Wetzker und Böhmer, 2003). Diese ist vor allem auf die Regulation der zellulären Homöostase ausgerichtet. In Serum-starvierten Fibroblasten ist beispielsweise eine konstitutive Assoziation von aktiviertem, GTP-beladenem N-Ras mit Raf-1 und PKC ϵ nachweisbar (Hamilton *et al.*, 2001). Möglicherweise steht damit auch das ohne externe Stimulation unter *steady-state* Bedingungen (Ruhezustand) kontinuierliche ausgesandte Überlebenssignal von N-Ras in Zusammenhang (Wolfman und Wolfman, 2000).

2.4.1. Kleines Ras- große Wirkung: Expansion der Ras-Aktivität durch multiple Effektoren

Die verschiedenen Ras-Effektoren verfügen über die sogenannte Ras-bindende Domäne (RBD). Diese ermöglicht die spezifische Interaktion der Effektoren mit GTP-beladenem Ras und vermittelt so deren Rekrutierung zu Bereichen aktivierten Ras (s. Abschnitt 2.4.3.). Zu den Ras-Effektoren gehören u.a. Protein- und Lipidkinasen, aber auch GEF und GAP für verschiedene kleine GTPasen (Tocque *et al.*, 1997). Die am besten charakterisierten Ras-Effektoren sind die Raf-Kinasen (Stokoe *et al.*, 1994), die katalytische Untereinheit (p110) der Klasse I Phosphatidylinositol(3)Kinasen (PI(3)Kinasen) (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994; Rubio *et al.*, 1997), RIN1 (Han und Colicelli, 1995), Phospholipase C ϵ (PLC ϵ) (Kelley *et al.*, 2001), PKC ζ (Diaz-Meco *et al.*, 1994), AF6 (Zhadanov *et al.*, 1999) oder Nore1 (Khokhlatchev *et al.*, 2002), sowie mit RalGEF (Urano *et al.*, 1996) und Tiam1 (Lambert *et al.*, 2002) Austauschfaktoren für die kleinen GTPasen Ral bzw. Rac.

Die Ser/Thr-Kinase Raf, die drei eng verwandte Proteine c-Raf-1; A-Raf und B-Raf, umfasst, war der erste beschriebene Ras-Effektor in Säugerzellen. Raf spielt ebenso wie die PI(3)K eine ganz wichtige Rolle in Ras-getriebenen Signalwegen. Darüber hinaus agieren diese beiden Kinasen aber auch noch Ras-unabhängig (Blume-Jensen und Hunter, 2001; Kolch, 2000; Ueda *et al.*, 1996). Diese Arbeit beschränkt sich auf die Darstellung von Raf und PI(3)K als Ras-Effektoren und Mediatoren Ras-vermittelter zellulärer Effekte. Die Funktionen beider Proteine bei der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose oder zellulären Transformation werden in nachfolgenden Abschnitten vorgestellt, weshalb an dieser Stelle auf eine detaillierte Beschreibung verzichtet wird.

Ras und Rac wirken bei zahlreichen zellulären Prozessen kooperativ. Dabei können beide Proteine parallel durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli aktiviert werden. Alternativ kann die Aktivierung aber auch sequentiell erfolgen, indem Ras den RacGEF Tiam1 rekrutiert und dessen Austauschaktivität stimuliert, wodurch Rac (Rac-GTP) aktiviert wird (Lambert *et al.*, 2002). Rac ist nicht nur an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt und aktiviert Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, sondern spielt auch eine wesentliche Rolle bei der Ras-induzierten Transformation (Burridge und Wennerberg, 2004; Malliri *et al.*, 2002).

Eine weitere Ras-Effektor Familie umfasst die GEF für Ral: RalGDS, RGL (RalGDS-*like gene*), RGL2 und RPM/RGL3. Die Mitglieder der RalGEF-Familie interagieren über die RA-Domänen mit verschiedenen, aktivierten Mitgliedern der Ras-Subfamilie wie den Ras-Isoformen, Rap und Rit. Durch die RalGEF stimuliert Ras die Aktivierung der kleinen GTPase Ral. Diese ist eine Vielzahl von zellulären Prozessen involviert, u.a. in die Exozytose. Hierbei steuert Ral-GTP die Zusammensetzung des Exozyst-Komplexes, der die Verteilung verschiedener Unterklassen sekretorischer Vesikel koordiniert (Moskalenko *et al.*, 2003). Der Ral-Effektor RalBP1 (*Ral binding protein*) stimuliert.

PLC ϵ ist ein Effektor von H-Ras und TC21 und katalysiert die Hydrolyse von PI(4,5)P $_2$ zu DAG und IP $_3$, die zur Ca $^{2+}$ -Freisetzung und PKC-Aktivierung führen. DAG und Ca $^{2+}$ stimulieren auch GEF für Ras, Rap oder Mitglieder der Rho-Familie (s. Abschnitt 2.3.). Dadurch wird möglicherweise die lokale Aktivierung von Ras und anderen kleinen GTPasen gewährleistet. Außerdem fungiert PLC ϵ selbst als ein GEF für Rap1A, nicht jedoch Rap2A, H-Ras, R-Ras, M-Ras, RalA, Rin, Rit oder Rheb (Jin *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2002).

RIN1 (kurz für *Ras interaction/interference*) ist wie Ras in der Plasmamembran lokalisiert (Han und Colicelli, 1995). Obwohl der für die Ras-Familie charakteristische CAAX-Terminus fehlt, wird die Membranassoziation durch einen Abschnitt basischer Aminosäuren vermittelt (Rusyn *et al.*, 2000).

2. Einleitung

Interessanterweise wirkt RIN1 als GEF für Rab5A, stimuliert den Nukleotidaustausch von Rab-Proteinen und verstärkt die Ras-vermittelte Endozytose (Tall *et al.*, 2001). Darüber hinaus kompetitiert RIN1 *in vitro* direkt mit Raf-1 um die Bindung an Ras. Die Ras-induzierte Transformation lässt sich durch Expression von RIN1 oder der RBD von RIN1 blockieren (Wang *et al.*, 2002).

Dieser Auszug über einige Ras-Effektoren verdeutlicht, das aktivierte Ras mannigfaltige Signalwege initiiert und so in die Regulation multipler zellulärer Phänotypen involviert ist. Dies zeigt umgekehrt aber auch, warum eine Fehlregulation von Ras, beispielsweise durch aktivierende Mutationen, so fatale Auswirkungen wie die maligne Transformation zur Folge hat. Denn durch das Zusammenwirken der verschiedenen Wege werden diverse Regulatoren des Zellzyklus (in)aktiviert, was die Proliferation begünstigt (s. Abschnitt 2.6.1.1.). Andererseits wird die Apoptose über PI(3)K> Akt, Raf> MAPK u.a. Mechanismen unterdrückt (s. Abschnitt 2.6.1.2.), während sich der invasive Charakter der Zellen durch Expression von z.B. Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Rac-vermittelte Veränderungen des Zytoskeletts erhöht (s. Abschnitt 2.6.1.3.). Letztendlich werden Tumorwachstum und -ausbreitung u.a. durch Aktivierung der MAPK gefördert.

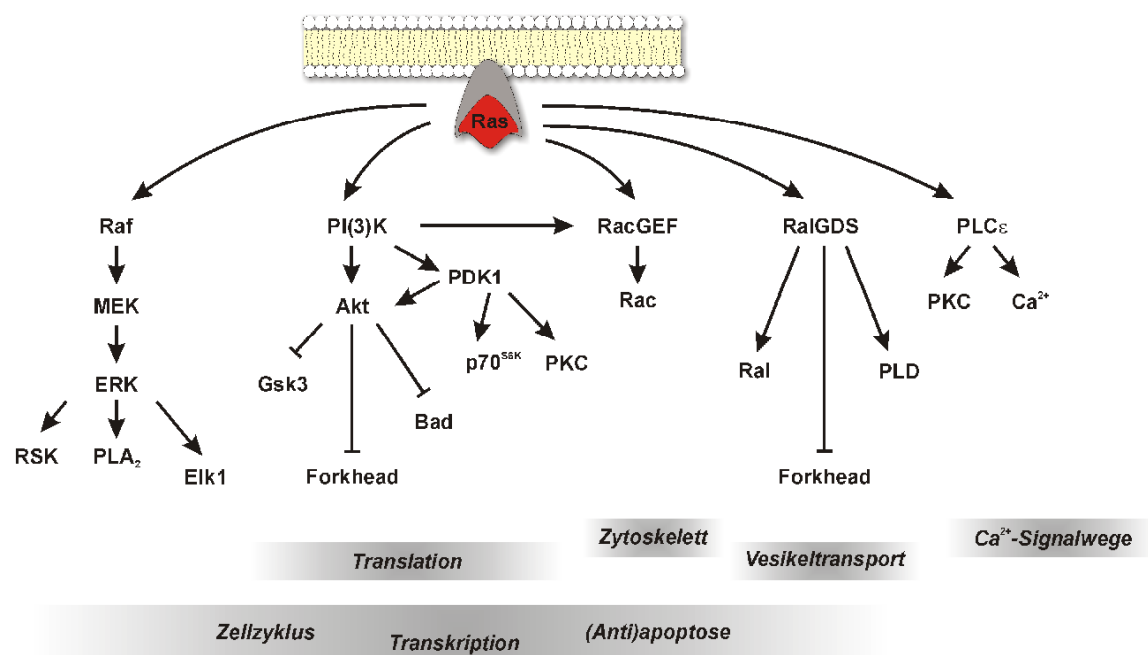


Abb. 3. **Ras-Effektor-Signalwege.** Aktiviertes Ras ist in der Lage Effektoren zu rekrutieren, die über ihre RBD/RA-Effektordomäne spezifisch Ras-GTP binden. Durch die Interaktion mit Ras wird die katalytische Aktivität der Effektoren stimuliert, die daraufhin selbst Signalwege initiieren. Hier ist eine Auswahl der bekanntesten Ras-Effektoren wiedergegeben. Raf-Proteinkinasen aktivieren die MAPK-Kaskade, das zur Aktivierung von ERK führt. Letzteres aktiviert im Zytoplasma und im Nukleus eine ganze Reihe von Substraten, zu denen auch Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 gehören. Die MAPK-Kaskade wirkt u.a. auf die Progression des Zellzyklus, Transkription oder Regulation pro- oder anti-apoptotischer Prozesse. Ein zentraler anti-apoptotischer Signalweg besteht in der Aktivierung von Akt durch die PI(3)K. Akt unterdrückt die Aktivität von pro-apoptotisch wirkenden Proteinen wie z.B. Bad oder Forkhead-Transkriptionsfaktoren. Daneben wirkt Akt aber auch auf die Translation und ist an der Regulation metabolischer Funktionen beteiligt. RalGDS-Proteine sind Austauschfaktoren (GEF) für Ral, das u.a. eine Rolle im Vesikeltransport und der Exozytose spielt. PLC ϵ katalysiert die Hydrolyse von PI(4,5)P $_2$ zu DAG und IP $_3$, was zur Aktivierung von PKC und zur Mobilisierung von Ca $^{2+}$ aus intrazellulären Organellen wie dem ER führt. (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis)

2.4.2. Ein Klassiker der Signalweiterleitung: die MAPK-Kaskade

Die Umschaltung der Ras-Aktivität über seine Effektoren auf nachgeschaltete Signalwege ist besonders gut am Beispiel der Ras > Raf > MEK > MAPK-Kaskade dokumentiert (Abb. 3). Dabei rekrutiert Ras-GTP zunächst den Effektor Raf (MAPKKK) an die Plasmamembran, wobei Raf über die Ras-bindende Domäne (RBD) und eine nachgeschaltete Cysteinreiche-Domäne (CRD) mit Ras interagiert. Die Translokation an die Membran und die Integrität beider Domänen ist entscheidend für die Aktivierung der Kinase (Hu *et al.*, 1995; Leever *et al.*, 1994; Stokoe *et al.*, 1994). An der Plasmamembran erfolgen verschiedene Phosphorylierungen an Tyrosinresten von Raf und Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen, welche die Kinaseaktivität von Raf stimulieren (Marais *et al.*, 1995; Mason *et al.*, 1999; Rommel *et al.*, 1996). Im aktivierten Zustand phosphoryliert Raf in der Folge MEK1 (eine MAPKK) und 2 an Ser217 und Ser221 (Alessi *et al.*, 1994; Dent *et al.*, 1992), die dadurch selbst aktiviert, Substrate wie die ERK1/2 (MAPK) an Thr202 und Tyr204 (humane ERK1) phosphorylieren, was zu deren Aktivierung führt (Payne *et al.*, 1991). Die aktivierten Formen von ERK1/2 wirken ihrerseits beispielsweise auf Proteinkinasen wie p90^{Rsk2} (Bonni *et al.*, 1999; Roux *et al.*, 2003) oder die zyttoplasmatische Form der Phospholipase A₂ (Boulven *et al.*, 2001; Sa *et al.*, 1995). Die Phosphorylierung von ERK1/2 ermöglicht aber auch deren Translokation in den Kern, wo Transkriptionsfaktoren wie SRF, Ets, ATF2 oder c-Jun als Substrate aktiviert werden (Hill und Treisman, 1995; Treisman, 1996). Elk1, ein Mitglied der Ets-Familie, stimuliert gemeinsam mit SRF über das Serum-responsive Element (SRE) u.a. die Transkription von *c-fos*, *egr-1* oder *jun-B* (Hodge *et al.*, 1998), was zur Aktivierung des Aktivatorproteins 1 (AP-1) führt. AP-1 setzt sich aus Homodimeren der Jun-Familie oder Heterodimeren der Jun/Fos-Familie zusammen und reguliert die Transkription verschiedener Gene. Während z.B. c-jun aktivierende Eigenschaft aufweist, inhibiert die Bindung von JunD zumeist die Promotor-Aktivität (Pfarr *et al.*, 1994). Ein Ergebnis der stimulierenden Wirkung ist die Expression der D-Typ Cycline, die als wichtige Regulatoren des Zellzyklus den Übergang von der G1- in die S-Phase fördern (Abschnitt 2.6.1.1. und Coleman *et al.*, 2004). Für eine Reihe von zellulären Prozessen wie Differenzierung oder Transformation sind quantitative Unterschiede in der Aktivität der MAPK bedeutsam. Während eine anhaltende Aktivität von Ras/MAPK durch NGF-Stimulation das Auswachsen von Neuriten in PC12 Zellen induziert, treibt eine transiente MAPK-Aktivität durch EGF-Stimulation die Proliferation dieser Zellen an (Marshall 1995).

Neben ERK1/2 exprimieren Säuger noch mindestens vier weitere MAPK: die Jun N-terminalen Kinasen (JNK)1,2 und 3; die p38 Proteine (p38 α , β , γ und δ) sowie ERK5. Diese werden wie ERK1/2 (siehe oben) durch spezifische MAPKK und MAPKKK, die auf unterschiedliche Stimuli reagieren, gesteuert (Chang und Karin, 2001). Nicht zuletzt auf Ebene der MAPKKK wird die Spezifität für die MAPK determiniert. So spielt beispielsweise MEKK1 für die Aktivierung von ERK1/2 oder p38 keine Rolle, wohl aber für die Stimulation der JNK-Aktivität durch Serum oder LPA (Xia *et al.*, 2000; Yujiri *et al.*, 1998). Zudem sind die Elemente in Signalkaskaden organisiert, die durch physikalische Interaktion nacheinander aktiviert werden. Die Spezifität der MAPK-Aktivierung wird aber auch durch sogenannte *scaffold* Proteine determiniert, welche die einzelnen Komponenten der MAPK in einem Modul zusammenführen. JIP1 fungiert als *scaffold* für die Elemente der JNK-Kaskade JNK1/2, MKK7 und die MAPKKK MLK1. MP1, ein weiteres *scaffold*-Protein, dagegen bringt ERK1 und MEK1 in räumliche Nähe, wodurch die ERK1-Aktivierung verstärkt wird (Schaeffer *et al.*, 1998).

2.4.3. Strukturelle und biochemische Charakteristika der Ras-bindenden Domäne

Die RBD von Raf, PI(3)K und RalGEF weisen trotz großer struktureller Ähnlichkeit nur eine geringe Sequenzhomologie auf und definieren verschiedene Domärentypen. So besitzen Raf, PI(3)K und Tiam1 eine Raf-typische RBD (Lambert *et al.*, 2002), während der RBD-Typus von RalGEF als Ras-assoziierte (RA) Domäne bezeichnet wird (Ponting und Benjamin, 1996). RA-Domänen finden sich bei einer ganzen Reihe von Ras-Effektoren wie z.B. Rin1, PLC ϵ , AF6 oder Nore1.

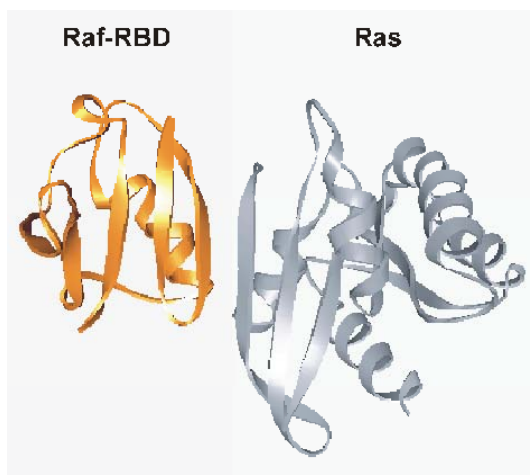
Kristallographische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Interaktion von Rap1 mit der RBD von c-Raf-1 (Nassar *et al.*, 1995; Nassar *et al.*, 1996) bzw. von Ras mit der RBD von RalGDS (Vetter *et al.*, 1999) oder

2. Einleitung

PI(3)Ky (Pacold *et al.*, 2000) sehr ähnlich ist. Die Interaktion erfolgt über die Zusammenlagerung eines β -Faltblattes von Ras mit einem β -Faltblatt der RBD. Kontakte über hydrophile Reste zwischen der *switch I*-Region von Ras und der RBD stabilisieren die Bindung und bewirken eine spezifische Interaktion mit GTP-beladenem Ras (Abb. 4). Trotz dieser Ähnlichkeiten bindet Ras diese Effektoren in einer spezifischen Orientierung. Die RBD sind bezüglich Ras gegeneinander gedreht, wobei die RBD der PI(3)Ky um 35° und 17° relativ zur c-Raf-RBD bzw. RalGDS-RBD versetzt Ras bindet (Pacold *et al.*, 2000). Eine Besonderheit der Wechselwirkung von Ras und PI(3)Ky sind die Kontakte der RBD mit der *switch II*-Domäne von Ras, die bei den anderen beiden Effektoren nicht vorhanden sind. Interessanterweise führt die Ras-Bindung zu Konformationsänderungen vor allem im Bereich der C2-Domäne und der katalytischen Domäne der PI(3)Ky, wobei die *switch II*-Region auch direkt mit der katalytischen Domäne verknüpft ist. Dadurch wird eventuell der Zugang zu den Phospholipiden erleichtert. Möglicherweise verbirgt sich hinter der Konformationsänderung ein allosterischer Mechanismus über den Ras, neben der Rekrutierung der PI(3)Ky an die Plasmamembran, zur Aktivierung der Kinase beiträgt (Pacold *et al.*, 2000).

Die RBD von c-Raf-1 umfasst die AS-Reste 51-131 und liegt innerhalb der CR1-Domäne des Proteins (Vojtek *et al.*, 1993). Der Topologie nach gehört die c-Raf-1-RBD zur Gruppe der Ubiquitin- α/β -roll-gefalteten Proteine (Nassar *et al.*, 1995). Die Interaktion zwischen dieser RBD und Ras *in vitro* wurde von Herrmann *et al.* (1995) eingehend untersucht. Danach bindet die RBD von c-Raf-1 hochaffin H-Ras-GTP ($K_D=18\text{nM}$) und mit jeweils 40nM kaum schwächer GTP-beladenes N-Ras bzw. K-Ras. Aufgrund der identischen Sequenz im Bereich der Effektorregion (*switch I*) binden diese Ras-Isoformen vermutlich mit der gleichen Affinität. Durch die Ausbildung des Ras/RBD-Komplexes wird die intrinsische GTPase Aktivität von Ras ($t_{1/2}=25\text{min}$) nicht beeinflusst, aber die Dissoziation des Nukleotids stark inhibiert. Sydor *et al.* (1998) zufolge beträgt die Lebensdauer des H-Ras/RBD Komplexes 50-100ms und ist damit sehr viel kürzer als die des Ras-gebundenen GTP. Dadurch kann ein einzeln aktiviertes Ras-Molekül mehrfach mit der RBD interagieren oder durch Bindung eines gegenwärtigen GAP inaktiviert werden. H-Ras-GDP besitzt gegenüber H-Ras-GTP eine ungefähr 1300-fach geringere Affinität zur RBD ($K_D=24\mu\text{M}$), die deshalb umgehend abdissoziiert. Die onkogenen Ras-Varianten G12V und Q61L weisen eine vergleichbare Affinität wie wildtypisches Ras zur RBD ($K_D=25\text{nM}$ bzw. $K_D=60\text{nM}$) auf (Herrmann *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu ist jedoch die Halbwertszeit der intrinsischen GTPase-Reaktion der onkogenen Ras Varianten 10-100-mal länger als bei wildtypischem Ras, was zumindest teilweise die zellulären Konsequenzen dieser Mutanten erklärt (John *et al.*, 1988; Kregel *et al.*, 1990).

A



B

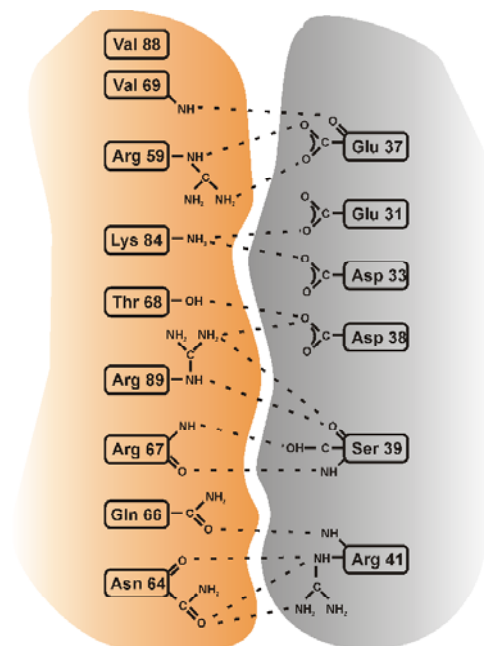


Abb. 4

2.5. Methodische Ansätze zur Detektion der Ras-Aktivität

- **Bestimmung der Ras-Aktivität mittels pull down-Assays**

Die Ras-Aktivität lässt sich zum einen mit Hilfe sogenannter „pull down“-Assays bestimmen. Hierbei wird Ras-GTP mit Hilfe der RBD aus dem Zell-Lysat extrahiert und anschließend im Immunoblot mit einem Ras-spezifischen Antikörper detektiert (Gibbs, 1995; Gorman *et al.*, 1996). Durch Zellfraktionierung kann die Ras-Aktivität in verschiedenen subzellulären Kompartimenten ermittelt werden (Prior *et al.*, 2001). Diese Methoden sind zwar sensitiv genug, um die Ras-Aktivität zu bestimmen, weisen aber einige entscheidende Nachteile auf. Zum einen ist eine Einzelzell-Analyse auf diesem Wege nicht möglich, statt dessen wird ein Querschnitt über die gesamte Zellpopulation erfasst. Zum anderen lässt sich die Ras-Aktivität nur durch verschiedene Zeitpunkte nicht jedoch kontinuierlich aufzeichnen. Letztlich ist die räumliche Beschreibung der Ras-Aktivität aufgrund der Zell-Lyse oder ungenügender Separation zellulärer Kompartimente schwierig oder gar nicht möglich.

- **Ras im Fokus: Visualisierung der Aktivierung in vivo**

Eine Alternative zur Aktivitätsbestimmung aus Zell-Lysaten, die auch die o.g. Nachteile aufhebt, stellt die direkte Visualisierung von aktivem Ras dar. Auf diesem Weg konnte zunächst die Lokalisation des *endogenen* Ras in der Innenseite der Plasmamembran, in endozytären Vesikeln und im Bereich des Golgi-Apparates nachgewiesen werden (Choy *et al.*, 1999; Willingham *et al.*, 1980). Darüber hinaus wurde Ras, nach Überexpression oder in Ras-transformierten Zellen, auch an Mitochondrien (Denis *et al.*, 2003; Rebollo *et al.*, 1999), Mikrotubuli (Chen *et al.*, 2000; Thissen *et al.*, 1997), Endosomen (Jiang und Sorkin, 2002) oder sogar im Nukleus (Wurzer *et al.*, 2001) detektiert. Dabei zeigte sich, dass Ras dort nicht nur lokalisiert, sondern auch aktiviert ist. Bislang ist jedoch nicht geklärt, ob diese Beobachtungen uneingeschränkt auf die *endogene* Situation übertragbar sind. Denn *in vivo* gelten die Plasmamembran und eventuell davon abgeschnürte Endosomen als Orte der Ras-Aktivierung (Di Fiore und Gill, 1999; Haugh *et al.*, 1999; Leever *et al.*, 1994). Die Gruppe von M. Philips propagiert eine stimulationsabhängige Aktivierung von Ras, auch des endogenen, am Golgi-Apparat. Demnach kommt es nach Stimulation serum-starvierter Cos-1 Zellen (EGF, TGF α , Insulin) zunächst zur Aktivierung von Ras an der Plasmamembran (nach 2min) und nach ca. 10-20min im Bereich der Endomembranen (Chiu *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu nicht-lymphozytären Zellen wie Cos-1 und HeLa Zellen wird H-Ras bzw. N-Ras in Jurkat Zellen nach Stimulation nur am Golgi-Apparat (bereits nach 5min) und nicht an der Plasmamembran aktiviert (Bivona *et al.*, 2003; de Castro *et al.*, 2004). Das am Golgi-Apparat aktive Ras ist in der Lage verschiedene Ras-Effektoren zu stimulieren und sogar die Ras-vermittelte zelluläre Transformation zu verstärken (Bivona und Philips, 2003; Chiu *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse wurden unter Bedingungen ektopisch exprimierter Ras-Isoformen erarbeitet, wobei die mit GFP-fusionierte RBD (GFP-RBD) als Reporter für aktiviertes Ras eingesetzt wurde (Tabelle 1). Jiang und Sorkin (2002) beschreiben (unter Verwendung der RBD) ebenfalls die Lokalisation von überexprimiertem H-Ras-GTP in endosomalen und vesikulären perinukleären Strukturen, die auch den Golgi-Apparat beinhalten könnten. Mit der fluoreszenzmarkierten RBD ist es allerdings nicht möglich endogenes Ras-GTP zu detektieren (Bondeva *et al.*, 2002; de Castro *et al.*, 2004). Dies gelang Bondeva *et al.* (2002) erst durch die Erweiterung von GFP-RBD um die Cystein-reiche Domäne von Raf-1 (CRD; AS 139-184). Diese bildet Kontakte mit der *switch 2* Region und dem lipid-modifizierten C-Terminus von Ras (Drugan *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2000) und interagiert mit anderen Proteinen wie










Abb. 4. **Die strukturelle Interaktion der RBD und Ras.** (A) Die RBD vermittelt die spezifische Interaktion von Effektoren mit aktivem, GTP-beladenem Ras. Hier ist die RBD (orange) des Ras-Effektors Raf-1 (Raf-RBD; AS 51-131) im Komplex mit Ras (grau) dargestellt. Die Interaktion beider Proteine erfolgt über ein β -Faltblatt von Ras mit einem β -Faltblatt der RBD (nach Nassar *et al.*, 1995). (B) Schematische Ansicht der Kontaktfläche zwischen Raf-RBD und Ras im Komplex. Die an der Interaktion beteiligten Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien eingezeichnet (aus Nassar *et al.*, 1996).

2. Einleitung

14-3-3 oder sauren Phospholipiden (McPherson *et al.*, 1999). Mit dem GFP-RBD-CRD Reporter (Tabelle 1) ließ sich die Aktivierung von endogenem Ras nach Stimulation von NIH 3T3 Zellen mit PDGF oder TPA an der Plasmamembran insbesondere in *ruffles* dokumentieren, die bekannte Orte der Ras-Aktivierung darstellen. Eine Translokation des Reporters an den Golgi-Apparat der Zellen wurde jedoch nicht beobachtet (Bondeva *et al.*, 2002). Die Gruppe um M. Matsuda hat ebenfalls einen Reporter zur Detektion des endogenen Ras entwickelt (Mochizuki *et al.*, 2001). Bei diesem Konstrukt, *Ras and interacting protein chimaeric unit* (Raichu-Ras) genannt, werden H-Ras und die damit verbundene RBD (AS 51-131) von YFP bzw. CFP flankiert (Tabelle 1). Die Aktivität von GEF-Proteinen führt zur Beladung von YFP-Ras mit GTP, das daraufhin mit der verknüpften RBD-CFP interagiert. Dadurch kommt es zur Annäherung der beiden Fluoreszenzproteine, aus der ein verstärktes FRET-Signal zwischen CFP und YFP resultiert. Mit diesem Reporter wird jedoch nicht direkt die Ras-Aktivierung, sondern die Balance zwischen den *endogenen* Aktivitäten von GEF und GAP aufgezeichnet. Nach Stimulation von Cos-1 Zellen mit EGF markiert Raichu-Ras eine Aktivität aber nur im Bereich der Plasmamembran, in Regionen mit *membrane ruffling*, nicht jedoch an Endomembranen (Mochizuki *et al.*, 2001). Basierend auf dem Raichu-Prinzip für Ras lässt sich auch die Aktivierung von Austauschfaktoren für andere kleine GTPasen detektieren. So konnte mit entsprechenden GTPase/Effektor-Paaren auch die Beteiligung von aktivem Rap, RalA, Rho, Rac oder Cdc42 an zellulären Prozessen wie Migration oder der Zellteilung dargestellt werden (Itoh *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2001; Takaya *et al.*, 2004; Yoshizaki *et al.*, 2003).

Ein methodischer Ansatz zur Analyse der Aktivierung einzelner Ras-Moleküle in lebenden Zellen wurde von (Murakoshi *et al.*, 2004) beschrieben. Hierbei werden FRET-Signale aufgezeichnet, die bei der Beladung von YFP-H-Ras (Donor) mit fluoreszierendem GTP (BodipyTR-GTP als Akzeptor) entstehen (Tabelle 1). Dadurch konnte das Verhalten von Ras-Molekülen innerhalb der Mikrodomänen nach Aktivierung aufgezeichnet werden.

Tabelle 1
Reporter zur Detektion der Ras-Aktivität in lebenden Zellen

Konstrukt	Signal	Lokalisation	Referenz	
Raf-1				
GFP-RBD		exogenes Ras-GTP	Plasmamembran Golgi Apparat	Chiu <i>et al.</i> , 2002 Bondeva <i>et al.</i> , 2002 Bivona <i>et al.</i> , 2003
GFP-RBD-CRD		endogenes Ras-GTP	Plasmamembran	Bondeva <i>et al.</i> , 2002
RBD-YFP		exogenes Ras-GTP	Plasmamembran Endosomen (Golgi Apparat)	Jiang und Sorkin, 2002
Raichu-Ras		GEF-Aktivierung	Plasmamembran	Mochizuki <i>et al.</i> , 2001
YFP-Ras BodipyTR-GTP		exogenes Ras-GTP	Plasmamembran	Murakoshi <i>et al.</i> , 2004
.....				
 RBD	 CRD	 Ras-GTP		

- ***Vor- und Nachteile der verfügbaren Methoden***

Der Einsatz der fluoreszenzmarkierten RBD als Ras-Reporter in lebenden Zellen bietet den entscheidenden Vorteil, dass sich damit spezifisch aktives, d.h. GTP-beladenes Ras detektiert lässt. Allerdings ist dieser Ansatz in seiner Spezifität für die einzelnen Ras-Isoformen limitiert, welche die RBD mit nahezu gleicher Affinität binden (Herrmann *et al.*, 1995). Zudem interferiert die Expression von Bindedomänen (RBD, RBD-CRD-GFP) mit Ras-initiierten Signalwegen und stört die GAP/GEF-regulierte (De)aktivierung von Ras (Bondeva *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002). Nach dem Prinzip der RBD lässt sich mit Bindedomänen entsprechender Effektoren die Aktivierung verschiedenster Mitglieder der Ras-Superfamilie untersuchen (Rodriguez-Viciano *et al.*, 2004). So wurde mit der RBD von Nore1 die Aktivierung von M-Ras analysiert (Ehrhardt *et al.*, 2004) und die Rac/Cdc42-bindende Effektoromäne CRIB des Effektors PAK fusioniert als Reporter der Rac/Cdc42 Aktivierung eingesetzt (Graham *et al.*, 2001).

Die publizierten Daten zur Ras-Aktivierung mittels markierten Fluoreszenzproteinen und FRET-Analyse wurden mit CFP als Fluoreszenzdonor und YFP als Akzeptor durchgeführt (Chiu *et al.*, 2002; Jiang und Sorkin, 2002; Mochizuki *et al.*, 2001). Dabei birgt die Verwendung dieses Fluophorenpaars aufgrund der spektralen Überlappung von CFP und YFP die Gefahr einer gleichzeitigen Anregung von Donor und Akzeptor. Daher muss bei der Bestimmung der Emission durch Kontrollen sichergestellt werden, dass diese tatsächlich durch FRET hervorgerufen wird (Zimmermann *et al.*, 2002). Die derzeit verfügbaren FRET-Methoden zur Detektion der Ras-Aktivierung beruhen auf der Überexpression von Ras und den Reporterkonstrukten. In der notwendigen (Über)expression von Ras bei einer Vielzahl der verfügbaren Methoden liegt ein entscheidender Nachteil. Denn die (Über)expression führt generell zur Mislokalisierung von Ras in der Zelle und womöglich zu einer Interaktion mit nicht-physiologischen Effektoren. Prior *et al.* (2003) haben gezeigt, dass bei starker Expression von Ras-Proteinen die physiologischen Bindestellen abgesättigt werden und weitere Proteine außerhalb dieser Bindestellen in die Plasmamembran (also in nicht-physiologischen Bereichen) eingebaut werden. Daher ist es fraglich, ob die Beobachtungen nach ektopischer Expression von Ras auf die endogene Situation übertragbar sind. Die Einführung konstitutiv-aktiver Ras-Varianten wie G12V oder Q61L führt zu supra-physiologischen Spiegeln der Ras-Aktivierung. Dadurch werden z.B. Effektoren aktiviert, die unter physiologischen Bedingungen nur gering oder gar nicht aktiviert werden. Dominant-negative Ras-Mutanten wie z.B. Ras(S17N) binden Nukleotide nur sehr schwach, besitzen aber trotzdem eine hohe Affinität zu GEF, wodurch die Anzahl freier GEF stark herabgesetzt wird. Durch die (Über)expression von dominant-negativem Ras werden GEF sequestriert und die GTP-Beladung der endogenen Ras-Proteine wird unterbunden. Da einige GEF wie z.B. Sos-1 mit mehreren Mitgliedern der Ras- oder Rho-Familie interagieren, wird durch diese Ras-Mutanten nicht nur die Aktivierung von Ras, sondern verschiedener kleiner GTPasen blockiert. Daraus folgt, dass die beobachteten Effekte von Ras(S17N) nicht unbedingt den Phänotyp einer Blockade von Ras allein wiedergeben (Ehrhardt *et al.*, 2002). Deshalb sind insbesondere Methoden interessant, welche eine räumlich-zeitlich aufgelöste Darstellung der *endogenen* Ras-Aktivierung ermöglichen.

2.6. Die dunkle Seite von Ras: Transformation und Tumorigenese

Onkogenes Ras oder konstitutiv-aktive Formen von Raf oder MEK sind in der Lage NIH 3T3 oder MDCK Zellen zu transformieren (Cowley *et al.*, 1994; Lehmann *et al.*, 2000; Mansour *et al.*, 1994; Stanton *et al.*, 1989). Umgekehrt wird die H-Ras- oder K-Ras-initiierte Transformation von NIH 3T3 Zellen durch die Blockade von *c-raf-1* (antisense RNA) verhindert (Kolch *et al.*, 1991). Daraus wurde geschlossen, dass die MAPK-Kaskade der Hauptweg für die zelluläre Transformation sei (Kolch, 2000; Shields *et al.*, 2000). Durch eine ganze Reihe von Studien wurde aber belegt, dass diese Schlussfolgerung nur für einige Zelllinien relevant ist. So wiesen Oldham *et al.* (1996) nach, dass zwar Ras nicht aber die Raf-1>MAPK-Kaskade zur Transformation von RIE-1 Zellen führen kann. Auch andere Zelllinien wie IEC-6 oder MCF-10 können zwar durch konstitutiv-aktives Ras, H-Ras(Q61L) oder K-Ras4B(G12V), nicht aber durch konstitutiv-aktives Raf (Δ Raf-22W) transformiert werden. Darüber hinaus ist c-Raf-1 nicht nur für die Ras-vermittelte Transformation, sondern auch für die Tumorigenese Maus-embryonaler Fibroblasten (MEF) entbehrlich

(Gupta *et al.*, 2003). Gleichmaßen ist K-Ras nicht jedoch B-Raf oder die Aktivierung von ERK1/2 für die Tumorigenizität der humanen Krebszelllinie HEC1A bedeutsam (Kim *et al.*, 2004). Daraus lässt sich ableiten, dass zum einen die molekularen Voraussetzungen der Transformierbarkeit zwischen verschiedenen Zelltypen bzw. Spezies variieren (s. Abschnitt 2.6.). Zum anderen ist für die Transformation die Ras-gesteuerte Integration und Kooperation verschiedener Ras-Effektor-Signalwege wie Raf> MEK> ERK und PI(3)K> PDK> AKT notwendig (Mirza *et al.*, 2004). Darüber hinaus übermitteln noch weitere Elemente die onkogene Wirkung von Ras. So ist z.B. für die vollständige Transformation von MCF-10A Zellen die autokrine Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR) wichtig (Ciardiello *et al.*, 1990). Außerdem ist das Zusammenspiel von Ras mit anderen kleinen GTPasen, insbesondere der Rho-Familie, von zentraler Bedeutung (Prendergast *et al.*, 1995). Die Koexpression von dominant-negativem Rac1 und RhoA schwächt die transformierende Wirkung von onkogenem Ras. Umgekehrt steigern die entsprechenden konstitutiv-aktiven Varianten die Ras-initiierte morphologische Transformation, wie auch das Wachstum in Soft-Agar und die Motilität der Zellen (Khosravi-Far *et al.*, 1995). Dabei können Rho Proteine mit Raf/MAPK oder auch Raf-unabhängigen, Ras-Effektor-vermittelten Signalwegen kooperieren (z.B. PI(3)K; Ral) und synergistisch zur zellulären Transformation/Onkogenese beitragen (Khosravi-Far *et al.*, 1996; Qiu *et al.*, 1995). Interessanterweise unterscheidet sich die Morphologie Rho- bzw. Ras/Raf-transformierter Zellen, was zeigt, dass die morphologischen Veränderungen Ras-transformierter Zellen durch Raf vermittelt werden (Khosravi-Far *et al.*, 1996).

- ***Interspezies-spezifische Unterschiede bei der Transformation***

Eine der Ursachen für die o.g. unterschiedlichen, molekularen Voraussetzungen der Transformierbarkeit liegt in einer Spezies-spezifischen Regulation begründet. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass für die Transformation/Tumorigenese muriner und humaner Zellen unterschiedliche Bedingungen erfüllt sein müssen. Während in murinen Fibroblasten zwei Signalwege (Raf und p53) dereguliert sein müssen, sind es in humanen Zellen sechs Signalwege (Raf, RalGDS, p53, PP2A, pRb, Telomerase). Das zeigt, dass die Transformation humaner Zellen viel komplexer als die muriner Zellen reguliert ist und zusätzliche Signalwege dereguliert sein müssen (Rangarajan *et al.*, 2004). Die notwendigen Veränderungen für einen tumorigenen Status verschiedener humaner Zellen können durch die Expression von onkogenem Ras, hTERT (katalytische Untereinheit der humanen Telomerase) sowie des großen und kleinen T-Antigens von SV40 geschaffen werden. Während Ras proliferative und anti-apoptotische Signale vermittelt, inaktivieren T- und t-Antigen von SV40 p53, pRb bzw. einige Aktivitäten von PP2A (Hahn *et al.*, 1999; Hahn und Weinberg, 2002). Dabei ist eine Zelltyp-abhängige Aktivierung verschiedener Ras-Effektoren für die Transformation/Tumorigenese essentiell. Unter Verwendung von Ras-Effektorloop Mutanten, die nur einzelne Signalwege aktivieren, konnte gezeigt werden, dass in humanen, dermalen Fibroblasten Raf und RalGEF kooperieren, während in embryonalen Nierenzellen (HEK) RalGEF- und PI(3)K-gesteuerte Signalwege zusammenwirken. Demgegenüber ist die Expression aller drei Effektoren (Raf, RalGEF, PI(3)K) für die Transformation humaner Epithelzellen der Brust nötig (Rangarajan *et al.*, 2004). Insgesamt zeigen die verschiedenen Studien, dass es bei der Tumorigenese sowohl Interspezies- als auch Gewebe-spezifische Unterschiede innerhalb einer Spezies gibt. Das mag ein wesentlicher Grund sein, warum verschiedene chemotherapeutische Ansätze, die auf Ras-gesteuerte Signalwege abzielen, in vorklinischen Studien und Mausmodellen sehr vielversprechend, in klinischen Studien aber nur wenig erfolgreich sind (s. Abschnitt 2.6.2.).

- ***Das transformierende Potential der Ras-Isoformen***

Das transformierende Potential der Ras-Homologe H-Ras, N-Ras und K-Ras4A bzw. 4B wurde in den Studien von Voice *et al.* (1999) und Li *et al.*, (2004) einander gegenübergestellt. Die Ergebnisse der verschiedenen Transformations-Assays sind in Tabelle A1 zusammengefasst. Demnach wirkt keine der Isoformen auf alle untersuchten Elemente der zellulären Transformation. Während z.B. die konstitutiv aktiven Varianten (G12V) von H-Ras und K-Ras4A die Fokusbildung verschiedener Zelllinien (NIH 3T3; Rat-1; RIE-1) fördern, vermittelt vornehmlich K-Ras4B die Invasivität. Letzteres steht putativ mit der spezifischen Assoziation von K-Ras4B mit der Zytoskelett-Matrix in Zusammenhang (Chen *et al.*, 2000; Thissen *et al.*, 1997). Insbesondere das unterschiedliche Verhalten von K-Ras4A und 4B ist im Hinblick auf die Tumorigenese interessant und könnte ein Grund für die erhöhte Mutationsrate von *K-ras* gegenüber *N-* und *H-ras* in einigen menschlichen Tumoren sein. Aktivierende Mutationen in *K-ras* wirken sich nämlich auf beide Varianten (K-Ras4A und 4B) aus und führen zur Aktivierung verschiedener, aber bei der Transformation kooperierender Signalwege (Voice *et al.*, 1999).

Neben dem Beitrag zu bestimmten Aspekten der Transformation, variiert der Einfluss der einzelnen Ras-Isoformen auf die Transformation auch in verschiedenen Zelltypen. So besitzt z.B. N-Ras(G12V) nur eine sehr geringe transformierende Aktivität im Hinblick auf die Fokusbildung von RIE-1 oder NIH 3T3 Zellen, stimuliert aber zelltyp-abhängig das Wachstum in Soft-Agar (Li *et al.*, 2004; Voice *et al.*, 1999). Nach Maher *et al.* (1995) ist H-Ras vor allem an der Transformation von Fibroblasten beteiligt, während N-Ras stärker als K-Ras4B hämatopoetischen Zelllinien transformiert. In NIH 3T3 Zellen besitzt H-Ras(G12V) ein stärkeres transformierendes Potential als die entsprechenden K- oder N-Ras-Mutanten. Dies liegt wahrscheinlich in der stärkeren Aktivierbarkeit von PI(3)K und Akt durch H-Ras begründet, denn die Expression von K- oder N-Ras allein führt nicht zur Foci-Bildung von NIH 3T3 Zellen, wohl aber die kombinierte Expression mit Akt (Li *et al.*, 2004). In diesem Zelltyp ist auch TC21 ein starkes Onkogen (Rosario *et al.*, 1999), wohingegen R-Ras nur über eine schwache transformierende Aktivität verfügt (Marte *et al.*, 1997).

2.6.1. Elemente der Ras-initiierten zellulären Transformation

2.6.1.1. Ras-vermittelte Effekte auf den Zellzyklus und die Proliferation

Die ungehemmte Proliferation ist eines der Charakteristika transformierter Zellen. Dementsprechend wirken Ras-vermittelte Signale u.a. direkt auf die DNA-Synthese, wobei ERK1/2 die Carbamoylphosphat-Synthetase II phosphoryliert und aktiviert, die wichtig für die Biosynthese der Pyrimidinnukleotide ist (Graves *et al.*, 2000). TC21 stimuliert gleichfalls die DNA-Synthese durch Aktivierung des Ral-Signalweges, der für die Proliferation von Tumorzellen entscheidend ist (Rosario *et al.*, 2001). Daneben ist Ras aber auch direkt in die Regulation des Zellzyklus involviert (Downward, 1997; Marshall, 1999). Ein wesentliches Element stellt hierbei die Inaktivierung des Retinoblastom (Rb)-Proteins dar, wodurch das Fortschreiten aus der G1- in die S-Phase des Zellzyklus möglich wird (Chen *et al.*, 2003; Mittnacht *et al.*, 1997). Rb ist ein Zielprotein der *cyclin-dependent kinase* (Cdk)4 oder Cdk6, die durch Komplexierung mit Cyclin D1 aktiviert werden (Graña und Reddy, 1995) und interessanterweise auch von Raf (Wang *et al.*, 1998). Die aktivierten Kinasen bewirken durch Hyperphosphorylierung die Inaktivierung von Rb. Dadurch wird der durch Rb sequestrierte Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt. E2F wiederum reguliert die Transkription von Genen, deren Produkte wie z.B. Cyclin A oder die Thymidinkinase wichtig für die S-Phase sind. Ras stimuliert durch Aktivierung der JNK die c-Jun vermittelte Transkription von u.a. *cyclin D1* (Binetruy *et al.*, 1991) und via E2F die Expression von *PIN1* (Ryo *et al.*, 2002). Pin1, eine Peptidyl-Prolyl *cis/trans*-Isomerase, verstärkt den Effekt von Ras bzw. JNK, indem es die transkriptionelle Aktivität von c-Jun in Richtung des *cyclin D1* Promotors deutlich stimuliert (Wulf *et al.*, 2001). Die Expression von Cyclin D1 wird auch durch ERK und PI(3)K gesteuerte Signalwege, die einzeln oder gemeinsam wirken, auf transkriptioneller sowie posttranslatonaler Ebene reguliert. Cyclin D1 wird durch GSK3 β phosphoryliert, was zu seiner Ubiquitylierung und Degradation führt (Diehl *et al.*, 1998). Akt inhibiert die GSK3 β und erhöht dadurch die Stabilität von Cyclin D1. Eine permanente (nicht jedoch eine transiente) Aktivierung

2. Einleitung

des Raf> MEK> ERK Signalweges fördert über AP-1 die Transkription von *cyclin D1* (Balmanno und Cook, 1999). Daneben erhöht dieser Signalweg die Aktivität der Cdk aber auch durch die differentielle Regulation von Cdk-Inhibitoren (Übersicht unter Coleman *et al.*, 2004). Dabei wird beispielsweise der Proteinspiegel von p27^{KIP1} über verschiedene Mechanismen herunterreguliert, während die Expression von p21^{CIP1/WAF1} gefördert wird. Letzteres fungiert bei moderater Expression als positiver Regulator der Cyclin D1/Cdk-Komplexe. Ras wirkt aber auch auf andere Phasen des Zellzyklus. So stimuliert H-Ras p53-unabhängig die Expression von CyclinB1, das im Komplex mit cdc2 den G2/M-Phase Übergang reguliert (Santana *et al.*, 2002). Raf assoziiert *in vivo* mit der im Zellzyklus agierenden Phosphatase Cdc25 (aktiviert u.a. Cdk2) und stimuliert deren Aktivität *in vitro* (Galaktionov *et al.*, 1995).

Neben der Proliferation kann Ras aber auch den Zellzyklus-Arrest/ Seneszenz oder die Apoptose induzieren (s. Abschnitt 2.6.1.2.). Dabei stimulieren konstitutiv aktive Formen von Ras und Raf u.a. p19^{ARF}, das durch Inaktivierung von Mdm2 zur Akkumulation von p53 führt. p53 kann entweder den Zellzyklus-Arrest durch transkriptionelle Aktivierung von Cdk-Inhibitoren wie p16^{INK4a} oder p21^{CIP1/WAF1} (Lloyd *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1997) oder aber die Apoptose durch Induktion von z.B. Bad, Bax (Haffner und Oren, 1995; Sionov und Haupt, 1999) einleiten. Diese bidirektionale Funktion von p53 stellt, aufgrund der zentralen Bedeutung von Ras und Raf bei der Zelltransformation, einen Schutzmechanismus nicht transformierter Zellen gegen eine zu starke und dauerhafte Aktivierung der Ras> MAPK Kaskade dar. Umgekehrt ebnet die Ras> Raf-vermittelte Degradation von p53 via Mdm2 einen möglichen Weg, über den Ras-transformierte Zellen der p53-vermittelten Apoptose entgehen können. (Ries *et al.*, 2000). Die kontroversen Auswirkungen Ras-stimulierter Signalwege auf die Induktion oder Suppression der Apoptose werden im folgenden vorgestellt. Allgemein scheint die Entscheidung zur Proliferation, Stillstand des Zellzyklus oder Einleitung der Apoptose an die Funktionalität von Kontrollpunkten (*checkpoints*) geknüpft zu sein (Downward, 1998).

2.6.1.2. Wirkung von Ras auf den Prozess der Apoptose

Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, beschreibt einen aktiven Prozess, der zur Auflösung einer Zelle führt (Kerr *et al.*, 1972). Dies erfolgt durch Aktivierung eines konservierten Programms und bewirkt u.a. charakteristische morphologische Veränderungen der Zelle wie Chromatin-Kondensation, *blebbing* (Membranausstülpung), Ausbildung zytoplasmatischer Vakuolen, Dilatation des ER, Kern-/DNA-Fragmentierung und bei adhärennten Zellen das Ablösen von umgebenden Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM). Letztlich werden die Zellbestandteile in membranumhüllte Vesikel verpackt, sogenannte *apoptotic bodies* („apoptotische Körperchen“), und von spezialisierten (z.B. Makrophagen) oder nicht spezialisierten Zellen (z.B. benachbarte Epithelzellen) phagozytiert (Häcker, 2000). Das apoptotische Programm wird entweder durch Stimulation bestimmter Oberflächenrezeptoren (z.B. Fas; TNFR) oder Disruption der äußeren Mitochondrienmembran und Cytochrom C Freisetzung („mitochondriale Apoptose“) ausgelöst und führt in der Folge zur kaskadenartigen Aktivierung von Initiator- und Effektorcaspasen, die wiederum durch Spaltung eine ganze Reihe von Substraten (in)aktivieren (Ashkenazi und Dixit, 1998; Green und Reed, 1998). Unter Verwendung eines Inhibitors der Proteinsynthese (Cycloheximid) ließ sich zeigen, dass für die Exekution der Apoptose vorhandene Komponenten aktiviert werden und weniger die Expression pro-apoptotischer Gene stimuliert wird (Molton *et al.*, 2003). Gleichmaßen konnten auch Schulze *et al.* (2001) in ihrer Studie keine Veränderung in den mRNA Spiegeln apoptose-relevanter Gene, die durch PI(3)K/Akt regulierte Transkriptionsfaktoren wie NFκB (IAP, A1) oder Forkhead (FasL, Bim) kontrolliert werden, beobachten.

Ras ist in der Lage sowohl pro- als auch anti-apoptotische Signalwege zu aktivieren. Welcher der beiden Wege eingeschlagen wird, hängt u.a. vom jeweiligen Kontext und Zelltyp ab. So führt z.B. die Expression von konstitutiv aktivem H-Ras in RIE-1 Zellen zur Transformation und anhaltender Proliferation dieser Zellen, während Rat-1 Fibroblasten darauf mit Wachstumsstopp und Apoptose reagieren (Shao *et al.*, 2000). Der Raf> MAPK Signalweg kann ebenfalls Apoptose induzieren als auch unterdrücken (Cox und Der, 2003), was vermutlich auch mit der Intensität der Aktivierung korreliert. Eine anhaltende ERK1/2-Aktivität verhindert den Zelltod, während der JNK-Signalweg einen pro-apoptotischen Effekt in neuronalen Zellen ausübt (Xia *et al.*, 1995). Zusammenfassend führt ein hohes Maß an aktiviertem Ras in „normalen“, d.h.

nicht transformierten Zellen zu einer protektiven, pro-apoptischen Reaktion der Zelle, um die Transformation zu verhindern. Dagegen vermittelt onkogenes (konstitutiv aktives) Ras in bereits transformierten Zellen eher das Überleben als den Zelltod (Cox und Der, 2003). Die Signalwege, über die Ras zur Aktivierung bzw. Blockade der Apoptose beiträgt, sind z.T. verschieden, können aber auch überlappen.

Neuere Studien implizieren eine Ras-Isoform spezifische Beteiligung an der Regulation der Apoptose. So fördert konstitutiv aktives K-Ras stärker als H-Ras die Apoptose (Khokhlatchev *et al.*, 2002; Ninomiya *et al.*, 2004), was möglicherweise mit der stärkeren Aktivierung der PI(3)K durch konstitutiv aktives H-Ras korreliert (Yan *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu MEF Kontrollzellen führt Serumentzug oder die Stimulation mit TNF α /Cycloheximid zum Zelltod entsprechender N-Ras *knockout*-Zellen, was durch ektopische Expression von N-Ras nicht aber von K-Ras4A oder 4B kompensiert wird. (Wolfman und Wolfman, 2000).

- ***Ras supprimiert die Auslösung der Apoptose- einerseits...***

Die Aktivierung von Ras stellt eine wirksame Möglichkeit dar, wie transformierte Zellen ihr Überleben unter verschiedenen Bedingungen sichern. So korreliert beispielsweise die Aktivierung von onkogenem K-Ras mit einer Abnahme der Apoptoserate in humanen kolorektalen Adenomen und Karzinomen (Ward *et al.*, 1997). Ein fundamentaler Signalweg in der Transmission der anti-apoptischen Wirkung von Ras besteht in der Aktivierung des Ras-Effektors PI(3)K, welcher ein „universelles“ Überlebenssignal auszusenden scheint (Downward, 1998; Molton *et al.*, 2003). Dies ist mit der Fähigkeit der PI(3)K verknüpft Akt/Proteinkinase B (PKB) zu aktivieren (Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997a). Akt phosphoryliert eine ganze Reihe Apoptose-relevanter Proteine u.a. Caspase 9 (Cardone *et al.*, 1998), FKHRL1 (Datta *et al.*, 1999) oder Bad, ein pro-apoptisches Mitglied der Bcl-2 Familie (Datta *et al.*, 1997). FKHRL1, ein Mitglied der Familie der Forkhead1-Transkriptionsfaktoren, reguliert u.a. die Expression des FasL und wird durch die Phosphorylierung im Zytoplasma komplexiert mit 14-3-3 sequestriert (Brunet *et al.*, 1999). Gleichermaßen wird phosphoryliertes Bad in einen inaktiven Komplex mit 14-3-3 überführt und ist somit nicht mehr in der Lage anti-apoptisch agierende Proteine wie Bcl-2 und Bcl-X_L zu sequestrieren (Tan *et al.*, 1999; Zha *et al.*, 1996). Die Funktionalität von Bad wird aber nicht nur Akt, sondern auch durch die Aktivierung von ERK inhibiert. Während Akt die Phosphorylierung an Ser-136 (Blume-Jensen *et al.*, 1998) vermittelt, stimuliert Raf > ERK > p90^{Rsk2} unabhängig davon die Phosphorylierung an Ser-112 (Bonni *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 1999), wobei beide Modifikationen für sich zur Inaktivierung von Bad führen. Daneben vermittelt Raf, das durch Bcl-2 an die Mitochondrien rekrutiert wird (Interaktion der katalytischen Domäne von Raf mit der BH4 Domäne von Bcl-2), auch ERK-unabhängig die Phosphorylierung von Bad (Majewski *et al.*, 1999; von Gise *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1996; Zhong *et al.*, 2001). Bag-1, ein Mitglied der Bcl-2 Familie, bindet Raf ebenfalls und erhöht dessen Kinaseaktivität (Wang und Reed, 1998). Raf, ERK und PI(3)K/Akt Signalwege konvergieren an Bad, aber nicht nur dort bei der Suppression des Zelltodes (Cox und Der, 2003). In BaF3 Zellen, einer pro-B-Zelllinie, wirken Raf und Akt Signale synergistisch bei der Unterdrückung der Apoptose (von Gise *et al.*, 2001). Demgegenüber wird der anti-apoptische Effekt von Ras in sympathischen Neuronen abhängig vom apoptotischen Stimulus durch den PI(3)K/Akt oder Raf/MAPK Signalweg vermittelt (Xue *et al.*, 2000). Darüber hinaus initiiert auch der Ras-Effektor PKC ζ anti-apoptische Signalwege beispielsweise durch Aktivierung von ERK (Berra *et al.*, 1997).

Die Ras-vermittelte Regulation apoptotischer Faktoren erfolgt nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf Ebene der Transkription und Translation. So wird z.B. die Transkription von *par-4*, einem pro-apoptischen transkriptionellen Repressor, negativ durch die Ras > Raf > MEK-Kaskade reguliert (Barradas *et al.*, 1999). H-Ras fördert auch MEK und PI(3)K abhängig die Expression von Survivin, das zur Familie der *inhibitors of apoptosis protein* (IAP) gehört und auch verstärkt in Tumoren exprimiert wird (Fukuda und Pelus, 2004; Sommer *et al.*, 2003). Die Expression von IAP und anderen Apoptose-relevanten Proteinen wird u.a. durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B stimuliert, der u.a. durch Ras und Rac aktiviert wird (Mayo und Baldwin, 2000). Die Repression von NF- κ B führt p53-unabhängig zur Apoptose Ras-transformierter Fibroblasten (Mayo *et al.*, 1997) und z.B. Par-4 wirkt inhibitorisch auf NF- κ B (Diaz-Meco *et al.*, 1999). Neben der Aktivierung durch Rac kann NF- κ B auch Ras-vermittelt durch Akt reguliert werden. Akt stimuliert dabei die Phosphorylierung der I- κ B Kinase (IKK), wodurch NF- κ B freigesetzt in den Nukleus

penetrieren und die Expression anti-apoptotischer Gene fördern kann (Romashkova und Makarov, 1999). Insgesamt betrachtet scheint der NF- κ B Signalweg längerfristige transkriptionelle Veränderungen des apoptotischen Programms zu steuern, während Akt schnellere Effekte durch Inaktivierung pro-apoptotischer wirkender Proteine vermittelt (Downward, 1998). Interessanterweise wird auch die Expression von Ras durch Proteine des apoptotischen Programms reguliert (Schwarz *et al.*, 2002). Danach regt die (Über)expression von Bcl-2 in PC12 Zellen die Transkription von *H-ras* an. Dies führt nachfolgend durch spezifische Aktivierung der Ras > Raf > MAPK Kaskade zur Phosphorylierung von c-Jun an Ser73 und trägt somit zur anti-apoptotischen Wirkung von Bcl-2 bei.

Die anti-apoptotische Wirkung von Ras auf Translationsebene ist mit dem Cap-abhängigen Translation-Initiationskomplex verknüpft. Hierbei spielt wiederum die Fähigkeit von Ras Akt zu aktivieren eine wichtige Rolle. Denn Akt stimuliert mTOR (*target of rapamycin*), eine Kinase, die an der Kontrolle der Translation beteiligt ist und auf die Proteinsynthese wirkt (Harris und Lawrence, 2003). Die Hemmung der Cap-abhängigen Proteinsynthese durch den mTOR Inhibitor Rapamycin oder die Überexpression von 4E-BP1, das als Translationsrepressor wirkt, induziert Apoptose in Ras-transformierten embryonalen Fibroblasten und reduziert deren Tumorigenizität in Nacktmäusen (Polunovsky *et al.*, 2000). Einer neueren Studie zufolge (Li *et al.*, 2002) kommt es bei der malignen Transformation zur verstärkten Cap-abhängigen Translation, um die Apoptose zu inhibieren. Welche nachgeschalteten Effektoren Cap-abhängig reguliert sind, ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt aber eine Reihe pro/anti-apoptotisch wirkender Proteine wie p53, Mdm2, Fas/Apo1, Cyclin D1 oder Mitglieder der Bcl-2 Familie, deren mRNA unter Cap-abhängiger Translationskontrolle stehen (Cormier *et al.*, 2003; Graff und Zimmer, 2003; Mamane *et al.*, 2004; Willis 1999).

Bedeutsam im Hinblick auf die Tumorigenese und Metastasierung ist die Protektion transformierter, epithelialer Zellen vor dem programmierten Zelltod nach Ablösung von der extrazellulären Matrix (ECM) (Le Gall *et al.*, 2000). In nicht-transformierten epithelialen Zellen dagegen führt die Aufhebung der ECM-Anbindung zur Translokation pro-apoptotischer Proteine wie Bax an die Mitochondrien und zur Cytochrom C Freisetzung und damit zur Exekution der Apoptose (Rytömaa *et al.*, 2000). Diese Form des Zelltodes wird als Anoikis bezeichnet (Frisch und Francis, 1994). Nach McFall *et al.* (2001) sind es ERK-gesteuerte, aber PI(3)K- und RalGDS-unabhängige Signalwege, über welche die onkogenen Varianten von H-, K- und N-Ras sowie R-Ras und TC21 RIE-1 Zellen vor der Anoikis schützen. Rosen *et al.* (1998) beschreiben ebenfalls einen protektiven Effekt durch aktiviertes K- oder H-Ras. Dabei wird aber zum einen das pro-apoptotisch wirkende Protein Bak PI(3)K-abhängig herunterreguliert. Zum anderen vermittelt Ras MAPK- und PI(3)K-unabhängig die Stabilisierung des anti-apoptotischen Effektors Bcl-X_L, das sonst nach Ablösen der Zellen von der ECM oder durch Disruption des Zytoskeletts herunterreguliert wird (Rosen *et al.*, 2000). Sowohl onkogenes H-Ras als auch Raf vermag die Anoikis von MCF-10A Zellen zu supprimieren (Schulze *et al.*, 2001). Dabei unterdrückt Raf die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung von Caspase 8. Zudem induziert Raf die Expression von u.a. TGF α sowie Faktoren der EGF-Familie wie *heparin binding EGF like growth factor* (HB-EGF) oder Amphiregulin. Diese Faktoren führen zur autokrinen Stimulation des EGFR und nachfolgender Aktivierung des PI(3)K/Akt-Signalweges, was entscheidend für die Prävention der Anoikis durch Raf ist. Demgegenüber erfolgt der H-Ras(G12V) vermittelte Schutz EGFR-unabhängig durch direkte Aktivierung von PI(3)K/Akt (Schulze *et al.*, 2001). Die Inhibition von Rac oder Cdc42 entspricht dem Verlust der Anheftung an die ECM und induziert über p53 die Anoikis in immortalen und primären Zellen (Rul *et al.*, 2002). Die Inhibition dieser kleinen GTPasen führt dabei zur MAPK-Aktivierung über einen Signalweg, an dem PI(3)K, Akt, Raf und MEK nicht aber Ras beteiligt ist. Dabei ist die moderate MAPK-Aktivierung ein essentieller Bestandteil des pro-apoptotischen Signals. Ein starkes, anhaltendes MAPK-Signal dagegen fördert das Überleben der Zellen nach Inhibition von Rac/Cdc42 (Rul *et al.*, 2002). Umgekehrt unterdrückt die konstitutive Aktivierung von Cdc42 über PI(3)K und Rac1 abhängige Signale die Anoikis von MDCK Zellen in Suspension (Cheng *et al.*, 2004).

- ***...andererseits kann Ras auch die Apoptose induzieren***

Eine Reihe von Studien, basierend auf Untersuchungen in Fibroblasten und Lymphozyten, belegt die Beteiligung von Ras an pro-apoptotischen Prozessen. Dabei führt Ras zur Apoptose dieser Zelltypen unter Bedingungen von Stress, dem Verlust der Matrix-Anbindung (McGill *et al.*, 1997), erhöhter Expression von *c-myc* (Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997), TNF α oder Fas-Stimulation (Chen und Faller, 1996; Trent *et al.*, 1996) sowie bei Suppression von PKC. Infolge der PKC-Inhibition kommt es zur verstärkten Bildung von *reactive oxygen species* (ROS), was wesentlich zur Induktion der Apoptose Ras-transformierter NIH 3T3 Zellen beiträgt (Liou *et al.*, 2000). GleichermäÙen führt die PKC-Inhibition auch in Zelllinien aus einem Pankreas- bzw. kolorektalen Tumor, die beide jeweils ein onkogenes *K-ras* Allel enthalten, zu einer erhöhten Apoptoserate im Vergleich zu Linien ohne aktiviertes Ras (Liou *et al.*, 2004). In Lymphozyten führt die Überexpression von onkogenem Ras möglicherweise über einen MAPK-abhängigen Signalweg zur erhöhten Expression von Fas (FasL) (Latinis *et al.*, 1997). Unter bestimmten Bedingungen ist auch *v-ras* in der Lage Apoptose zu induzieren (Fukasawa und Vande Woude, 1997). In dieser und anderen Arbeiten ist der pro-apoptotische Effekt von Ras in Fibroblasten an den Verlust der p53-Aktivität geknüpft. Andererseits stimuliert eine transiente Erhöhung des Ras-Spiegels p53-abhängig die Induktion von Bax (Ma *et al.*, 2002). Die Akkumulation von p53 im Zytoplasma kann Bax direkt aktivieren, was zur Permeabilisierung der Mitochondrien, Cytochrom C-Freisetzung und Apoptose führt (Chipuk *et al.*, 2004). An der Übermittlung der pro-apoptotischen Funktion von Ras ist in einigen Systemen auch Raf (Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997) bzw. die Raf > ERK Kaskade (Latinis *et al.*, 1997) beteiligt. Die Auslösung der Apoptose durch onkogenes Ras wird jedoch durch Ras induzierbare anti-apoptotische Mediatoren wie NF- κ B (Mayo *et al.*, 1997), Rac (Joneson und Bar-Sagi, 1999) oder Bcl-2 aufgehoben. Letzteres wird infolge apoptotischer Stimuli vom ER an die Mitochondrien umverteilt und sequestriert dort durch direkte Interaktion über seine BH4-Domäne Ras (Denis *et al.*, 2003). Der pro-apoptotischen Aktivität von Ras mag daher ein Defekt oder die Beeinflussung der anti-apoptotischen Wirkung von Ras vorausgehen (Cox und Der, 2003).

- ***Ras als zellulärer Überlebensfaktor***

In einigen Studien wurde auch die Bedeutung von Ras selbst als „Überlebensfaktor“ für Zellen herausgearbeitet. Nach Gardner und Johnson (1996) führt FGF-2 zur Ras > ERK-Aktivierung und schützt Fibrosarkoma Zellen dadurch vor der TNF α -vermittelten Apoptose. Die Blockade des endogenen Ras durch Expression von dominant-negativem H-Ras(S17N) oder Inhibition von MEK-1 hebt dagegen den protektiven Effekt von FGF-2 in TNF α -stimulierten Zellen auf.

N-Ras vermittelt wahrscheinlich ein permanentes anti-apoptotisches Signal (Wolfman und Wolfman, 2000). Dieses geht eventuell von Mitochondrien-lokalisiertem N-Ras aus. Denn dieses lokalisiert ebenso wie andere Ras-Isoformen und eine Reihe von Ras-Effektoren an Mitochondrien (Kharbanda *et al.*, 2000; Peruzzi *et al.*, 2001; Wang und Reed, 1998). N-Ras Null-Fibroblasten weisen eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli auf, die durch Expression von N-Ras aufgehoben werden kann. Dabei fördert N-Ras Isoform-spezifisch das Überleben der Fibroblasten zum einen durch basale Aktivierung von Akt und nachfolgender Phosphorylierung von Bad an Ser136 (Wolfman und Wolfman, 2000), zum anderen initiiert es eine *transiente* Aktivierung der JNK/p38 (Wolfman *et al.*, 2002). Dafür ist möglicherweise eine direkte Interaktion von Ras mit der JNK (Adler *et al.*, 1995) oder mit MEKK-1, einer Jun Kinase Kinase Kinase (Russell *et al.*, 1995) bedeutsam. In einigen Zellsystemen wie z.B. N-Ras *knockout*-Fibroblasten oder Jurkat Zellen (Chen *et al.*, 1998) führt eine *dauerhafte* Aktivierung der JNK zur Apoptose, was durch das gemeinsame Wirken verschiedener Proteinkinasen vermittelt werden könnte. Proteinkinasen wie PAK2 (Rudel und Bokoch, 1997), MEKK-1 (Cardone *et al.*, 1997) oder Mst1 (Graves *et al.*, 1998) werden nach Induktion der Apoptose durch Caspasen gespalten, dadurch aktiviert, stimulieren den JNK Signalweg (Ura *et al.*, 2001) und sind in der Lage die Apoptose zu induzieren. Wie JNK selbst das apoptotische Programm aktiviert, ist nur bruchstückhaft aufgeklärt. Die JNK trägt aber einmal durch multiple Phosphorylierung von Bcl-2 und Bcl-X_L zu deren Inaktivierung bei (Fan *et al.*, 2000; Maundrell *et al.*, 1997) und stimuliert andererseits die pro-apoptotisch wirkenden Proteine Bim und Bax (Putcha *et al.*,

2003; Tsuruta *et al.*, 2004). Darüber hinaus zeigen Untersuchungen in *JNK1/JNK2* doppel-*knockout* Mäusen, dass JNK1 und 2 an der Freisetzung von Cytochrom C und Aktivierung der Caspasen beteiligt sind und dadurch die „mitochondriale“ Apoptose induzieren (Tournier *et al.*, 2000). In einer anderen Studie wurde jedoch nachgewiesen werden, dass die anhaltende Aktivierung der JNK allein nicht zur Apoptose von CC139 Fibroblasten (*Chinese hamster lung cells*) führt. Erst die Kombination aus JNK Aktivierung und Blockade der PI(3)K mit dem Inhibitor LY294002 induziert Apoptose, wobei die anti-apoptotisch wirkenden Proteine Bcl-2 und Mcl-1 (Bim-1 Antagonist) herunterreguliert und Bax sowie Caspasen aktiviert werden. (Molton *et al.*, 2003).

2.6.1.3. Verwicklung von Ras in die Tumorigenese

- ***Ras-Hyperaktivität in Tumoren***

Eine deregulierte, permanente Aktivierung von Ras in verschiedenen Tumorklassen wird durch unterschiedliche Mutationen in den Krebszellen verursacht. Eine Variante stellen die bereits erwähnten onkogenen Mutationen in *ras* Genen selbst dar. Deren Auftreten ist in verschiedenen Tumoren Ras-Isoform spezifisch: *K-ras* Mutationen kommen in ca. 90% der Pankreastumore, 50% der Kolonkarzinome und 30% der Lungen-Adenokarzinome vor, wohingegen *H-ras* oder *N-ras* Mutationen in diesen Tumoren sehr selten sind. Umgekehrt wurden *N-ras* Mutationen in ungefähr 25% akuter Leukämien beobachtet, wobei *H-ras* oder *K-ras* Mutationen weniger häufig sind. Insgesamt sind Mutationen in *H-ras* (weniger als 1%) nur sehr selten mit menschlichen Tumoren assoziiert (Ahuja *et al.*, 1990; Bos, 1988). Eine Reihe von Untersuchungen legt nahe, dass die Mutation von *ras* ein initiales Ereignis bei der humanen Tumorigenese ist. So finden sich *ras*-Mutationen in frühen Läsionen verschiedener Tumortypen, darunter epithelialen und hämatopoetischen Ursprungs (Hruban *et al.*, 2000; Onida *et al.*, 2002). Die Punktmutationen betreffen die Aminosäurereste 12, 13 und 61 der entsprechenden Proteine (Barbacid, 1987) und hemmen allesamt die GTPase Reaktion, wodurch Ras in einem GTP-gebundenen, konstitutiv aktiven Zustand akkumuliert (Abschnitt 2.4.3.).

Die Ras-vermittelte zelluläre Transformation/Tumorigenese ist vollständig von einer kontinuierlichen Ras-Expression abhängig und ohne diese nahezu komplett reversibel (Fisher *et al.*, 2001; Jacobsen *et al.*, 2002). So führt in experimentell durch induzierbares H- oder K-Ras(G12V) erzeugten Tumoren der Verlust dieser aktiven Varianten zur Apoptose der Tumorzellen (Chin *et al.*, 1999; Fisher *et al.*, 2001). Dabei spielt die permanente Aktivierung von z.B. Erk und Cyclin D1 eine wichtige Rolle. Cyclin D1 fungiert selbst als Onkogen und spielt u.a. eine wichtige Rolle während der Onkogenese der Haut bei Mäusen (Hinds *et al.*, 1994; Rodriguez-Puebla *et al.*, 1999). Zudem werden Cyclin D1 wie auch Pin1, deren Transkription durch Ras stimuliert wird, in einer Reihe von Tumoren wie z.B. Brustkrebs überexprimiert (Hunter und Pines, 1994; Wulf *et al.*, 2001). Konkordant mit der wichtigen Rolle von Pin1/Cyclin D1 bei der Transformation, verhindert die Inhibition von Pin1 die Neu/Ras-vermittelte Transformation epithelialer MCF-10A Zellen (Ryo *et al.*, 2002).

Der Verlust der GAP-Funktionalität, die Amplifikation/Mutation von Ras-Effektoren oder die Hyperaktivität von Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren stellen weitere Möglichkeiten einer kontinuierlichen Ras-Aktivität in Tumoren dar. So fungiert das GAP Protein Neurofibromin (NF-1) als ein Tumorsuppressor (Gutmann, 2001; Weiss *et al.*, 1999). Die Inaktivierung eines Allels von *NF-1* ruft die Ausbildung multipler, benigner Tumoren hervor und betrifft das gesamte Nervensystem (Neurofibromatose). Der Verlust beider Kopien hat die Ausbildung maligner Tumoren (neurogene Sarkome und plexiforme Neurofibrome) zur Folge (Feldkamp *et al.*, 1999). Insbesondere bei Melanomen (ca. 70%) und Kolonkarzinomen (ca. 15%) treten aktivierende Mutationen in der Kinasedomäne von *B-raf* gehäuft auf (Davies *et al.*, 2002). In anderen Tumoren wurden Amplifikationen des *p110 α* -Gens der PI(3)K oder von *akt2* gefunden (Bellicosa *et al.*, 1995). Ein prominentes Beispiel für die Überexpression von RTK ist die des EGFR ErbB2, auch als Her2/neu bezeichnet, beispielsweise in Mammakarzinomen (ca. 30%).

- ***Umbildung zu einem „aggressiven“ zellulären Phänotyp***

Einen wichtigen Vorgang bei der Tumorigenese stellt die sogenannte epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) dar. Die EMT umschreibt De-Differenzierungsvorgänge, bei der epitheliale Zellen zunächst einen fibroblasten-ähnlichen (fibroblastoid), invasiven Phänotyp ausbilden. Bei diesem Prozess werden Epithel-spezifische Proteine wie z.B. E-Cadherin, β -Integrin oder ZO-1 herunterreguliert und Mesenchym-typische Proteine wie Vimentin verstärkt exprimiert. Diese „umgewandelten“ Zellen bilden tubulär verzweigte Strukturen in 3D-Collagengelen (als epitheliale Plastizität bezeichnet) aus und weisen eine erhöhte Motilität/Migration auf. Dadurch sind diese veränderten Zellen befähigt die umgebende extrazelluläre Matrix zu verdauen und durch diese zu migrieren (Grünert *et al.*, 2003). Die Degradation der ECM und anschließende Migration stellen zwei bedeutende Prozesse eines invasiv/metastasierenden Phänotyps dar. An der EMT sind u.a. HGF/ SF (*Hepatocyte growth factor/ Scatter factor*), sein Rezeptor c-met, FGF (*fibroblast growth factor*), sowie eine längerfristige, kooperative Aktivierung von TGF- β (*transforming growth factor*) und Ras beteiligt (Lehmann *et al.*, 2000). Die Ras-vermittelte permanente ERK-Aktivität wirkt auf die Genexpression Mesenchym-spezifischer Marker (z.B. Vimentin), während Ras> PI(3)K-Signale die Hyperproliferation der epithelialen Zellen fördern und die TGF- β -induzierte Apoptose unterdrücken (Janda *et al.*, 2002). Die autokrine Sekretion von TGF- β hält die EMT aufrecht, während sie durch Interferenz mit Ras- oder TGF- β -Signalwegen aufgehoben wird. Interessanterweise sind alle Tumorbildenden Zelltypen, die zur EMT befähigt sind auch in der Lage zu metastasieren, weshalb die EMT als ein gutes *in vitro* Modell für die Metastasierung gilt (Grünert *et al.*, 2003; Janda *et al.*, 2002). Wie für die EMT ist auch für die Tumorprogression und Metastasierung die kooperative Wirkung von Liganden für RTK und TGF- β *in vitro* und *in vivo* essentiell (Oft *et al.*, 1996). So stimuliert HGF/c-Met u.a. die Motilität der tumorigenen Zellen, woran eine ganze Reihe verschiedener Proteine wie z.B. Gab1, PLC, PI(3)K, MAPK, FAK, Cadherin oder β -Catenin beteiligt ist (Birchmeier *et al.*, 2003). Die tumorigene Wirkung von Ras ist eng mit dem Rezeptor c-Met verknüpft. Zum einen induziert Ras durch transkriptionelle Stimulation die Überexpression von c-Met (Ivan *et al.*, 1997), der wiederum die Expression seines eigenen Liganden HGF anregt (Rong *et al.*, 1992). Durch derartige Mechanismen werden c-Met> Ras-vermittelte Effekte amplifiziert und dereguliert. Zum anderen konnte durch Expression funktionell-inaktiver c-Met-Rezeptoren, die unfähig sind benachbarte Rezeptoren zu transaktivieren, die Tumorbildung H-Ras-transformierter muriner Zelllinien verzögert und deren Metastasierung signifikant supprimiert werden (Furge *et al.*, 2001). Umgekehrt übernimmt Ras selbst eine zentrale Rolle bei c-Met-initiierten Effekten, wie die Inhibition der HGF-vermittelten Motilität durch dominant-negatives Ras zeigt (Hartmann *et al.*, 1994). In MDCK Zellen induzieren Ras(G12V) oder HGF unter Beteiligung von Rac1 und durch synergistische Aktivierung der PI(3)K- und Raf> MEK1-Signalwege die Ablösung von E-Cadherin und β -Catenin von interzellulären Verbindungen. Dadurch werden Zell-Zell-Kontakte (*adherens junctions*) destabilisiert und es kommt zum sogenannten *Scattering* und streuen von Zellkolonien (Potempa und Ridley, 1998). Darüber hinaus fördern HGF/c-Met und Ras auch die Expression ECM-abbauender Proteasen oder deren Regulatoren wie uPA (Ried *et al.*, 1999) und MMP (Garcia-Guzman *et al.*, 1999; Hamasuna *et al.*, 1999; Harvey *et al.*, 2000).

- ***Ras und Metastasierung***

Kleine Tumoren mit einem Durchmesser von 1-2mm können in einem Gewebe ohne zu vaskularisieren persistieren (Holmgren *et al.*, 1995). Um das Zentrum eines weiter wachsenden Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, werden neue Gefäße ausgebildet. Dieser Prozess der Neovaskularisation wird als „*angiogenic switch*“ bezeichnet (Hanahan und Folkman, 1996). Die Angiogenese wird durch positive Regulatoren wie VEGF, bFGF oder Angiogenin angeregt und durch Faktoren wie Angiostatin, Endostatin oder Thrombospondin (Tsp-1) inhibiert. Ras verschiebt die Balance zwischen diesen Faktoren in Richtung Angiogenese. Onkogenes Ras stimuliert einerseits die Expression von VEGF (Rak *et al.*, 1995) und hemmt andererseits die Expression von Tsp-1 (Rak *et al.*, 2000). Letzteres wird auf Ebene der Transkription über c-Myc reprimiert, wobei c-Myc über eine Ras> PI(3)K> Rho> ROCK-Kaskade phosphoryliert und aktiviert

wird (Watnick *et al.*, 2003). Interessanterweise zeigt diese Studie auch, dass H-Ras(G12V)-transformierte menschliche Zellen mit einer schwachen Ras-Expression nur sehr kleine Tumoren (Durchmesser von 1-2mm) nach subkutaner Injektion in Nacktmäusen bilden. Die ektopische Expression von VEGF in diesen Zellen führt dagegen zur Bildung großer Tumoren (Durchmesser ca. 1,5cm), die auch bei starker Ras-Expression entstehen. Diese Ergebnisse belegen die kritische Rolle von Ras bei der Tumorigenese. Durch seine Fähigkeit die Angiogenese zu fördern (beispielsweise durch Hemmung von Tsp-1), trägt onkogenes Ras einmal zum Wachstum des Primärtumors bei, zum anderen ermöglicht die Anbindung an die Blutbahn die Streuung von Tumorzellen (Metastasierung). Die einzelnen Schritte der Metastasierung, an denen Ras beteiligt ist, sind bislang nicht aufgeklärt. Untersuchungen in Tiermodellen haben aber gezeigt, dass Ras-transformierte NIH 3T3 Zellen wie auch Kontrollzellen gleichermaßen zur Extravasation (Übertritt metastasierender Zellen aus der Blutbahn in das umgebende Gewebe) fähig sind. Allerdings wuchsen lediglich die aus Ras-transformierten Zellen bestehenden Mikrometastasen weiter, während die aus Kontrollzellen verschwanden (Koop *et al.*, 1996). Dabei verschiebt aktiviertes Ras das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation in Richtung Überleben und Wachstum und unterstützt die Metastasierung (Varghese *et al.*, 2002).

2.6.2. Ras als Zielmolekül in der Krebstherapie

Ras ist das am häufigsten mit humanen Krebserkrankungen assoziierte, aktivierte Onkogen und stellt aufgrund der Einbindung in die Regulation verschiedener Facetten der Malignität ein attraktives Ziel der Krebstherapie dar (Downward, 2003). Die kovalente Verknüpfung von H-Ras, N-Ras und K-Ras mit einer Farnesyloisoprenoid-Gruppe ist der erste Schritt in der post-translationalen Prozessierung dieser Proteine. Diese Modifikation ist essentiell für die biologische Aktivität von Ras und diente als Ansatzpunkt für Inhibitoren. Schon vor längerer Zeit wurden sogenannte Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTI) entwickelt, die entweder das CAAX-Motiv von Ras imitieren, mit dem Farnesylpyrophosphat kompetitieren oder beide Eigenschaften vereinen (Cox und Der, 2002). Mit diesen Inhibitoren wird die Farnesylierung von Ras gehemmt und die Translokation des Proteins an die Plasmamembran blockiert. In einem Ansatz ließ sich die durch Expression von onkogenem H-Ras verursachte Tumorbildung in Mäusen durch Verwendung eines FTI erfolgreich unterbinden- wobei der Inhibitor außerdem nur schwach toxisch wirkte (Kohl *et al.*, 1995). Trotz dieses vielversprechenden Ansatzes stellte sich heraus, dass sich die FTI nur eingeschränkt wirken. Das beruht vor allem darauf, das zwar H-Ras allein durch die Farnesyltransferase, N-Ras und K-Ras jedoch alternativ bei Blockade der Farnesylierung durch die Geranylgeranyltransferase modifiziert werden können, was aber keinen Einfluss auf die Funktionalität hat (Fiordalisi *et al.*, 2003). Mit den FTI ist es nicht möglich alle Ras-Isoformen effektiv zu inhibieren, was auch deren geringe Toxizität erklärt (Lerner *et al.*, 1997). Zudem treten *H-ras*-Mutationen äußerst selten in humanen Tumoren auf (s. Abschnitt 2.6.1.3.). Dennoch blockieren die FTI die Farnesylierung anderer Proteine und wirken eher als generelle Inhibitoren der Signaltransduktion. In dieser Eigenschaft zeigen sie jedoch eine Antitumor-Wirkung und werden auch in (vor)klinischen Studien getestet (Cortes *et al.*, 2003; Ohkanda *et al.*, 2002). Möglicherweise ist die Blockade weiterer post-translationaler Schritte der Ras-Prozessierung erfolgversprechender. Die Blockade von Rce1, der CAAX-Endopeptidase, beeinflusst das Wachstum K-Ras oder H-Ras transformierter Zellen nur partiell. Demgegenüber verlieren K-Ras(G12V)- oder B-Raf(V599E)-exprimierende *Icmt-knockout*-Fibroblasten, die defizient für die Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase sind, die Fähigkeit in Soft-Agar zu wachsen (Bergo *et al.*, 2004).

Ein weiterer Ansatz der Ras-Blockade zielt auf die Inhibition der Ras-Expression durch Antisense Oligonukleotide und *short interfering RNA* (si-RNA). Yin *et al.* (2003) konnten zeigen, dass nach Transfektion von si-RNA, die u.a. entweder gegen die mRNA von *H-ras*, *bcl-2*, *cdk-2* oder *mdm2* gerichtet ist, die entsprechenden Proteinspiegel effektiv supprimiert werden, und die Proliferation verschiedener Tumorzelllinien (u.a. HeLa und Melanomlinie MM66) deutlich inhibiert wird. Durch den Einsatz von antisense-RNA konnte die Tumorigenizität von K-Ras-transformierten Lungenzellen in Nacktmäusen unterdrückt werden (Mukhopadhyay *et al.*, 1991). Daneben wurden auch antisense Oligonukleotide entwickelt, welche die Expression von *H-ras* oder *c-raf1* nach Transfektion in Zellen hemmen. Diese

2. Einleitung

erwiesen sich aber in klinischen Studien als unwirksam, möglicherweise weil andere Isoformen wichtigere Mediatoren darstellen und/oder das Fehlen von H-Ras oder c-Raf1 kompensieren.

Eventuell eröffnen zukünftig auch gegen das mutierte Ras-Protein gerichtete Therapieansätze Möglichkeiten der Intervention. So berichten Hunger *et al.* (2001) von einer erfolgversprechenden Anwendung einer gegen mutiertes Ras-gerichtete Immunotherapie. Die Einführung eines Fragmentes (scFv) des neutralisierenden anti-Ras monoklonalen Antikörpers (Y13-259) führt in Tumorzellen zur Apoptose und zur Tumorregression in Nacktmäusen (Cochet *et al.*, 1998). Fischbach und Settleman (2003) konnten mit der Nucleosiddiphosphat-Kinase onkogenes Ras in die inaktive GTP-gebundene Form überführen, ohne das dabei das wildtypische Ras beeinflusst wird. Darüber hinaus ließ sich auch durch Verwendung der RBD, die mit anderen Effektoren um die Bindung an aktives Ras kompetetiert, eine blockierende Wirkung auf Ras-gesteuerte Signalwege und die Transformation nachweisen (Clark *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2002).

Neben diesen Ras-gerichteten Inhibitoren gibt es auch eine Reihe teilweise vielversprechender Blocker, die auf Ras-Effektor-Signalwege abzielen (ausführliche Darstellung bei Downward (2003). Dazu gehören u.a. Inhibitoren gegen MEK1 (PD98059 und U0126), Raf (BAY43-9006) oder mTOR (CCI-779, RAD-001), deren antitumorogene Wirkung nachgewiesen werden konnte und deren therapeutisches Potential z.T. in Phase II und III Studien untersucht wird. Der EGF-Rezeptor stellt wie andere Rezeptor-Tyrosinkinasen ein weiteres Ziel dar. Zum einen ist Ras ein wichtiger Mittler der Rezeptoren, zum anderen induzieren onkogene Ras-Varianten durch Aktivierung des Raf> ERK Signalweges die Produktion autokrin-wirkender Wachstumsfaktoren wie EGF (Normanno *et al.*, 2001). Dabei wurden/werden sowohl Kinaseinhibitoren (ZD1839, OSI-774) als auch gegen die extrazelluläre Domänen gerichtete monoklonale Antikörper (Trastuzamab) entwickelt und eingesetzt. Besonders letzterer wird effektiv bei metastasierendem Brustkrebs mit ErbB2-Überexpression eingesetzt.

Diese Übersicht zeigt insbesondere, dass bislang die Suche nach Ras-spezifischen, effizient wirkenden Inhibitoren wenig erfolgreich war. Dabei bildet gerade Ras als Onkogen und durch seine Verstrickung in zahlreiche tumorigene/maligne Prozesse eine ideale Zielstruktur für potentielle Inhibitoren.

2.7. Fragestellung und experimentelles Design

Das Ziel dieses Projektes lag in der Entwicklung/ Etablierung verschiedenartiger, multivalenter RBD, die zusammenfassend als *multivalent scavengers of oncogenic Ras* (MSOR) bezeichnet werden. Diese aus miteinander verbundenen RBD bestehenden Konstrukte interagieren spezifisch mit aktivem Ras, d.h. GTP-gebundenem Ras, und sollen zwei Kriterien erfüllen:

(1) Die entwickelten MSOR-Varianten sollen hochaffin und (dauerhaft) aktives Ras binden und dadurch als „Ras-Blocker“ wirken. Mit derartigen MSOR-Varianten sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- a) Sind diese MSOR in der Lage insbesondere Ras-Onkogen aktivierte Signalwege zu modulieren?
- b) Ermöglicht es der Einsatz dieser MSOR die Ras getriebene zelluläre Transformation zu inhibieren?

(2) Fluoreszenzmarkierte MSOR-Varianten, die Ras-GTP lediglich binden nicht aber blockieren, sollen als spezifische Sonden eingesetzt werden, um die Aktivierung von endogenem Ras in lebenden Zellen räumlich und zeitlich aufgelöst zu verfolgen. Diese niederaffinen MSOR sollen zur Beantwortung weiterer Fragestellungen eingesetzt werden:

- c) Ist es möglich mit derartigen Sonden die Aktivierung von endogenem Ras zu detektieren?
- d) An welchen Kompartimenten wird Ras infolge verschiedener Stimuli aktiviert?
- e) Kommt es tatsächlich (wie in der Literatur beschrieben) zur Aktivierung von endogenem Ras am Golgi-Apparat?
- f) Gibt es Unterschiede im Aktivierungsmuster zwischen verschiedenen Stimuli und/ oder verschiedenen Zelltypen?

Die Idee des MSOR-Konzeptes besteht darin, dass die Verknüpfung von RBD zu einer entropiegetriebenen, kooperativen und dadurch stärkeren Bindung an Ras führt. D.h. die Oligomerisierung ermöglicht die

2. Einleitung

Bindung einer einzelnen RBD an Ras-GTP sowie die Rekrutierung einer gekoppelten RBD, die wiederum mit einem weiteren aktivierten Ras Molekül interagiert. Folglich wird so die temporäre Bindung der MSOR an Ras im Vergleich zur einzelnen RBD deutlich verlängert. Um die Bindungseigenschaften der MSOR beiden o.g. Zielen anzupassen, bieten sich prinzipiell drei Regulationsmöglichkeiten: (i) Änderung der Anzahl miteinander verknüpfter Bindedomänen (Oligomerisierungsgrad), (ii) deren Abstand voneinander oder (iii) Änderung der Affinität der RBD für Ras-GTP. Aus geeigneten Kombinationen dieser Möglichkeiten sollen Ras-Binder respektive Ras-Blocker hervorgehen. Bislang ist jedoch über die Topographie und Topologie von Rezeptoren bzw. Ras in der Plasmamembran speziell nach deren Aktivierung nur wenig bekannt und kann für aktiviertes Ras lediglich anhand Computer-generierter Modelle simuliert werden (Haugh, 2002; Kusumi *et al.*, 1993). Daher lässt sich die Anzahl der RBD für funktionelle Oligomere oder ein geeigneter Abstand zwischen den einzelnen Domänen schwerlich definieren. In Anlehnung an die Arbeit von Gillooly *et al.* (2000) wurde ein konstanter Abstand von fünf Aminosäuren in alle multivalenten Konstrukte eingeführt, die aus zwei oder drei RBD zusammengesetzt sind.

Um die Affinität der RBD für Ras-GTP zu variieren, wurden neben der wildtypischen (WT) auch mutierte RBD verwendet, die viel schwächer als der Wildtyp binden. Die Interaktion zwischen RBD und Ras *in vitro* wurde durch die Gruppe von A. Wittinghofer bereits eingehend charakterisiert. Dabei wurden sowohl die Bindungskonstanten für eine ganze Reihe von RBD-Varianten (Nassar *et al.*, 1996), als auch die thermodynamischen Parameter der WT-RBD/Ras Interaktion bestimmt (Rudolph *et al.*, 2001). Aufgrund dessen konnten RBD-Mutanten ausgewählt werden, die ca. 25x (T68A; $K_D=0,45\mu\text{M}$) bzw. 70x (R59A $K_D=1,2\mu\text{M}$) schwächer H-Ras-GTP binden als der WT ($K_D=18\text{nM}$). Die entsprechenden in pGEX Vektoren klonierten cDNA der RBD-Konstrukte wurden freundlicherweise von A. Wittinghofer zur Verfügung gestellt.

Zunächst sollten also verschiedene MSOR-Konstrukte mittels Klonierung hergestellt werden. *In vitro* Analysen wie der Ras/GAP-Assay sollten zeigen, ob das oben vorgestellte Konzept für die Entwicklung von MSOR mit den gewünschten Eigenschaften anwendbar ist. Um die verschiedenen Fragestellungen zu beantworten sollte anschließend die Wirkung geeigneter MSOR in lebenden Zellen untersucht werden. Die blockierende Wirkung auf Ras-abhängige Signalwege (a) sollte mittels Western Blot und die Blockierung der zellulären Transformation (b) in etablierten Transformationsassays getestet werden. Um die endogene Ras-Aktivität in lebenden Zellen verfolgen zu können (c-f), sollten die MSOR mit einem Fluorophor (GFP) fusioniert werden. Nach Expression der Sonde in verschiedenen Zelllinien sollte die Stimulus-bedingte Ras-Aktivierung durch Konfokalmikroskopie aufgezeichnet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien

Die Laborchemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: *Roth (Karlsruhe, Deutschland)*; *Difco Laboratories (Detroit, USA)*; *Merck (Darmstadt, Deutschland)*; *Serva (Heidelberg, Deutschland)*; *Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)*

3.1.2. Verwendete Organismen und Zelllinien

Tabelle 2
Escherichia coli-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
- Top10F'	F' {lacI ^q , Tn10(Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mrcBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA</i> <i>nupG</i>	Arbeitsgruppe
- BL21(DE3)pLysS	F', <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (r ^B m ^B) <i>gal dcm</i> (DE3)pLysS (Cam ^R)	Arbeitsgruppe

Säugerzellen

Name	Zelltyp/ Beschreibung	Quelle
- Cos-7	SV40-transformierte, fibroblastenähnliche, epitheliale Nierenzellen aus <i>Cercopithecus aethiops</i>	Arbeitsgruppe
- NIH 3T3	Kontaktinhibierte Fibroblasten aus NIH Swiss Mausembryo	Arbeitsgruppe
- NIH-TM	NIH 3T3 mit stabil integrierter <i>trk/met</i> -Rezeptorchimäre	Cramer <i>et al.</i> (2005)
- HeLa	Epithelähnliche Adenokarzinom-Zelllinie aus dem Zervix	Arbeitsgruppe

3.1.3. Medien

3.1.3.1. Medium zur Kultivierung von *E.coli*

- LB-Medium
 - 1,0% Trypton
 - 0,5% Hefeextrakt
 - 0,5% NaCl
- LB-Agar
 - 1,0% Trypton
 - 0,5% Hefeextrakt
 - 0,5% NaCl
 - 1,5% Agar

3. Material und Methoden

3.1.3.2. Medium zur Kultivierung von Säugerzellen

- DMEM (*Dulbecco's modified Egel's medium*) mit 3,7g/l NaHCO₃, 1,0g/l D-Glucose und 1,0289g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin (*Biochrom AG, Berlin, Deutschland*)
- Kompletmedium: DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS; *Biochrom AG*) und 1% Gentamycin

3.1.4. Primer

Die verwendeten Primer wurden von der *JenaBioScience GmbH (Jena, Deutschland)* bezogen. Die in den einzelnen Primern vorhandenen Schnittstellen für Restriktasen sind in der Sequenz unterstrichen dargestellt und das entsprechende Enzym in der rechten Spalte aufgeführt. Die kursiv gesetzten Sequenzbereiche entsprechen der spezifischen, kodierenden Sequenz. Die hervorgehobenen Nukleotide markieren Triplets zur gezielten Mutagenese der *RBD* oder von *ras* (s. Abschnitt 3.2.7.10.). Die Sequenzierprimer sind am 5'-Ende mit dem Farbstoff IRD 800 markiert und stammen von *MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)*.

3.1.4.1. Primer für die Amplifikation der RBD

Bezeichnung	Sequenz	Restriktase
RBD1_fwd	5'-CCG <u>CTC GAG</u> AAA GAC AAG CAA CAC TAT CCG T-3'	<i>XhoI</i>
RBD1_rev	5'-AAA <u>ACT GCA GCG GAT CCC</u> AGG AAA TCT ACT TGA AGT TC-3'	<i>PstI, BamHI</i>
RBD2_fwd	5'-AAA <u>ACT GCA GGT</u> AAG ACA AGC AAC ACT ATC CGT-3'	<i>PstI</i>
RBD2_rev	5'-CAT <u>GCC ATG GCA GAT CTC</u> AGG AAA TCT ACT TGA AGT TC-3'	<i>NcoI, BglII</i>
RBD3_fwd	5'-CAT <u>GCC ATG GGT</u> AAG ACA AGC AAC ACT ATC CG T-3'	<i>NcoI</i>
RBD3_rev	5'-CCG <u>GAA TTC TGA TCA</u> CAG GAA ATC TAC TTG AAG TTC-3'	<i>EcoRI, BclI</i>

3.1.4.2. Primer für die Amplifikation von Ras-Varianten

Bezeichnung	Sequenz	Restriktase
H-Ras_fwd	5'-CCG <u>CTC GAG</u> CAA TGA CGG AAT ATA AG-3'	<i>XhoI</i>
H-Ras_rev	5'-CCC <u>AAG CTT</u> CAT CAG GAG AGC ACA CA-3'	<i>HindIII</i>
K-Ras_fwd	5'-CCG <u>CTC GAG</u> CAA TGA CTG AAT ATA AAC TTG TG-3'	<i>XhoI</i>
K-Ras_rev	5'-CCC <u>AAG CTT</u> CTT ACA TAA TTA CAC ACT TTG T-3'	<i>HindIII</i>
TC21_fwd	5'-CCG <u>CTC GAG</u> CAA TGG CCG CGG CGG CTG GCG GA-3'	<i>XhoI</i>
TC21_rev	5'-CCG <u>GAA TTC</u> CAC TAG AAA ATG ACA CAA TGG CA-3'	<i>EcoRI</i>
M-Ras_fwd	5'-CCG <u>CTC GAG</u> CAA TGG CAA CCA GCG CCG TCC CC-3'	<i>XhoI</i>
M-Ras_rev	5'-CCC <u>AAG CTT</u> CTC ACA AGA TCA CAC ATT GCA GTT T-3'	<i>HindIII</i>

3. Material und Methoden

3.1.4.3. Primer für die Mutagenese von MSOR- und Ras-Varianten

Bezeichnung	Sequenz	Basenaustausch
N64D_fwd	5' - <i>TTC TTG CCG GAC AAG CAA AGA ACA GTG</i> -3'	AAC > GAC
N64D_rev	5' - <i>CAC TGT TCT TTG CTT GTC CGG CAA GAA</i> -3'	
R67A_fwd	5' - <i>AAC AAG CAA GCA ACA GTG GTC AAT GTG</i> -3'	AGA > GCA
R67A_rev	5' - <i>CAC ATT GAC CAC TGT TGC TTG CTT GTT</i> -3'	
T68A_fwd	5' - <i>AAG CAA AGA GCA GTG GTC AAT GTG CGA</i> -3'	ACA > GCA
T68A_rev	5' - <i>TCG CAC ATT GAC CAC TGC TCT TTG CTT</i> -3'	
V12>WT_fwd	5' - <i>GTT GTT GTT GGC GCC GGC GGT GTG GGC AAG</i> -3'	GTC > GGC
V12>WT_rev	5' - <i>CTT GCC CAC ACC GCC GGC GCC AAC AAC AAC</i> -3'	
D38A_fwd	5' - <i>CCC ACT ATA GAG GCT TCC TAC CGG AAG CAG</i> -3'	GAT > GCT
D38A_rev	5' - <i>CTG CTT CCG GTA GGA AGC CTC TAT AGT GGG</i> -3'	

3.1.4.4. Sequenzierprimer

T7-Promotor_fwd	5' - <i>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG</i> -3'
EGFP_fwd	5' - <i>GGT CCT GCT GGA GTT CGT</i> -3'
DsRed1_fwd	5' - <i>CTG GAC ATC ACC TCC CAC</i> -3'

3.1.5. Konstrukte und Plasmide

3.1.5.1. MSOR-Konstrukte

Konstrukt	Beschreibung
<i>WT-1</i>	monomere <i>c-raf RBD-1</i> über <i>XhoI/PstI</i>
<i>WT-2</i>	dimere <i>c-raf RBD-1</i> , zweite RBD über <i>PstI/NcoI</i>
<i>WT-3</i>	trimere <i>c-raf RBD-1</i> , dritte RBD über <i>NcoI/EcoRI</i>
<i>R59A-1</i>	} analog zum <i>WT</i> , aber mit R59A Mutation in jeder <i>RBD</i>
<i>R59A-2</i>	
<i>R59A-3</i>	
<i>T68A-1</i>	} analog zu <i>WT</i> , aber mit T68A Mutation in jeder <i>RBD</i>
<i>T68A-2</i>	
<i>T68A-3</i>	
<i>R59A,N64D-1</i>	} analog zu <i>WT</i> , aber mit R59A und N64D Mutation in jeder <i>RBD</i>
<i>R59A,N64D-2</i>	
<i>R59A,N64D-3</i>	
<i>R59A,R67A-1</i>	} analog zu <i>WT</i> , aber mit R59A und R67A Mutation in jeder <i>RBD</i>
<i>R59A,R67A-2</i>	
<i>R59A,R67A-3</i>	
<i>R59A,T68A-1</i>	} analog zu <i>WT</i> , aber mit R59A und T68A Mutation in jeder <i>RBD</i>
<i>R59A,T68A-2</i>	
<i>R59A,T68A-3</i>	

3. Material und Methoden

Die aufgelisteten MSOR Konstrukte (Mono-, Di- und Trimere von *WT*; *R59A*; *T68A*; *R59A,N64D*; *R59A,R67A*; *R59A,T68A*) wurden wie nachfolgend beschrieben in die Vektoren pRSET B und pEGFP-C2 eingebracht. Die monomere *RBD* wurde über *XhoI/PstI*, die dimere über *PstI/NcoI* und die trimere *RBD* über *NcoI/EcoRI* zunächst in pRSET B kloniert (s. Abschnitt 4.1.1.). Der Einbau der einzelnen Konstrukte in pEGFP-C2 erfolgte über *XhoI/EcoRI* (s. Abschnitt 4.1.3.1.). In Abb. A1 des Anhangs sind die Vektoren pRSET B (A) und pEGFP-C2 (B) mit den Varianten für *RBD-1*, *-2* bzw. *-3* schematisch dargestellt.

3.1.5.2. Ras-Konstrukte

Konstrukt	Beschreibung
<i>H-ras</i>	H-Ras
<i>H-ras(G12V)</i>	konstitutiv aktives H-Ras
<i>K-ras(G12V)</i>	konstitutiv aktives K-Ras
<i>H-ras(C181S,C184S)</i>	palmitoylierungs-defizientes H-Ras
<i>H-ras(G12V,C181S,C184S)</i>	konstitutiv aktives, palmitoylierungs-defizientes H-Ras
<i>H-ras(G12V,C186S)</i>	konstitutiv aktives, farnesylierungs-defizientes H-Ras
<i>H-ras(G12V,S35T)</i>	konstitutiv aktives, Raf bindendes H-Ras
<i>H-ras(G12V,G37E)</i>	konstitutiv aktives, u.a. RaGDS, NORE, PLC ϵ bindendes H-Ras
<i>H-ras(G12V,C40Y)</i>	konstitutiv aktives, PI(3)K bindendes H-Ras
<i>H-ras(G12V,D38A)</i>	bindet keine Effektoren
<i>H-ras(S17N)</i>	dominant negatives H-Ras
<i>M-ras(Q71L)</i>	konstitutiv aktives M-Ras
<i>TC21(Q72L)</i>	konstitutiv aktives TC21

Die aufgeführten Ras Konstrukte wurden wie nachfolgend beschrieben aus den Vektoren pSG5, peXV3 oder pCGN (M-ras, TC21) Vektoren amplifiziert und über *XhoI/HindIII* in pDsRed1-C1 kloniert. *TC21* wurde über *XhoI/EcoRI* in pDsRed1-C1 eingeführt (siehe Abschnitt 4.1.3.4.). Im Anhang ist die Konstruktion schematisch dargestellt (Abb. A2). *H-ras(G12V)* wurde nach der Amplifikation außerdem zum Zweck der rekombinanten Expression in pRSET B kloniert.

3.1.5.3. Molekulargewichte von MSOR- und Ras-Konstrukten und Proteinen

Konstrukt	Beschreibung	Größe in bp	Größe in kD
<i>RBD-1</i>	monomere <i>RBD</i> (<i>XhoI-PstI</i>)	257	-
<i>RBD-2</i>	dimere <i>RBD</i> (<i>XhoI-NcoI</i>)	509	-
<i>RBD-3</i>	trimere <i>RBD</i> (<i>XhoI-EcoRI</i>)	760	-
<i>H-ras</i>		570	-
<i>K-ras</i>		567	-
<i>M-ras</i>	siehe Abschnitt 3.1.5.2.	627	-
<i>TC21</i>		612	-
His-RBD-1		-	14,1
His-RBD-2		-	23,3
His-RBD-3	6xHis-fusionierte RBD bzw. Ras	-	31,9
His-H-Ras(G12V)		-	25,8
GFP-RBD-1		-	38,2
GFP-RBD-2	GFP-gekoppelte RBD	-	47,5
GFP-RBD-3		-	56,0

3. Material und Methoden

3.1.5.4. Plasmide (allgemein)

Plasmid	Konstrukt/ Beschreibung	Quelle
- <i>HA-erk2</i> /pcDNA3	Hämagglutinin (HA)-verknüpftes ERK2	Bondeva <i>et al.</i> (1998)
- <i>MMP-1-2G</i> /pGL3	<i>MMP-1-2G-firefly</i> -Luciferase Reporter gen	Rutter <i>et al.</i> (1998)
- <i>rap1A(G12V)</i> /pDsRed1-C1	konstitutiv aktives DsRed1-Rap1A	R. Pusch
- pDsRed1-C1	Konstruktion der DsRed1-Fusionen	P. Hemmerich
- pEGFP-C2	Konstruktion der eGFP-Fusionen	P. Hemmerich
- pRL-TK	Renilla-Luciferase Reporter gen	<i>Promega, Madison, WI, USA</i>
- pRSET B	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i>	<i>Invitrogen</i>

3.1.5.5. Donorplasmide für die Konstruktion der MSOR

Die Plasmide für die Konstruktion der MSOR wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe A. Wittinghofer zur Verfügung gestellt

Plasmid	Beschreibung	Quelle
- <i>rafRBD</i> /pGEX-2T - <i>rafRBD(R59A)</i> / pGEX-2T - <i>rafRBD(T68A)</i> / pGEX-2T	s. Abschnitt 3.1.5.1.	} Block <i>et al.</i> (1996)

3.1.5.6. Donorplasmide für die Konstruktion von DsRed1-Ras

Plasmid	Beschreibung	Quelle
<i>H-ras(G12V)</i> /peXV3 <i>K-ras(G12V)</i> /peXV3 <i>H-ras(G12V,C181S,C184S)</i> /peXV3 <i>H-ras(G12V,C186S)</i> /peXV3	s. Abschnitt 3.1.5.2.	} Arbeitsgruppe
<i>H-ras(G12V,S35T)</i> /pSG5 <i>H-ras(G12V,G37E)</i> /pSG5 <i>H-ras(G12V,C40Y)</i> /pSG5		} Arbeitsgruppe
<i>H-ras(S17N)</i> /pNRTIS 21		Arbeitsgruppe
<i>M-ras(Q71L)</i> /pCGN <i>TC2I(Q72L)</i> /pCGN		Murphy, G. Murphy, G.

3. Material und Methoden

3.1.6. Antikörper

Bezeichnung des Antigens	Verdünnung	Kat.-Nr.	Markierung	Quelle
- anti-phospho-p44/42 (Maus)	MAPK 1:2000	#9106	-	<i>Cell signalling, Frankfurt a.M., Deutschland</i>
- anti-p44 Erk1 (Maus)	1:2000	#610030	-	<i>Pharmingen, BD Biosciences, San Diego, CA, USA</i>
- anti-GFP (FL) (Kaninchen)	1:1000	#sc8334	-	<i>Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland</i>
- anti-HA (Maus-Hybridoma)	1:500	-	-	<i>Arbeitsgruppe (F.D. Böhmer)</i>
anti-Digoxigenin-AP Antikörper			Digoxigenin	<i>Roche, Mannheim, Deutschland</i>
- anti-Kaninchen IgG (Ziege)	1:7500	#A-0545	HRP	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>
- anti-Maus IgG (Kaninchen)	1:7500	#A-9044	HRP	<i>Sigma-Aldrich</i>

3.1.7. Software

Produkt	Version	Hersteller
- Adobe Photoshop	Version D1-4.0	<i>Adobe</i>
- AIDA	Version 2.11.002	<i>Raytest</i>
- AxioVision Viewer	Version 3.0	<i>Zeiss</i>
- Corel PHOTO-PAINT	Version 9.0	<i>Corel Corporation</i>
- Glas LC 10	Version 1.20N	<i>Shimadzu</i>
- Image Pro Plus™	Version 2.0	<i>Media Cybernetics</i>
- LSM 510	Version 3.2 SP2	<i>Zeiss</i>
- Microcal™Origin™	Version 5.0	<i>Microcal</i>
- Scion Image für Windows	Version Beta 4.0.2	<i>Scion Coporation</i>
- SPSS für Windows	Version 10.0.5	<i>SPSS Inc.</i>
- Unicorn	Version 4.12	<i>Amersham Pharmacia</i>
- Zeiss LSM Image Browser	Version 3,1,0,99	<i>Zeiss</i>

3. Material und Methoden

3.2. Methoden

3.2.1. Kultivierung von *E.coli*

Die *E. coli*- Stämme Top10F' und BL21(DE3)pLysS wurden von der Arbeitsgruppe in Form einer Glycerinkultur zur Verfügung gestellt und auf einer LB-Agarplatte ohne bzw. mit 35µg/ml Chloramphenicol ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die Experimente wurden Flüssigkulturen verwendet, die mit Einzelkolonien von der Platte beimpft wurden. Die Kultivierung von *E. coli* in Flüssigmedium erfolgte in LB-Medium ohne bzw. mit Antibiotikum unter Schütteln bei 37°C über Nacht. Transformierte Top10F' und BL21(DE3)pLysS Zellen wurden in LB unter Zusatz der in Tabelle 3 angegebenen Antibiotika kultiviert.

Um Glycerinkulturen anzulegen, wurde eine 3ml *E.coli* LB-Flüssigkultur ü.N. unter Schütteln kultiviert. Am nächsten Tag wurden ca. 850µl dieser Kultur in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, mit 150µl Glycerin versetzt, gut gemischt und bei -80°C gelagert.

Tabelle 3
Kultivierung transformierter E.coli- Stämme

Stamm	transformiertes Plasmid	Antibiotikum
Top10F'	pcDNA3; peXV3; pNRTIS21, pSG5 pEGFP; pDsRed1-C1	75µg/ml Ampicillin 25µg/ml Kanamycin
BL21(DE3)pLysS	pRSET B	75µg/ml Ampicillin + 35µg/ml Chloramphenicol

3.2.2. Kultivierung und Manipulation von Säugerzellen

Die verwendeten Säugerzellen Cos-7, NIH3T3, NIH-TM wurden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 oder 75cm²; 6 Loch- oder 24-Lochplatten (*Greiner, Frickenhausen, Deutschland*) in Kompletmedium kultiviert. Die Inkubation erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank für Zell- und Gewebekulturen (BBD 6220; *Haereus, Hanau, Deutschland*) bei 37°C, 5% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchte.

3.2.2.1. Passagieren von Säugerzellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 oder 75cm² bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert. Um die Zellen zu passagieren, wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 1,5ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,65%/0,02% (w/v) in PBS; *Biochrom AG*) gewaschen und anschließend in 1ml bzw. 1,5ml frischer Lösung 5min im Brutschrank trypsinisiert. Danach wurden die abgelösten Zellen in 4ml Kompletmedium aufgenommen und 1:10 verdünnt in eine neue 25 bzw. 75cm²-Kulturflasche mit ca. 5ml bzw. 10ml Kompletmedium überführt.

3. Material und Methoden

3.2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Für die längerfristige Lagerung wurden die Säugerzellen in flüssigen Stickstoff eingefroren und darin gelagert. Dazu wurden annähernd 90% konfluente Säugerzellen einer 75cm²-Kulturflasche zunächst trypsinisiert (s. Abschnitt 3.2.2.1.). Die Zellen wurden dann in 7ml Komplettmedium resuspendiert. Das nach Zentrifugation für 5min, 110rcf, RT erhaltene Zellpellet wurde in 5ml Komplettmedium mit 10% DMSO resuspendiert. Ca. 1,5ml dieser Suspension wurden in Schraubdeckelröhrchen (*Greiner*) überführt und zunächst für 2-3d bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die im Stickstoff gelagerten Schraubdeckelröhrchen bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden dann in ein 15ml-Plastikröhrchen (*Greiner*) mit 6ml Komplettmedium pipettiert und für 5min bei 110rcf, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in ca. 4ml frischem Komplettmedium resuspendiert und in eine neue 75cm²-Kulturflasche mit 6ml Komplettmedium transferiert.

3.2.2.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden zunächst wie unter Abschnitt 3.2.2.1. beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst und anschließend in 4ml Komplettmedium resuspendiert. 50µl dieser Zellsuspension wurde mit 50µl Trypanblau vermischt und auf einer Neubauer-Kammer (*Schott GmbH, Jena, Deutschland*) ausgebracht. Die 4 Großquadrate auf dieser Kammer wurden ausgezählt und der Durchschnitt daraus ermittelt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich durch Multiplikation des Durchschnittswertes mit 2 (durch 1:1 Verdünnung der Suspension mit Trypanblau) und 10⁴.

3.2.2.4. Transfektion von Säugerzellen mit kationischen Lipiden

Die Transfektion von Cos-7, NIH 3T3 bzw. NIH-TM wurde mit polykationischen Lipiden, die in liposomaler Form vorliegen, durchgeführt. Dabei wurde entweder mit dem Transfektionsreagenz Polyfect™ (*Qiagen*) oder Metafectene™ (*Biontex, München, Deutschland*) gearbeitet. Für die Transfektionen wurden regelmäßig passagierte Säugerzellen verwendet, die in 6-Loch- oder 24-Lochplatten eingesät wurden und die Wachstumsfläche vor der Transfektion zu ca. 80-90% bedeckten. Die FACS-Analyse eGFP-exprimierender Cos-7 Zellen ergab bei Verwendung von Polyfect™ eine Transfektionseffizienz von ca. 20-50%. Die Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 5) ergab eine vergleichbare Effizienz für NIH-Zellen und bei Verwendung von Metafectene™.

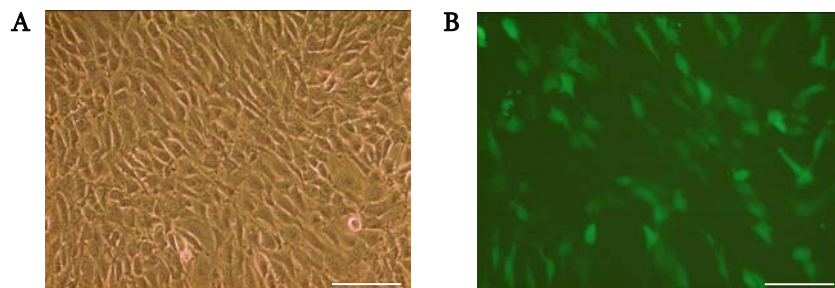


Abb. 5. **Mikroskopie eGFP exprimierender NIH 3T3 Zellen.** Durchlicht (A) und Fluoreszenzmikroskopie (B) desselben Ausschnittes Polyfect™ transfizierter Zellen bei 100x Vergrößerung 24h nach Transfektion. Balken: 100µm

3. Material und Methoden

- ***Transfektion von Säugerzellen mit Polyfect™***

Die Transfektion der Zellen wurde mit dem Polyfect™-Reagenz entsprechend der mitgelieferten Anleitung für 6-Loch-Platten durchgeführt. Der Ablauf sei hier in Kürze wiedergegeben: die Zellen wurden in 6-Loch-Platten kultiviert und pro Vertiefung der Platte wurden 2-3µg DNA in 100µl DMEM gegeben. Dazu wurde Polyfect™ im Verhältnis 5:1 zur DNA-Menge direkt zum Ansatz pipettiert (10 bzw. 15µl), dieser gut gemischt und 8min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit DMEM gewaschen und danach mit 1,5ml Komplettmedium pro Loch überschichtet. Nach Zugabe von 600µl Komplettmedium zum Transfektionsansatz, wurde dieser dann auf die Zellen übertragen. Die 6-Loch-Platte(n) wurde anschließend ü.N. im Brutschrank inkubiert.

- ***Transfektion von Säugerzellen mit Metafectene™***

Pro Ansatz wurden 2-3µg DNA eingesetzt, die zunächst in 50µl DMEM aufgenommen wurden. Metafectene™ wurde separat im Verhältnis 2:1 zur DNA-Menge in DMEM (50µl Gesamtvolumen) verdünnt. Die beiden Ansätze mit dem Transfektionsreagenz und der DNA wurden vereinigt, gut gemischt und 20min bei RT inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten analog wie für die Transfektion mit Polyfect™ beschrieben.

3.2.2.5. Nachweis des Zellkerns

Puffer und Reagenzien:

- 5xPBS (pH 7,5): 500mM NaCl; 100mM NaH₂PO₄; 400mM Na₂HPO₄

Cos-7 Zellen wurden auf kleinen Glasplättchen kultiviert und 24h nach Transfektion ü.N. starviert. Tags darauf wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen vorsichtig 2x mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Einlegen in 3,7%-iges Formaldehyd für 10min fixiert und danach erneut dreimal mit 1xPBS gewaschen. Um den Zellkern nachzuweisen, wurden die Zellen mit TP-PRO®-3-iodid (*Molecular Probes, Oregon, USA*) gefärbt, das dsDNA, ssDNA aber auch RNA bindet. Die Plättchen wurden in eine 1:500 verdünnte TP-PRO®-3-iodid Lösung eingelegt, 15min in einer Feuchtkammer inkubiert und dann wieder 2x mit 1xPBS gewaschen. Danach wurden die Glasplättchen auf einem Objektträger mit Vectashield® Mounting Medium (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*) aufgebracht, mit Lack abgedichtet und getrocknet. anschließend wurden die Zellen unter dem Konfokalmikroskop (Abschnitt 3.2.9.1.) analysiert.

3.2.2.6. Stimulation von Säugerzellen mit Mitogenen

Säugerzellen wurden vor Stimulation starviert, d.h. das vorhandene Komplettmedium wurde abgesaugt und durch serumfreies Medium, DMEM mit 1% Gentamycin, ersetzt. Danach wurden die Zellen abhängig vom Versuch für ca. 7h-24h unter diesen Bedingungen im Brutschrank kultiviert und anschließend mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor/ Mitogen (siehe Tabelle 4) stimuliert.

3. Material und Methoden

Tabelle 4
Mitogene und Wachstumsfaktoren zur Stimulation von Säugerzellen

Faktor	Quelle	Stammkonzentration	Endkonzentration im Ansatz
EGF	<i>Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA</i>	100mg/ml	50µg/ml
TPA	<i>ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH, USA</i>	1mM	100nM
NGF	<i>Upstate® Biotechnology, Lake Placid, NY, USA</i>	25µg/ml	25ng/ml

3.2.2.7. Präparation von Lysaten aus Säugerzellen

Puffer und Reagenzien:

- Lysepuffer: 25mM HEPES pH 7,5; 25 mM Tris/HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 10mM EDTA; 0,1% Tween 20; 0,5% NP-40; 10mM β -Glycerophosphat; 1mM Na_3VO_4 ; 10µg/ml Leupeptin; 10 µg/ml Aprotinin; 1mM PMSF; 1 Tablette Roche Proteaseinhibitor pro 50 ml

Cos-7 oder NIH Zellen wurden in 6-well-Platten kultiviert und vor der Lyse auf Eis gestellt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem 1xPBS wurden sofort je 90µl Lysepuffer in die einzelnen Vertiefungen pipettiert. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße wurden 5-mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Dieser Schritt unterstützt den Zellaufschluß. Danach erfolgte durch Zentrifugation bei 20800rcf, 4°C für 30min die Abtrennung der im Lysepuffer gelösten Proteinen von den Membranbestandteilen. Aus dem nach Zentrifugation erhaltenen Überstand wurde dann die Proteinkonzentration bestimmt (s. Abschnitt 3.2.5.). Die Lysate wurden dann entweder direkt für weitere Arbeiten verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.3. Zentrifugation

Die Zentrifugation von 1,5ml-Reaktionsgefäßen (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*) erfolgte in der Zentrifuge 5417R (*Eppendorf, Engelsdorf, Deutschland*) oder Biofuge pico (*Heraeus, zu Kendro, Osterode, Deutschland*). Lösungen in 15ml- oder 50ml-Plasteröhrchen (*Greiner*) wurden in der Megafuge 1.0R; (*Heraeus*) zentrifugiert.

3. Material und Methoden

3.2.4. Gelelektrophorese

- *Agarose-Gelelektrophorese*

Puffer und Reagenzien:

- 1xTAE-Puffer; pH 8,0: 40mM Tris/HCl; 20mM Na-acetat; 2mM EDTA
- 6xProbenpuffer: 0,09% Bromphenolblau; 0,09% Xylencyanol; 60% Glycerol; 60mM EDTA

Für die gelelektrophoretische Analyse von DNA-Fragmenten wurde mit 1%- oder 2%-igen Agarosegelen gearbeitet. Die Agarose wurde eingewogen, entsprechend 1xTAE-Puffer zugegeben und die Agarose durch Erhitzen vollständig gelöst. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 10µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer gegossen, in die ein Gelkamm zum Formen der Auftragstaschen eingesetzt worden war. Nach dem Aushärten des Gels wurde der Kamm entfernt, und das Gel in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophorese-Kammer eingelegt. In die Auftragstaschen wurde die in aq. dest. und 6xProbenpuffer gelöste DNA (4- 10µl) pipettiert. Neben den zu analysierenden DNA-Proben wurde auf das Gel die GeneRuler™ 100bp-oder 1kb DNA-Leiter (*MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland*) als Größenstandard aufgetragen. Die Trennung der Fragmente wurde bei 80-90V durchgeführt. Die Gele wurden unter UV-Licht analysiert und fotografiert (*ImageMaster®VDS; Amersham Pharmacia*).

- *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)*

Puffer und Reagenzien:

- Rotiphorese Gel 30 30%-ige Acrylamid/ Bisacrylamidlösung (37,5:1)
- Trenngelpuffer: 2M Tris/ HCl pH 8,8
- Sammelgelpuffer: 0,5M Tris/ HCl pH 6,8

- 15%-iges Trenngel (10ml): 3,1ml aq. dest.; 1,9ml Trenngelpuffer; 5ml Rotiphorese Gel 30; 100µl 10% SDS; 40µl 20% Ammoniumpersulfat (APS; *Sigma*); 8µl N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED; *Merck, Darmstadt, Deutschland*)

- 4%-iges Sammelgel (5ml): 3,1ml aq. dest.; 1,25ml Sammelgelpuffer; 660µl Rotiphorese Gel 30; 50µl 10% SDS; 30µl 20% APS; 4µl TEMED

- 5xSDS-Probenpuffer: 0,02% Bromphenolblau; 5mM EDTA; 50% Glycerol; 20% SDS; 500mM Tris/HCl pH 6,8; 25% β-Mercaptoethanol

- 10xLaemmli-Puffer : 250mM Tris; 2M Glycin; 35mM SDS

- Coomassie-Färbelösung: 0,1% Coomassie-Blau R250ad; 40% Methanol; 10% Essigsäure
- Entfärbelösung: 40% Methanol; 10% Essigsäure

Zunächst wurde in der Gelapparatur Mini-Protean 3 (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland*) ein 1mm dickes, 15%-iges Trenngel gegossen. Dieses wurde nach dem Aushärten mit einem 4%-igen Sammelgel überschichtet, in welches der Gelkamm zur Ausformung der Auftragstaschen eingesetzt wurde. Die Proteinproben sowie die Standard-Markerproteine (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; *MBI Fermentas*) in 5xSDS-Probenpuffer wurden 10min auf 95°C erhitzt, anschließend auf das Gel aufgetragen und entsprechend ihrem Molekulargewicht darin getrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel entweder für einen Western-Blot verwendet oder ca. 20min in Coomassie-Lösung gefärbt. Die Lösung wurde im

3. Material und Methoden

Anschluss gegen Entfärberlösung ausgetauscht und das Gel entfärbt bis die einzelnen Proteinbanden gut sichtbar wurden.

3.2.5. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der von Bradford etablierten Methode durchgeführt (Bradford, 1976). Zunächst wurde eine Eichkurve mit 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0mg/ml γ -Globulin oder BSA aufgenommen. Hierfür wurde 1ml Bradford-Lösung (*Sigma, Deisenhofen, Deutschland*) 1:5 in aq. dest verdünnt und in einer 1cm Küvette vorgelegt. Dazu wurden 2 μ l der jeweiligen Verdünnung des Standards oder der zu untersuchenden Proteinprobe pipettiert, das Gemisch gut geschüttelt und 5min bei RT inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte im Biospec-1601E (*Shimadzu, Duisburg, Deutschland*) bei $\lambda=595\text{nm}$ und wurde automatisiert in mg/ml ausgegeben.

3.2.6. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die DNA- oder RNA-Proben wurden zunächst 1:50 oder 1:100 mit aq. dest. verdünnt, in eine Glasküvette überführt und bei $\lambda=260\text{nm}$ mit dem GeneQuant II (*Pharmacia Biotech, Cambridge, England*) vermessen. Die Konzentration wurde in $\mu\text{g/ml}$ ausgegeben.

3.2.7. Klonierung von MSOR- und Ras-Konstrukten

3.2.7.1. Amplifikation von RBD und Ras cDNA mittels PCR

Puffer und Reagenzien:

- 10x PCR-Puffer: 200mM Tris/ HCl pH 8,8; 100mM KCl; 100mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 20mM MgSO_4 ; 1,0% Triton[®] X-100; 1mg/ml Nuklease-freies BSA

Für die PCR- Reaktionen wurden in ein Reaktionsgefäß ca. 100ng Plasmid-DNA (*RBD, ras/rap*), 100pmol Primer_fwd, 100pmol Primer_rev (siehe Tabelle 3), 2 μ l dNTP 's (jedes dNTP 10mM: *Amersham Pharmacia*), 10 μ l 10x PCR-Puffer mit MgSO_4 (*Promega*), sowie 2U Pfu-Polymerase (*Promega*) pipettiert und mit aq. dest. auf 100 μ l aufgefüllt. Die zyklische Amplifikation der Fragmente erfolgte im PCR-Gerät PTC-100[™] (*MJ Research, Inc., Watertown, MS, USA*):

- (1) Proben 5 min bei 95°C denaturieren
- (2) 30 s bei 95°C denaturieren
- (3) 30 s Anlagern der Primer (Tabelle 5)
- (4) 1 min 72°C- Elongation
- (5) 5 min 72°C- Elongation

Dabei wurden die Schritte 2-4 40x durchlaufen.

Nach Abschluss der PCR wurden 7 μ l der Reaktion in einem 1%-igen Agarosegel getrennt. Danach wurde die DNA gereinigt und gefällt (s. Abschnitt 3.2.7.2.).

Tabelle 5
Bedingungen für die Amplifikation von RBD und Ras cDNA

Produkt der Amplifikation	Primerpaar (Sequenzen siehe Abschnitt 3.1.4.1. und 3.1.4.2.)	Temperatur zur Anlagerung der Primer
<i>RBD-1</i>	RBD1_fwd; RBD1_rev	58°C
<i>RBD-2</i>	RBD2_fwd; RBD2_rev	59°C
<i>RBD-3</i>	RBD3_fwd; RBD3_rev	57°C
<i>H-ras</i>	H-Ras_fwd; H-Ras_rev	55°C
<i>K-ras</i>	K-Ras_fwd; K-Ras_rev	45°C
<i>M-ras</i>	M-Ras_fwd; M-Ras_rev	55°C
<i>TC21</i>	TC21_fwd; TC21_rev	55°C

3.2.7.2. Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Plasmiden

Nachfolgend werden eine Reihe von Methoden beschrieben, nach denen saubere DNA für weitere Arbeiten benötigt wurde. Das heißt, dass aus den Ansätzen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Alkohol-Fällung Proteine und/oder Salze entfernt werden mussten, die sonst nachfolgende Reaktionen beeinträchtigen.

Zunächst wurde zu der in aq. dest. oder in Puffer gelösten DNA 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1, v/v) pipettiert. Die zwei Phasen wurden durch Schütteln vermischt und durch Zentrifugation (20800rcf, 5 min) wieder getrennt. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform versetzt. Dieser Ansatz wurde wiederum gut gemischt und 5min bei 20800rcf zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5ml-Gefäß gefüllt. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Na-acetat pH 7,0 bei linearisierter doppelsträngiger DNA bzw. pH 5,2 bei Plasmid-DNA und 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Nach der Zentrifugation für 20min bei 20800rcf und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Im Anschluss an einen Zentrifugationsschritt (20800rcf, 10min, 4°C) wurde der Überstand entfernt und das Pellet getrocknet. Das trockene Pellet wurde in aq. dest. resuspendiert. Davon abweichende Versuchsabläufe sind in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt.

3.2.7.3. Isolation von DNA aus Agarosegelen

Die Isolation der DNA aus Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von *Qiagen* (*Hilden, Deutschland*) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit diesem Kit ist eine schnelle und quantitative Isolierung von bis zu 10kbp großen DNA-Fragmenten möglich.

3. Material und Methoden

3.2.7.4. Restriktion von DNA

Puffer und Reagenzien:

- BamHI-Puffer: 10mM Tris/HCl pH 8,0; 5mM MgCl₂; 100mM KCl; 0,02% Triton X-100; 0,1mg/ml BSA
- Puffer O⁺: 50mM Tris/HCl pH 7,5; 10mM MgCl₂; 100mM NaCl; 0,1mg/ml BSA
- Puffer R⁺: 10mM Tris/HCl pH 8,5; 10mM MgCl₂; 100mM KCl; 0,1mg/ml BSA
- Puffer Y⁺/TangoTM: 33mM Tris/Acetat, pH 7,9; 10mM Mg-acetat; 66mM K-acetat; 0,1mg/ml BSA

Die Restriktionsspaltungen erfolgten prinzipiell immer gleich, Abweichungen traten aufgrund unterschiedlicher DNA-Mengen auf. In Tabelle 6 sind die verwendeten Restriktasen zusammengestellt.

Tabelle 6
Restriktasen und Puffer

Enzym	Aktivität (U/μl)	Puffer	Firma
<i>Bam</i> HI	10	<i>Bam</i> HI	<i>MBI Fermentas</i>
<i>Dpn</i> I	10	Puffer Y ⁺ /Tango TM	<i>MBI Fermentas</i>
<i>Eco</i> RI	10	Puffer R ⁺	<i>MBI Fermentas</i>
<i>Hind</i> III	10	Puffer R ⁺	<i>MBI Fermentas</i>
<i>Nco</i> I	10	Puffer Y ⁺ /Tango ^{TM+}	<i>MBI Fermentas</i>
<i>Pst</i> I	10	Puffer O ⁺	<i>MBI Fermentas</i>
<i>Sa</i> I	10	Puffer O ⁺	<i>MBI Fermentas</i>
<i>Xho</i> I	10	Puffer R ⁺	<i>MBI Fermentas</i>

An dieser Stelle wird beispielhaft die Zusammensetzung eines 20 μl Restriktionsansatzes beschrieben. In ein 1,5ml-Reaktionsgefäß wurden etwa 100ng- 2μg DNA, 2μl des entsprechenden 10x Restriktionspuffers und 1U Restriktase pipettiert. Dieser Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 20μl aufgefüllt und 1h bei 37°C inkubiert. Bei Spaltungen mit zwei Restriktasen, die unterschiedliche Puffer benötigen, wurde die DNA nach der ersten Restriktion, wie unter Abschnitt 3.2.7.2. beschrieben, gereinigt und in 17μl aq. dest. gelöst. Zu diesem Ansatz wurden 2μl 10xRestriktionspuffer und 1μl des zweiten Enzyms pipettiert und wiederum für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2-10μl aus der (Doppel)spaltung gelelektrophoretisch getrennt. Die Fragmentgrößen der Spaltprodukte wurden anhand des mitgeführten Größenstandards bestimmt.

3.2.7.5. Dephosphorylierung von Plasmiden

Puffer und Reagenzien:

- 10xReaktionspuffer: 100mM Tris/HCl pH 7,5; 100mM MgCl₂

Um bei der Klonierung die Zahl der Plasmide mit erfolgreich integrierten Zielfragment zu erhöhen, wurde der gespaltene Vektor vor der Ligation dephosphoryliert. Dadurch werden die freien Phosphatreste abgespalten und so die Religation des Vektors verhindert.

Für die Reaktion wurden in einem 50μl Ansatz ca. 100ng- 1μg Vektor, 5μl 10xReaktionspuffer, 1U *cal*f *intestine alkaline phosphatase* (CIAP; *MBI Fermentas*) in aq. dest. gemischt und 45min bei 37°C inkubiert. Durch Phenol/Chloroform-Fällung (s. Abschnitt 3.2.7.2.) wurde die Phosphatase inaktiviert und aus dem

3. Material und Methoden

Ansatz entfernt. Das nach Fällung mit Isopropanol erhaltene Pellet des dephosphorylierten Vektors wurde in 30µl aq.dest. resuspendiert und für die Ligation eingesetzt.

3.2.7.6. Ligation

Puffer und Reagenzien:

- 10xLigationspuffer (pH 7,8): 400mM Tris/HCl; 100mM MgCl₂; 100mM DTT; 5mM ATP

In ein 1,5ml-Reaktionsgefäß wurden linearisierte Vektor-DNA und entsprechend gespaltene DNA des zu klonierenden Fragmentes im Verhältnis 1:10 sowie 2µl 10xLigationspuffer (*MBI Fermentas*) und 2U T4-Ligase (*MBI Fermentas*) pipettiert. Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 20µl aufgefüllt, gemischt und über Nacht bei 14°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die DNA aufgereinigt (s. Abschnitt 3.2.7.2.), in 20 µl aq. dest. gelöst und für die Transformation eingesetzt.

3.2.7.7. Transformation von Plasmiden in *E.coli*

Kompetente *E.coli* Zellen wurden wie folgt hergestellt: in einem Rundkolben wurden 100ml LB-Medium mit 500µl Zellen aus einer ÜNK oder Glycerinkultur beimpft. Dieser Ansatz wurde bis zu einer OD₅₉₅ von ca. 0,7 (UV-160A, *Shimadzu, Japan*) bei 37°C auf einem Schüttler bei 180Upm kultiviert. Die Kultur wurde danach im Eisbad abgekühlt und der Inhalt des Rundkolbens in 50ml-Plasterröhrchen überführt. Diese wurden bei 3992rcf für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 15ml kalter 0,1M CaCl₂-Lösung gewaschen und wiederholt, wie oben, zentrifugiert. Nach dem Resuspendieren des Pellets in 1,5ml kalter 0,1M CaCl₂-Lösung wurde 1/10 Volumen Glycerin zugegeben. Dieses Gemisch wurde in 200 µl Fraktionen aliquotiert, die in 1,5ml-Eppendorf-Gefäße überführt und für 1 h auf Eis inkubiert wurden. Die kompetenten Zellen wurden entweder bei -80°C gelagert oder direkt für die Transformation eingesetzt.

Für die Transformation wurden 15µl Ligationsansatz zu 200µl kompetenter Zellen pipettiert, gemischt und 30min auf Eis gelagert. Der Hitzeschock, der die Aufnahme der DNA in die Zellen ermöglicht, erfolgte durch Inkubation des Ansatzes für 1min bei 42°C. Anschließend wurden dazu sofort 800µl frisches LB-Medium zugegeben, und die Zellen für 45min bei 37°C kultiviert. Jeweils 50 µl bzw. 150 µl des Transformationsgemisches wurden auf Antibiotika-haltigem LB-Agar ausplattiert und bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.2.7.8. Präparation von Plasmiden aus *E.coli*

Puffer und Reagenzien:

- Lösung I: 50mM Glucose; 25mM Tris/HCl; pH 8,0; 10mM EDTA
- Lösung II: 0,2M NaOH; 1% SDS
- Lösung III: 3M K-acetat, pH 4,8

Für die Minipräparation von Plasmid-DNA wurde zunächst in ein Glasröhrchen 3 ml LB-Medium mit Antibiotika gefüllt und mit je einer Kolonie von den Agarplatten aus der Transformation beimpft. Die Inkubation dieser Röhrchen erfolgte ü.N. bei 37°C auf einem Schüttler. Die Isolation der Plasmid-DNA aus diesen Kulturen erfolgte nach der alkalischen Methode (Birnboim und Doly, 1979).

3. Material und Methoden

Um größere Mengen Plasmid-DNA herzustellen, wurden 50ml Antibiotika-haltiges LB-Medium in einem Rundkolben mit 100µl einer Vorkultur beimpft und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Die Plasmid-Präparation wurde dann mit dem Nucleobond® AX-Kit von *Machery Nagel (Düren, Deutschland)* und einer Nucleobond® AX100-Säule nach dem dafür angegebenen Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Um die Qualität einer Präparation zu prüfen, wurden 2-5µl der präparierten Plasmid-DNA mit 4µl 6x Stopperlösung und 11µl destilliertem Wasser gemischt und im Agarosegel aufgetrennt.

3.2.7.9. Sequenzierung

Puffer und Reagenzien:

- 10xTBE-Puffer: 890mM Tris; 890mM Borsäure; 20mM EDTA, pH 8,0
- Reagenz: dATP; dCTP; 7-deaza-GTP; dTTP; Formamid/EDTA; Formamid; Fuchsinhaltiger Auftragspuffer; 2-Mercaptoethanol; MgCl₂; Nonidet™ P-40; Thermostabile Pyrophosphatase; Thermo Sequenase DNA-Polymerase; Tris/HCl, pH 9.5; Tween™ 20
- Reagenz A: Reagenz mit ddATP
- Reagenz C: Reagenz mit ddCTP
- Reagenz G: Reagenz mit ddGTP
- Reagenz T: Reagenz mit ddTTP

Diese Sequenzierung erfolgt nach dem Primer-Zyklus-Sequenzierverfahren, dem das mit einer PCR kombinierte Prinzip nach Sanger *et al.* (1977) zugrunde liegt. Die PCR-Fragmente werden in einem 4%-igen PAA-Gel aufgetrennt und anhand des Infrarot-Farbstoff (IRD800) am 5'-Ende der Primer detektiert. Die Sequenzierung wurde in dieser Arbeit dafür verwendet, um die Sequenzen der in pRSET B, pEGFP-C2 oder pDsRed1-C1 klonierten Fragmente zu überprüfen.

Die Markierung der Proben für die Sequenzierung erfolgte mit dem *Thermo Sequenase™ fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK)*. Dazu wurde ein Ansatz mit 4µl Plasmid-DNA (ca. 2µg), 2µl Sequenzierprimer (2pmol/µl) und 11µl aq. dest. vorbereitet. Dieser Ansatz wurde auf vier 0,2ml-PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt, wobei in jedes Gefäß 4µl pipettiert wurden. Zu diesen 4µl wurden pro Ansatz je 2µl einer Reagenz A, C, G oder T hinzugegeben. Anschließend erfolgte die PCR:

- (1) Proben 5min bei 95°C denaturieren
- (2) 30s bei 95°C denaturieren
- (3) 30s bei 56°C-Anlagerung der Primer
- (4) 1min 70°C-Auffüllen der Einzelstränge mit den Nukleotiden.

Die Schritte 2, 3 und 4 wurden 30x durchgeführt. Nach Abschluss der Zyklen wurden in jedes Gefäß 3µl Auftragspuffer gegeben und ca. 1,5µl davon in einem 4%-igen PAA-Sequenziergel aufgetrennt.

Dem Auftrag der Proben ging das Einstellen des Sequenziergerätes (DNA Sequencer model 4000L, *MWG-Biotech*) voraus. Während des Gellaufes wurden die detektierten Signale auf einen Rechner übertragen. Mit entsprechender Software erfolgte die Auswertung der Daten am Computer. Die zusammengehörenden 4 Spuren (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) eines Ansatzes wurden markiert und im Zuge dessen erfolgte die Darstellung der Basenabfolge.

3.2.7.10. PCR-basierte Mutagenese von MSOR- und Ras-Konstrukten

Die angewandte *site directed mutagenesis* ist an die von Weiner *et al.* (1994) beschriebene Methode angelehnt. Dabei wird die Mutation in die DNA-Sequenz mit Hilfe von zwei komplementären Primern (Strang- und Gegenstrangprimer) eingeführt, bei denen das auszutauschende Nukleotid von mindestens drei

3. Material und Methoden

Triplets flankiert wird. Als DNA-Vorlage diente aus einem *dam*⁺ *E.coli* Stamm (Top10F') isolierte methylierte Plasmid-DNA (*R59A-1/pRSET*; *H-ras(G12V)/pDsRed1*; *H-ras(G12V,C181S,C184S)/pDsRed1*). Diese wurde in einem 50µl Ansatz mit je 100pmol Strang- und Gegenstrangprimer (Tabelle 5), 5µl DMSO, 5µl 10x PCR-Puffer mit MgSO₄ (*Promega*), 1µl dNTP's (jedes dNTP 10mM: *Amersham Pharmacia*), sowie 2U Pfu-Polymerase (*Promega*) und entsprechend aq. dest. vermischt. Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

- (1) Proben 5min bei 95°C denaturieren
- (2) 30s bei 95°C denaturieren
- (3) 1min bei 59°C-Anlagerung der Primer (Tabelle 7)
- (4) 11min bei 68°C

Die Schritte 2, 3 und 4 wurden 16x durchlaufen.

Unter diesen Reaktionsbedingungen wird das komplette Plasmid amplifiziert. Nach der PCR wurde direkt 1U *DpnI* zum 50µl PCR-Ansatz pipettiert und dieser 1h bei 37°C inkubiert. Dadurch wird spezifisch methylierte DNA, d.h. die Plasmid-DNA der Vorlage in viele kleine Fragmente geschnitten. Dadurch erhöht sich nach Transformation der Anteil an Klonen, die Plasmide mit der eingeführten Mutation tragen. Nach der Restriktion mit *DpnI* wurde die DNA mit Isopropanol gefällt, gewaschen und das Pellet nach dem Trocknen in 30µl aq. dest. resuspendiert. 5µl dieses Ansatzes wurden anschließend für die Transformation in *E.coli* Top10F' eingesetzt.

Tabelle 7
Primer für die Mutagenese-PCR

Eingeführte Mutation (Aminosäureaustausch)	Primerpaar (Sequenz siehe Abschnitt 3.1.4.3.)	Temperatur zur Anlagerung der Primer
N64D	N64D_fwd; N64D_rev	59°C
R67A	R67A_fwd; R67A_rev	55°C
T68A	T68A_fwd; T68A_rev	59°C
V12G	V12>WT_fwd; V12>WT_rev	57°C
D38A	D38A_fwd; D38A_rev	57°C

3.2.8. Charakterisierung der MSOR-Ras-Interaktion *in vitro*

Um die Funktionalität der hergestellten MSOR-Konstrukte zu testen, wurden sie zunächst rekombinant als His-Tag Fusionen hergestellt. Die Proteine wurden dann in verschiedenen Verfahren untersucht.

3.2.8.1. Expression von MSOR und H-Ras(G12V) Proteinen als His-Tag Fusionen

Puffer und Reagenzien:

- 5xPBS (pH 7,5): 500mM NaCl; 100mM NaH₂PO₄; 400mM Na₂HPO₄
- Lysepuffer: 5ml 1xPBS; 1% Triton X100; 5mM MgCl₂

Für die Proteinexpression der in pRSET B klonierten Konstrukte wurde der *E.coli* Stamm *BL21(DE3)pLysS* verwendet. Dieser Stamm enthält eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerasegens unter Kontrolle des IPTG induzierbaren *lacUV5*-Promotors. Die Induktion mit IPTG führt zu einer starken Expression der T7-RNA-Polymerase und folglich der T7-Promotor gesteuerten rekombinanten Proteine. Dieser

3. Material und Methoden

Bakterienstamm besitzt außerdem ein Plasmid, welches das T7-Lysozym kodiert. Dieses wird konstitutiv exprimiert und unterdrückt die Basalexpression der Zielgene durch Hemmung der T7-RNA-Polymerase.

Die *E.coli*-Zellen wurden nach Transformation der Konstrukte auf einer LB-Agarplatte mit 35µg/ml Chloramphenicol und 50µg/ml Ampicillin ausplattiert. Eine Einzelkolonie von dieser Platte wurde in 5ml LB-Medium mit Chloramphenicol und Ampicillin wie oben übertragen und diese Kultur ü.N. bei 37°C geschüttelt. Mit dieser ÜNK wurden dann 3x200ml antibiotikahaltiges LB-Medium beimpft und dieses wiederum ü.N. unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Bei einer OD₆₀₀= 0,7 erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 1mM IPTG. Vier Stunden nach Induktion wurden die Kulturen bei 6240rcf 10min 4°C (Megafuge 1.0R; *Heraeus*) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Lysepuffer resuspendiert.

3.2.8.2. Niedrig-Zelldichte-Fermentation

Da für die ITC (s. Abschnitt 3.2.8.5.) Proteinmengen in einem größeren Maßstab benötigt werden, wurden WT-1 und H-Ras(G12V) in Niedrig-Zelldichte Kulturen von *E.coli* RV380 durch Fermentation synthetisiert (Horn *et al.*, 1996).

3.2.8.3. Aufreinigung His-gekoppelter Proteine

Puffer und Reagenzien:

- Puffer A: 25mM Tris/HCl pH 7,5; 0,2M NaCl; 5mM MgCl₂
- Puffer B: Puffer A mit 500mM Imidazol

Das unter Abschnitt 3.2.8.1. beschriebene, in Lysepuffer resuspendierte Zellpellet wurde 3x in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad wieder aufgetaut. Dann wurden 200µl DNaseI (1mg/ml) hinzugegeben, sowie 300µM Mg-ATP und 150mM KCl, wodurch vorhandene Chaperonkomplexe mit den His-Proteinen aufgelöst werden sollen (Banecki und Zylicz1996; Liberek *et al.*, 1991). Der Aufschluß der Zellsuspension erfolgte durch Ultraschallbehandlung (5x30sec, Zyklus 30%; Sonoplus HD70, *Bandelin, Berlin, Deutschland*). Nach Zentrifugation bei 61740rcf, 30min, 4°C (Rotor 70.1 Ti; *Beckmann, München, Deutschland*) wurde der erhaltene Überstand, in dem auch die aufzureinigenden Proteine gelöst sind, sterilfiltriert (Porengröße 0,2µm; *Millipore, Eschborn, Deutschland*). Das Filtrat wurde danach mit einer Spritze aufgezogen und in die Auftragsschleife der FPLC-Anlage (Äkta Purifier; *Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland*) appliziert. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über eine Ni²⁺-NTA Säule (1ml HiTrap; *Amersham Pharmacia*) nach einem mit der Unicorn-Software (Version 4,12; *Amersham Pharmacia*) erstellten Programm. Die Ni²⁺-NTA Säule wurde zu Beginn mit 5ml Puffer A equilibriert und anschließend mit dem Zell-Lysat beladen. Danach wurde die Säule zunächst mit 40ml Puffer A und dann mit 20ml 4% Puffer B gewaschen. Während der graduellen Steigerung auf 40% Puffer B über 30ml wurden die Zielproteine (ab ca. 14% Puffer B) eluiert. Diese wurden über einen Fraktionssammler in 1ml Fraktionen gesammelt und bei 4°C gelagert. Die Säule wurde nach dem Fraktionieren mit 10ml 100% Puffer B gewaschen und mit ca. 30ml Puffer A für eine neue Aufreinigung reäquilibriert. Über die Darstellung der UV-Absorption bei 260nm mit der Unicorn-Software konnte die Probenaufreinigung direkt verfolgt werden (siehe Abb. 9A). Die Analyse der gesammelten Proteinfractionen erfolgte durch Auftrennung von 20µl Probe in einem 15%-igen Polyacrylamidgel (siehe Abb. 9B). Nach Coomassie-Färbung des Gels konnten die Fraktionen ausgewählt werden, die einen hohen Gehalt an Zielprotein (mindestens 80%) aber kaum andere Proteine- nur sehr schwache zusätzliche Banden im PAA-Gel aufwiesen. Diese Fraktionen wurden vereinigt (ca. 10ml) und in Filtrationsröhrchen (Ultrafree[®]-15 centrifugal filter device, Biomax- 5K [bzw. 10K Ausschlußgröße] NMWL membrane; *Millipore*) durch Zentrifugation bei 2500rcf, 4°C (Megafuge 1.0R; *Heraeus*) auf ca. 1-3ml eingengt. Die Konzentrate wurden anschließend gegen Puffer A über Nacht dialysiert (Spectra/ Por[®] 6 dialysis tubing; 6,4mm; MWCO 6000-8000, *Serva; Heidelberg, Deutschland*).

3. Material und Methoden

Danach wurden die Proben aliquotiert und zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80°C gelagert.

3.2.8.4. Ras/GAP-Assay

Das Prinzip dieses Versuches ist in Abb. 6 schematisch dargestellt und beschrieben.

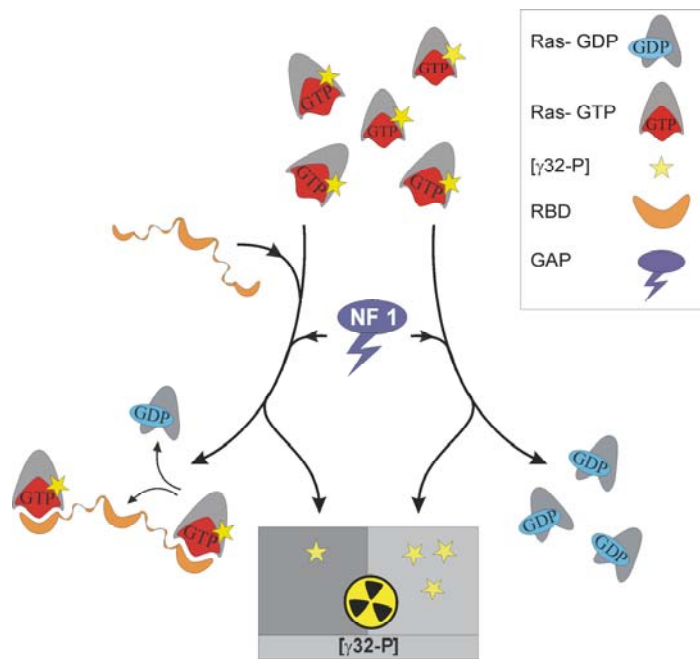


Abb. 6. **Schema der Ras/GAP-Assay.** Zunächst wird Ras mit radioaktiv-markiertem GTP, $[\gamma^{32}\text{-P}]\text{GTP}$, beladen. Anschließend wird dieser Beladungsansatz aufgeteilt. Während ein Teil unbehandelt als Kontrolle dient, wird zum anderen ein MSOR Konstrukt (orange) gegeben. Nach Einstellen des Gleichgewichtes wird die Hydrolyse des Ras gebundenen, radioaktiv-markierten GTP durch Zugabe eines GAP (NF-1) beschleunigt. Die Umsetzung des GTP erfolgt im Kontrollansatz sehr schnell, was durch Messung des freigesetzten radioaktiv-markierten $^{32}\text{P}_i$ verfolgt werden kann. Im anderen Ansatz konkurriert das MSOR Konstrukt mit NF-1 um den Zutritt an Ras-GTP.

Puffer und Reagenzien:

- Bindungspuffer: 25mM Tris/HCl pH 7,5; 30mM NaCl; 5mM EDTA; 0,1% Triton X100; 2mg/ml BSA
- 2xGAP-Puffer: 50mM Tris/HCl pH 7,5; 10mM MgCl₂; 2mM DTT; 0,2% Triton X100; 2mg/ml BSA

Für ein Experiment wurden zunächst vier 1,5ml Reaktionsgefäße vorbereitet. In eines wurden 10 μl 1xPBS (Kontrolle) vorgelegt, in die anderen drei jeweils 10 μl der zu untersuchenden His-fusionierten MSOR (wie bei den einzelnen Versuchen angezeigt 300nM RBD-1 und/ oder 150nM RBD-2 und/oder 100nM RBD-3). Die Beladung von rekombinant hergestelltem K-Ras mit $[\gamma^{32}\text{-P}]\text{GTP}$ wurde wie folgt durchgeführt: 2 μg K-Ras wurden in 20 μl Bindungspuffer gemischt, wobei das gebundene Nukleotid freigesetzt wird. Nach Zugabe von 2 μl $[\gamma^{32}\text{-P}]\text{GTP}$ (20 μCi ; Hartmann Analytik, Braunschweig, Deutschland) wurde der Ansatz 5min bei 37°C inkubiert und dann auf Eis gestellt (Assoziation des markierten Nukleotids an Ras). Anschließend wurden nacheinander 1 μl 1M MgCl₂; 940 μl 1xGAP-Puffer und 4 μl 100mM GTP zugegeben und der Ansatz gut gemischt. Dieses Gemisch wurde auf die vier 1,5ml-Gefäße aufgeteilt (215 μl pro Ansatz). Die Gefäße wurden erst für 10min auf Eis, dann 2min bei 30°C inkubiert, um den Reaktionsansatz auf 30°C zu equilibrieren. Danach wurde 1,8 μM GST-NF-1 (katalytische Domäne des RasGAP NF-1, AS 1172-1538, als GST-Fusion) zu jedem Ansatz gegeben und diese weiter bei 30°C temperiert. Nach 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 und 12min wurden jeweils 20 μl Probe aus den Ansätzen entnommen und in 480 μl eiskalte 5% Aktivkohle in 7M H₃PO₄ (pH2,5) überführt, wodurch die GAP katalysierte GTP-Hydrolyse gestoppt wird. Danach wurden alle Anätze gut gemischt, 15min auf Eis inkubiert und bei 20800rcf, 15min und 4°C (Eppendorf) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 200 μl Überstand- der freigesetztes $^{32}\text{P}_i$ enthält- aus jedem Gefäß in Szintillationsröhrchen (Zinsser Analytik, Frankfurt/M, Deutschland) überführt und die Intensität der Strahlung jeder Probe nach der Cerenkov Methode gemessen (TriCarb 1600TR Liquid scintillation

analyzer; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland). Die ermittelten *counts per min* (cpm)-Werte entsprechen der durch NF-1 hydrolysierten Menge GTP und wurden in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen.

3.2.8.5. Isotherme Titrationskalorimetrie

- *Das Prinzip der ITC*

Mit Hilfe der ITC lassen sich intra- und intermolekulare Wechselwirkungen von nativen, unmodifizierten Makromolekülen, wie z.B. Proteinen im wässrigen Milieu thermodynamisch charakterisieren. Somit lässt sich der individuelle Beitrag einzelner thermodynamischer Parameter (H , S und K_A) zur Bindung zweier Liganden bestimmen. An dieser Stelle wird die ITC nur kurz vorgestellt. Detailliertere Ausführungen zur Anwendung dieser Methode und zur Funktionsweise des Kalorimeters sind bei Holdgate (2001), Ladbury und Chowdhry (1996) sowie Chellani (1999) zusammengefasst.

Mit einer Messung wird die bei einer Interaktion zwischen zwei Proteinen freigesetzte oder absorbierte Wärme Q ermittelt, woraus die Änderung der Reaktionsenthalpie ΔH , die Bindungskonstante $K_A (=1/K_D)$ zwischen beiden Reaktionspartnern und die Stöchiometrie N der Bindung abgeleitet werden kann. Die ITC ist eine Methode, mit der ΔH direkt bestimmt wird und erfasst die Gesamtheit der Enthalpieänderungen der molekularen Interaktion.

Das Kalorimeter besteht im Wesentlichen aus einer wärmeisolierten Referenzzelle, die mit dem Lösungsmittel der zu untersuchenden Probe vollständig befüllt wird und einer baugleichen Messzelle, welche die Lösung oder Suspension des einen Bindungspartners (primärer Ligand) enthält. Beide Zellen fassen ein Volumen von 1.4477 ml. Der zweite Bindungspartner (sekundärer Ligand) wird in eine Mikroliterspritze aufgezogen. Diese wird in die Messzelle eingesetzt und appliziert über ein abgeflachtes, paddelförmiges Nadelende, welches durch Rotation eine gleichmäßige Durchmischung der Lösung garantiert, schrittweise definierte Volumina des sekundären Liganden. Das Kalorimeter arbeitet nach dem Prinzip der sogenannten Wärmekompensation: durch eine exo- oder endotherm verlaufende Reaktion beider Liganden in der Messzelle wird Wärme freigesetzt bzw. absorbiert, was zu einer Temperaturdifferenz zwischen Mess- und Referenzzelle führt. Das aufgezeichnete, typisch peakförmige Signal ergibt sich dabei aus der Energiezu- oder abfuhr pro Zeit ($\mu\text{cal}/\text{sec}$), die notwendig ist, um diese Temperaturdifferenz zu kompensieren ($\Delta T=0$).

Die Proteinkonzentrationen von Ras und RBD für eine Messung wurden so gewählt, dass sie im Bereich des K_D -Wertes der RBD/Ras Komplexes liegen. Zu Beginn der Messung ist die abgegebene Wärmemenge am größten (exotherme Peaks, Abb 7A). Die Wärmemengen werden durch die Anzahl der gebildeten Komplexe bestimmt, da alle injizierten Moleküle eine Bindung mit dem im Überschuss vorliegenden Bindungspartner in der Messzelle ausbilden können. Die weitere Zugabe des sekundären Liganden führt zu immer kleiner werdenden freigesetzten Wärmen, ersichtlich an der abnehmenden Peakhöhe im Verlauf einer Messung, da die Zahl freier Bindungsstellen sukzessive abnimmt. Sind alle vorhandenen Bindungsstellen abgesättigt, ändert sich die Größe der Peaks, die nun ausschließlich durch Mischungs- und Verdünnungseffekte infolge weiterer Zugabe des Titranden in die Zelle entstehen, nicht mehr (Hintergrund).

Die Standard-Reaktionsenthalpie H° (kcal) einer Injektion entspricht der Fläche unter jedem Titrationspeak im aufgezeichneten Rohdatensatz und ergibt sich durch Integration der Kompensationsleistung P ($\mu\text{cal}/\text{s}$) über die Zeit t (s). Die Enthalpie bezogen auf die zugegebene Stoffmenge des sekundären Liganden ergibt die normierte Standard-Bildungsenthalpie H° (kcal/mol). Diese wird für jede Injektion berechnet und gegen das molare Verhältnis der Bindungspartner (sekundärer/ primärer Ligand) aufgetragen. Die daraus resultierende Titrationskurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf und wird als Isotherme bezeichnet (Abb. 7B). Je steiler die Isotherme verläuft, desto größer ist die Bindungskonstante K_A zwischen den beiden Reaktionspartnern. Die Änderung der Standard-Bildungsenthalpie ΔH° einer Messung entspricht hierbei der Isothermenhöhe. Diese wurde korrigiert durch den Abzug der Verdünnungs- und Mischenthalpien (Hintergrund) und ist unabhängig von der Konzentration des primären Liganden. Die Bindungskonstante K_A kann aus dem Anstieg der Isothermen und N aus dem molaren Verhältnis der Bindungspartner am

3. Material und Methoden

Äquivalenz- bzw. Wendepunkt der Isothermen abgeleitet werden. Die Änderung der Standard-Entropie ΔS° ergibt sich durch Umstellen der Gibbs-Helmholtz Gleichung $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$, wobei die Änderung der Freien Standard-Bildungsenthalpie ΔG° über die Beziehung $\Delta G^\circ = -RT \ln K_A$ ($\Delta G^\circ = 0$ im Gleichgewicht) berechnet wird.

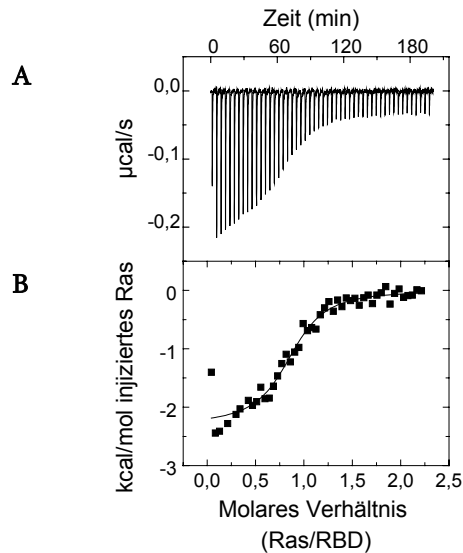


Abb. 7. ITC von WT-1 und Ras. In der Messzelle des Kalorimeters wird die RBD vorgelegt und Ras über eine Spritze zutitriert. Nach einer Injektion führt die Interaktion zwischen Ras und RBD zur Freisetzung von Wärme, was als peakförmiges Signal aufgezeichnet wird. Die weitere schrittweise Zugabe von Ras führt zur sukzessiven Absättigung freier RBD-Bindungsstellen und Abnahme der Peakhöhe. Die Aufzeichnung der Peaks bis hin zur Sättigung ergibt den Rohdatensatz (A). Daraus lässt sich die sigmoidal verlaufende Reaktionsisotherme (B) ableiten (Quadrate), aus der anhand einer Anpassungskurve (durchgehende Kurve) ΔH° , K_A und N bestimmt werden. Weitere Details sind im Text beschrieben.

- **Beladung von H-Ras(G12V) mit GTP**

Puffer und Reagenzien:

- Beladungspuffer: 25mM Tris/HCl pH 7,5; 0,2M NaCl; 10mM EDTA; 10mM GTP
- Puffer A: 25mM Tris/HCl pH 7,5; 0,2M NaCl; 5mM MgCl₂

In Vorbereitung für die ITC-Messung wurden die zu untersuchenden Proteine (H-Ras(G12V), MSOR) wie beschrieben in *E. coli* als His-tag Proteine exprimiert und anschließend über eine Ni²⁺-NTA Säule aufgereinigt (s. Abschnitt 3.2.8.3.). Um für die kalorimetrischen Messungen einen möglichst hohen Anteil (idealerweise 100%) an GTP beladenem H-Ras(G12V) einsetzen zu können, wurde rekombinantes H-Ras(G12V), wie im folgenden beschrieben, mit GTP beladen. In 1500 μl Gesamtvolumen wurden ca. 250 μM gereinigtes H-Ras(G12V) im Beladungspuffer gemischt und 5min bei 37°C inkubiert. Durch den hohen Anteil an GTP im Beladungsansatz sollte nach anschließender Zugabe von 10mM MgCl₂ und Inkubation für 1min bei RT vor allem GTP gebundenes H-Ras(G12V) vorliegen. Der Ansatz wurde dann in Konzentratorröhrchen (15ml volume Amicon Ultra 10kD, Millipore) überführt und durch Zentrifugation bei 3700rpm und 4°C auf ein Volumen von ca. 250 μl eingengt.

- **Aufreinigung von GTP beladenem H-Ras(G12V)**

Um Salze und nicht gebundene Nukleotide, die bei der Kalorimetrie stören, aus dem Beladungsansatz zu entfernen, wurde dieser auf eine in Puffer A equilibrierte Sephadex G-25 Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia) aufgetragen und bei einer Flussrate von 1ml/min Puffer A über FPLC (Pharmacia LKB; Amersham Pharmacia) getrennt. Die proteinhaltigen Fraktionen (ca. 4ml) wurden wiederum mittels eines Scheidefilters (wie oben) auf ca. 200 μl konzentriert. Für jede kalorimetrische Messung wurden jeweils drei

3. Material und Methoden

Beladungsansätze durchgeführt. Die einzelnen Ansätze wurden nach Gelfiltration und Konzentration vereinigt und anschließend wurde die Proteinkonzentration im Gesamtansatz nach der Methode von Bradford (s. Abschnitt 3.2.5.) bestimmt.

- ***Quantitative Bestimmung des H-Ras(G12V)-gebundenen GTP Anteils***

Puffer und Reagenzien:

- HPLC-Laufpuffer (pH 6,5): 69,6mM KH₂PO₄; 30,4mM K₂HPO₄; 10,0mM Tetrabutylammoniumbromid; 7,5% Acetonitril

Der Anteil an GTP beladenem H-Ras(G12V) im aufgereinigten Gesamtansatz wurde durch eine HPLC (Shimadzu LC10; *Shimadzu*) gestützte Analyse ermittelt (Rubio *et al.*, 2004). Dazu wurden ca. 120µM des beladenen Proteins über eine Injektionsschleife auf eine Vorsäule aufgetragen, die nukleotidfreies Ras adsorbiert. Die Auftrennung der Nukleotide erfolgte über eine *Reversed-Phase*-HPLC-Säule (EC 250/3 NUCLEOSIL 120-5 C18; *Machery-Nagel*) bei einer Flussrate des Laufpuffers von 0,8ml/min. Das in diesem Puffer enthaltene Tetrabutylammoniumbromid bildet dabei eine hydrophobe Hülle um die Guaninnukleotide, wobei die um GTP formierte Hülle größer ist, als die um GDP. Folglich wird GDP vor GTP von der Säule eluiert, und beide Nukleotide werden so getrennt voneinander quantitativ nachgewiesen. Die Aufnahme einer Standardkurve mit definierten Mengen GTP (nicht gezeigt), das auch für die Beladung verwendet wurde, ermöglichte eine sehr genaue Konzentrationsbestimmung von H-Ras(G12V)-GTP.

- ***Durchführung der kalorimetrischen Messungen***

Die kalorimetrischen Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. A. Blume, B. Fölting und K. Beyer (Institut für Physikalische Chemie; Martin-Luther-Universität) in Halle/Saale durchgeführt.

Puffer und Reagenzien:

- Puffer A: 25mM Tris/HCl pH 7,5; 0,2M NaCl; 5mM MgCl₂

Die kalorimetrischen Messungen wurden mit dem VP-ITC der Firma *MicrocalTM, Inc. (Northampton, MA, USA)* durchgeführt. Die Reaktionslösungen wurden vor jeder Messung ca. 10 min unter Rühren entgast. In der Messzelle wurde eine Lösung mit 20µN MSOR, d.h. 20µM WT-1; 10µM WT-2 bzw. 6,7µM WT-3 in Puffer A vorgelegt. Der sekundäre Ligand, ca. 600µM GTP beladenes H-Ras(G12V) in Puffer A (Präparation siehe Abschnitte □. und □.), wurde in die Spritze aufgezogen, und diese dann mit der Messzelle verbunden. Danach wurde der Ansatz programmgesteuert (*MicrocalTMOriginTM, Version 5,0; MicrocalTM, Inc.*) bei einer Rührgeschwindigkeit von 270rpm und einer Temperatur von 25°C equilibriert, d.h. dass die Kompensationsleistung *P* (Basislinie) auf einen konstanten Wert eingestellt wird. Danach erfolgte programmgesteuert die schrittweise Zugabe von 1 bis 4µl H-Ras(G12V) pro Injektion in die Messzelle bis zum Erreichen der Sättigung. Die Injektionsdauer wurde mit 22s festgelegt und vor jeder neuen Zugabe erfolgte eine vierminütige Equilibrierzeit.

Unter Verwendung der ORIGIN Software *MicrocalTMOriginTMITC (Version 5,0)* wurden die Isothermen aus dem Rohdatensatz berechnet. Die Ermittlung der thermodynamischen Parameter ΔH , ΔS , K_A und N durch ein Kurvenanpassungsverfahren erfolgte unter Verwendung der in der Software implementierten *One Set of Sites* Fitroutine. Die Daten wurden in drei unabhängigen ITC Experimenten erhoben.

3.2.9. Charakterisierung der MSOR-Ras-Interaktion *in vivo*

Die hergestellten eGFP-MSOR sollten *in vivo* in einer Reihe verschiedener methodischer Ansätze auf ihre Eignung als Reporter und Modulatoren der Ras-Aktivierung untersucht werden.

3.2.9.1. Mikroskopische Untersuchungen

- ***Lichtmikroskopie***

Die Kulturschälchen oder 6-Loch-Platten mit eGFP-Konstrukten exprimierenden Säugerzellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135M (*Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland*) analysiert. Die eGFP-Fluoreszenz wurde nach Anregung mit UV-Licht (HBO 50/ Ac) durch einen Filter (Anregungsfilter: 450-490; FT 510; LP 520) beobachtet. Ausgewählte Objekte wurden bei 100- oder 200-facher Vergrößerung (Achromplan 10x/0,25 bzw. 20x/0,40, *Zeiss*) mit einer Kamera (Kappa CF20 DXC; *Gleichen, Deutschland*) aufgenommen und mit Hilfe der Software Image Pro Plus™ (Version 2.0; *Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA*) abgelegt.

- ***Konfokale LASER-Scanning-Mikroskopie (LSM)***

Cos-7 oder NIH Zellen wurden auf Deckgläschen (Durchmesser: 25mm; *Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland*) ausgesät und wie mittels Polyfect™ oder Metafectene™ transfiziert (Abschnitt 3.2.2.4.). Ungefähr 24h nach Transfektion der Zellen wurde das Transfektionsmedium durch DMEM mit 1% Gentamycin ersetzt, in dem die Zellen für weitere 18-24h im Brutschrank kultiviert wurden. Für die Mikroskopie wurden die Deckgläschen in eine Messingkammer eingelegt, die mit einem Dichtungs- und Plastring dicht verschlossen wurde. Die Zellen auf dem Gläschen wurden mit 0,5ml DMEM mit 1% Gentamycin überschichtet und unter Verwendung eines C-Apochromat 63x/1,2W Objektivs (*Zeiss*) mit dem inversen *LASER-Scanning-Mikroskop (LSM) 510* (Axiovert 200M BP; *Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland*) analysiert. Die mikroskopischen Konfigurationen wurden mit der firmeneigenen Software (Version 3.2 SP2) vorgenommen und sind in Tabelle 8 für die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe aufgeführt. Die Aufzeichnung der einzelnen Fluoreszenzsignale eines ausgewählten Objektes erfolgte unmittelbar nacheinander. Dabei wurde ein optischer Schnitt von ca. 0,8-1µm Dicke in Z-Richtung der Zelle(n) mit einer Abtastgeschwindigkeit des *LASER* von 4, 512x512 Pixel und einer Datentiefe von 12bit aufgenommen und abgebildet. Ein solcher Schnitt repräsentiert eine Ebene der in den Abb. dargestellten Zelle(n).

Bei einigen Versuchen wurden die Zellen mit EGF oder TPA (Abschnitt 3.2.2.6.) stimuliert und der Verlauf in einer Echtzeit-Bilderserie aufgezeichnet. Dazu wurde mit der firmeneigenen Software, 3min vor der Stimulation beginnend, ca. alle 30s der immer gleiche Bildausschnitt einer Zellebene über einen Zeitraum bis zu 1h mit den beschriebenen Einstellungen aufgenommen. Im Anschluss an die Aufnahme der Einzelbilder konnten diese mit der Software in einem „Film“ betrachtet werden, wodurch Veränderungen infolge der Stimulation sehr gut beobachtet werden konnten. Für die Darstellung dieser Veränderungen wurden repräsentative Einzelbilder aus dem LSM-Programm exportiert, mit der Corel Photo Paint Software bearbeitet, und in den Text eingefügt.

Tabelle 8
LSM-Konfigurationen für die Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Ex _{max} /Em _{max} (nm)	LASER-Typ	LASER-Anregung (nm)	Blende (µm)	Filter
eGFP	488/507	Ar	488	94	BP 505-530
DsRed1	558/583	HeNe	543	108	LP 560
DsRed1 und TP-PRO®-3	558/583 642/661	HeNe HeNe	543 633	108 123	BP 560-615 LP 560

3.2.9.2. Quantitative Bestimmung apoptotischer Zellen

Annexin V bindet Ca²⁺-abhängig an Phosphatidylserin, das bei intakten Zellen nur auf der Innenseite, bei toten (apoptotische und nekrotische) Zellen jedoch auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert ist. Deswegen bindet Annexin V an die Oberfläche von apoptotischen und nekrotischen Zellen, d.h. diese sind Annexin V-positiv (A⁺). Um beide Populationen voneinander abgrenzen zu können, werden die Zellen zusätzlich mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose lassen sich nicht mit PI anfärben (A⁺/PI⁻), wohl aber solche in einem späten Stadium sowie nekrotische Zellen (A⁺/PI⁺) (Willingham1999). Durch die Verwendung des Annexin-gekoppelten Farbstoffes APC ist die parallele Messung von Annexin und eGFP mittels Durchflußzytometrie (FACS) möglich. Somit erlaubt diese Methode die direkte, quantitative Bestimmung des Anteils apoptotischer, eGFP-exprimierender Zellen. Ein Nachteil dieses Ansatz liegt darin, dass bei der Präparation auch Zellen geschädigt werden, die als falsch positive Ereignisse mit in die Messung eingehen.

- ***Annexin V-Assay***

Cos-7 Zellen wurden in 6-Loch-Platten kultiviert (ca. 80% Konfluenz) und entsprechend den Angaben unter Verwendung von Polyfect™ transfiziert (s. Abschnitt 3.2.2.4.). Nach Inkubation ü.N. im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium durch frisches Komplettmedium ersetzt, und die Zellen für weitere 24h kultiviert. Ungefähr 48h nach Transfektion wurde das Kulturmedium (enthält bereits abgelöste Zellen) in 15ml Kulturröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Die adhärennten Zellen wurden mit je 0,5ml Trypsin/Versene (*GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland*) gewaschen und dann mit 0,5ml frischer Trypsin-Lösung 4min im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden im abgenommenen Kulturmedium resuspendiert, in die 15ml Kulturröhrchen zurückgegeben und zentrifugiert (150rcf, 5min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen im Rückstand mit 1ml eiskaltem 1xPBS gewaschen und wiederum zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde ein zweites Mal durchgeführt und nach Zentrifugation wurden die Zellen in 200µl 1xBindungspuffer (*Annexin V binding buffer; BD Biosciences Pharmingen; CA; USA*) aufgenommen und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuerter Zentrifugation wurde das erhaltene Pellet in 220µl 1xBindungspuffer aufgenommen. Dieser Ansatz wurde auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt (je 100µl). Zu einem Ansatz wurden 2,5µl Annexin V-APC-Lösung (*BD Biosciences Pharmingen; CA; USA*) pipettiert, der andere blieb unverändert. Die Ansätze wurden dann zunächst 5min bei 37°C, anschließend 25min bei RT im Dunkeln inkubiert, und danach lichtgeschützt auf Eis gestellt.

3. Material und Methoden

- **FACS-Analyse**

Die Proben wurden am FACSCalibur™ (*BD Biosciences Immunocytometry systems; CA; USA*) vermessen und mit dem Programm CellQuest (*BD*) ausgewertet. Während jeder Messung wurden 10000 Zellen erfasst, wobei APC mit dem Fluoreszenzkanal FL-4 und eGFP mit FL-1 detektiert wurde. Die ermittelten Ereignisse wurden dann durch Auftrag von FL-4 gegen FL-1 dargestellt. Die Bereiche eGFP-positiver/-negativer und Annexin-positiver/-negativer Zellen wurden durch Setzen entsprechender Felder definiert. Der eGFP-positiv bzw. -negativ Bereich wurde durch den Vergleich transfizierter und nicht transfizierter, Annexin V-negativer Zellen definiert. Diese Messung ermöglichte auch die Bestimmung der Transfektionseffizienz. Anschließend wurden die eGFP-MSOR Ansätze vermessen, wobei zuerst der ungefärbte Ansatz und danach der Annexin V-gefärbte analysiert wurde. Anschließend wurden zu den nicht Annexin V gefärbten Ansätzen 5µl PI (*Calbiochem (Merck Biosciences GmbH), Schwalbach, Deutschland*) gegeben, gut gemischt und nach 5min Inkubation auf Eis erneut vermessen. Auf diese Weise konnte der Anteil PI-negativer, transfizierter Zellen ermittelt werden. Bei der Auswertung der Messungen wurde der Anteil Annexin V-positiver, transfizierter Zellen ermittelt und bezogen auf den Anteil Annexin V-positiver, eGFP-exprimierender Zellen graphisch dargestellt.

3.2.10. Western-Blot

Puffer und Reagenzien:

- Transferpuffer 25mM Tris/HCl pH 7,5; 43mM Glycin; 0,035% SDS; 20% Methanol

Für einen Western-Blot wurden 15-20µg Protein eingesetzt und mittels PAGE aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden Gel, Nitrozellulosemembran (8,5x5,5cm; Hybond™ C Extra, *Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England*), Filterpapier (10x8cm; *Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland*) und zwei *Fiberpads* ca. 10min in 1xTransferpuffer getränkt. Anschließend wurde ein *Fiberpad*, ein Filterpapier, das Gel, die Nitrozellulosemembran, ein weiteres Filterpapier und das zweite *Fiberpad* in dieser Reihenfolge übereinandergeschichtet und in die Blotapparatur (Mini Trans-Blot Transfer cell, *Biorad*) eingesetzt. Die Blotkammer wurde mit 1xTransferpuffer gefüllt und enthielt zur Kühlung des Puffers während des Blottens bei 100V und 250mA für 1h einen Kühlakku.

- **Immunodetektion**

Puffer und Reagenzien:

- 10xNET-G (pH 7,5) 500mM Tris/HCl pH 7,5; 50mM EDTA; 1,5M NaCl; 0,5% Triton X100; 0,2% Gelatine
- Strippuffer 62mM Tris/HCl pH 7,5; 70mM SDS; 3,5ml β-Mercaptoethanol

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Blotten kurz in 1xNET-G gewaschen und 1h in frischer 1xNET-G Lösung geblockt. Die Blockierungslösung wurde verworfen und durch den in 1xNET-G verdünnten primären Antikörper ersetzt. Die Inkubation der Membran erfolgte dann ü.N. bei 4°C unter leichtem Schütteln. Danach wurde die Antikörperlösung verworfen, und die Membran 3x für jeweils ca. 10min in 1xNET-G gewaschen. Nach Zugabe des HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers (1:7500 in 1xNET-G) und Inkubation für 1h bei RT wurde die Nitrozellulosemembran mindestens 5x mit 1xNET-G (je 10min) gewaschen. Die Detektion der antikörpermarkierten Proteine erfolgte durch Inkubation der Membran für 1min in 1ml Western Lightning™ Chemilumineszenz Reagenz Plus (*Perkin Elmer™, Boston, MA, USA*) und anschließende Exposition eines Röntgenfilms (*Hyperfilm™ ECL, Amersham Pharmacia*).

3. Material und Methoden

Um die selbe Membran mit einem weiteren Antikörper zu analysieren, wurde die Membran zunächst in 1xNET-G gewaschen und anschließend in Strippuffer für 45min bei 50°C geschwenkt. Nach gründlichem Waschen in 1xNET-G wurde die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Für die quantitative Auswertung wurden die Filme von phospho-p44/42 und HA bzw. Erk1-Blots zunächst eingescannt. Die einzelnen Signale wurden anschließend densitometrisch mit der Software Scion Image (Beta 4.0.2; *Scion Corporation, NIH, USA*) erfasst. Wie unter Abschnitt 3.2.13. beschrieben, wurden die Signale für phospho-Erk und Gesamt-Erk kalkuliert und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

3.2.11. Untersuchungen zur Genexpression

- ***MMP-1-Reportergen-Assay***

NIH3T3 Zellen wurden in 6-Loch-Platten kultiviert und wie unter Abschnitt 3.2.2.4. beschrieben mit Polyfect™ transfiziert. Dabei wurde zunächst je 1µg des *MSOR*- und *ras*-Konstruktes eingebracht. Nach Inkubation ü.N. im Brutschrank wurden die Zellen eines jeden Ansatzes mit 1µg *MMP-1-2G/pGL3* als Reporter (*firefly*-Luciferase aus *Photonus pyralis*) und 1µg pRL-TK als interner Kontrollreporter (*Renilla*-Luciferase aus *Renilla reniformis*) unter Verwendung von Polyfect™ transfiziert. Die *Renilla*-Luciferase steht unter der Kontrolle eines HSV-Thymidinkinase (HSV-TK) Promotors und wird nach Transfektion in den Zellen konstitutiv exprimiert. Tags darauf wurden die Zellen erst mit kaltem 1xPBS gewaschen und danach mit dem Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System (*Promega, Madison, WI, USA*) analysiert. Die gewaschenen Zellen wurden mit 250µl *Passive Lysisbuffer* pro Ansatz lysiert, mit einem Schaber vom Boden gelöst und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Inkubation für 10min bei RT unter leichtem Schütteln und Zentrifugation bei 20800rcf für 5min, wurden die Lysate entweder direkt vermessen (siehe unten) oder bei -80°C gelagert. Um die Luciferaseaktivität eines Ansatzes zu bestimmen wurden 20µl des Lysates in die Vertiefung einer 96-well-Platte übertragen. Dazu wurden 50µl Luciferasesubstrat für *firefly* (*Luciferase assay reagent II*) gegeben und die relative Aktivität der *firefly*-Luciferase mit dem Micro Lumat LB96P (*EG&G Berthold, Warrendale, PA, USA*) gemessen. Danach wurden sofort 50µl Luciferasesubstrat für *Renilla* (*Stop&Glo® reagent*) zum Ansatz pipettiert und deren relative Aktivität ermittelt. Aus dem Verhältnis der *firefly*/*Renilla*-Luciferaseaktivitäten ergibt sich die relative Luciferaseaktivität eines Ansatzes. Diese wurde für jeden Ansatz bestimmt und in einem Diagramm bezogen auf die eGFP/Ras-Aktivierung prozentual dargestellt. In jedem der beiden unabhängig durchgeführten Experiment erfolgte die Aktivitätsbestimmung eines jeden Ansatzes in Duplikaten oder Triplikaten.

- ***Genexpressionsanalyse mittels cDNA-Array***

- ***RNA-Isolierung***

Puffer und Reagenzien:

- 5xPBS (pH 7,5): 500mM NaCl; 100mM NaH₂PO₄; 400mM Na₂HPO₄

Die in 25cm²-Zellkulturflaschen gewachsenen Cos-7 Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten unter Verwendung von Polyfect™ transfiziert (Abschnitt 3.2.2.4.). 24h nach Transfektion wurde diese Prozedur wiederholt, um den Anteil transfizierter Zellen in der Flasche zu erhöhen. Nach Inkubation ü.N. im Brutschrank wurden die Zellen für 7h bzw. ü.N. in DMEM mit 1% Gentamycin starviert. Tags darauf wurde das Medium abgenommen und die abgelösten Zellen durch Zentrifugation bei 249rcf, RT pelletiert. Die adhärennten Zellen in der Flasche wurden mit ca. 5ml kaltem 1xPBS gewaschen und anschließend in 1ml TRIzol-Reagenz (*Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland*) resuspendiert. Damit wurde dann auch das Zellpellet aufgenommen, diese Suspension in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt.

3. Material und Methoden

Zu dieser 1ml Lösung wurden 200µl Chloroform pipettiert und der Ansatz gut geschüttelt. Nach Zentrifugation für 15min bei 20800rcf und 4°C wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die RNA zu fällen wurden anschließend 200µl Isopropanol in das Gefäß gegeben, dieses wiederum gut geschüttelt und 10min bei RT inkubiert. Der nach Zentrifugation (20800rcf, 15min, 4°C) erhaltene Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1ml 70%-igem Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert (5min wie oben) und anschließend bei RT getrocknet. Nach Inkubation für ca. 10min wurde es dann in 50µl sterilem aq. dest. resuspendiert. Danach erfolgte die RNA-Konzentrationsbestimmung mit einer 1:100 verdünnten Probe der gewonnenen RNA (Abschnitt 3.2.6.).

- **Reverse Transkription unter Einbau von Digoxigenin-dUTP**

Die cDNA wurde nachfolgend als nichtradioaktive Sonde für den cDNA-Array verwendet. Für die Detektion der Signale wurden während der cDNA Synthese Digoxigenin-markierte UTP-Nukleotide (DIG-dUTP) in diese eingebaut. Die Synthese der cDNA erfolgte mit 5µg RNA, die zunächst mit 1,5µl Oligo(dT)15 Primer (0,5µg/µl) 15min bei 65°C inkubiert wurde. Zu diesem Ansatz wurden dann folgende Komponenten hinzugefügt: 6µl 5x First strand buffer (*GibcoBRL*), 6,7mM DTT; 1U rRNasin® RNase inhibitor (*Promega*), dATP,- dCTP,- dGTP- Gemisch (jedes Nukleotid 0,4mM, *Promega*), 0,1mM dTTP (*Promega*), 45µM Digoxigenin-11-dUTP (*Roche, Mannheim, Deutschland*) und 8U M-MLV RT, RNase H(-) Point mutant (*Promega*). Der Ansatz wurde mit aq.dest. auf 30µl aufgefüllt und erst 75min bei 42°C und anschließend 15min bei 72°C inkubiert. Nach der Reaktion erfolgte die Aufreinigung der Sonde durch Fällung der DNA mit 0,1 Volumen 4M LiCl und 3 Volumen 96%-igem Ethanol. Nach Inkubation (30min, -80°C) und Zentrifugation (13000rpm, 15min, 4°C) wurde das erhaltene Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 50µl 1xTE-Puffer resuspendiert. Die erfolgreiche Synthese wurde durch Elektrophorese im Agarosegel nachgewiesen und der Ansatz bei -20°C gelagert.

- **Der cDNA-Array**

Puffer und Reagenzien:

- 20xSSC (pH 7,0) 3M NaCl; 0,3M Na-citrat

Der cDNA-Array auf Nylonmembran Basis (7x10cm; *Roche*) wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Wiederanders bereitgestellt. Darauf sind die nachfolgend aufgeführten humanen cDNA, 200-500bp große PCR Fragmente, aufgebracht:

matrix-metalloproteinase (MMP) *MMP 1, 2, 3, 7, 9, 11, 13* und *19*;

membrane type matrix metalloproteinases (MT-MMP) *MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP* und *MT5-MMP*;

tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) *TIMP 1, 2, 3* und *4*;

Metalloproteasen *ADAM 8, 9, 10, 11, 15, 20* und *21*;

cathepsine B, D, F, H, K, L, S, V, W und *Z*;

caspasen 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 und *10*; *inhibitor of apoptosis protein 3* (IAP 3);

urokinase type plasminogen activator (uPA); *urokinase type plasminogen activator receptor* (uPAR);

plasminogen activator inhibitors (PAI) *PAI-1* und *-2*;

integrine α2, α4, α5, α6, αV, β1, β2, β3, β4, β5 und *β7*;

cystatin A, B und *C*; *tumor necrosis factor α*; *converting enzyme* (TACE); sowie *emmprin I* und *II*;

heparanase; *Pro1073*; *tissue factor*; *granzyme H* und *bikunin*.

Als „Haushaltsgene“ bzw. negative Kontrollen wurden folgende cDNA eingesetzt: *β-actin*; *c-ets-1*; *carcinoembryonic antigen* (CEA); *glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase* (GAPDH); *grün fluoreszierendes Protein* (GFP); *ubiquitin*; *elongation factor EF1α R13a* und das ribosomale Protein *S9*. Die PCR Fragmente wurden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und die Konzentration der

3. Material und Methoden

DNA auf 20 ng/µl in aq. dest. eingestellt. Anschließend wurde die DNA zunächst für 5min bei 95°C und dann für 20min in 100mM NaOH inkubiert. Danach wurden die Proben in 2x SSC/125 mM Tris/HCl pH 7.5 verdünnt, so dass 5ng cDNA in Duplikaten auf die positiv geladene, große Nylonmembran aufgebracht wurden. Die Membranen wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

- **Hybridisierung der cDNA Proben**

Puffer und Reagenzien:

- 20xSSC (pH 7,0) 3M NaCl; 0,3M Na-citrat
- Puffer 1 (pH 7,5) 150mM NaCl; 100mM Maleinsäure
- 1xBlockierungslösung 10xBlockierungslösung in Puffer 1 verdünnt
- Waschpuffer Puffer 1; 0,3% Tween-20
- Detektionspuffer (pH 9,5) 0,1M Tris/HCl; 0,1M NaCl

Um unspezifische Interaktionen zwischen cDNA und membrangebundenen Abschnitten zu verhindern, wurde die Nylonmembran zunächst mit Heringssperma-DNA prähybridisiert. Dazu wurden 900µg/ml Heringssperma-DNA (*Invitrogen GmbH*) gelöst in Hybridisierungslösung (DIG easy Hyb Granules; *Roche*) 10min bei 95°C denaturiert und dann mit 5ml vorgewärmter Hybridisierungslösung verdünnt. Anschließend wurde die Lösung zusammen mit der angefeuchteten Membran in ein 50ml Röhrchen überführt und dieses unter permanenter Rotation im Hybridisierungssofen ü.N. bei 42°C inkubiert.

Tags darauf wurden die DIG-dUTP markierte cDNA (kompletter Ansatz) und 45µl Heringssperma-DNA in 1ml Hybridisierungslösung gemischt, und nach Inkubation für 10min bei 95°C wurden dazu nochmals 2ml vorgewärmte Hybridisierungslösung gegeben. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und durch die Hybridisierungslösung mit der cDNA ersetzt. Die Hybridisierung der Membran damit erfolgte über 2d bei 42°C im Hybridisierungssofen.

Im Anschluss wurde die Membran in frische 50ml-Röhrchen eingelegt und nacheinander wie folgt gewaschen: einmal 5min mit 2xSSC+0,1%SDS, einmal mit 1xSSC+0,1%SDS, jeweils bei RT, dann dreimal für 15min bei 68°C mit 0,5xSSC+0,1%SDS und anschließend zweimal für 45min bei 68°C mit 0,1xSSC+0,1%SDS. Daran anschließend wurde sie kurz in Puffer 1 gewaschen und dann für 1h in der 1xBlockierungslösung (Blocking reagent (10x), Kat.Nr.: 1096176, *Roche*) bei RT inkubiert. Diese Lösung wurde dann durch die Antikörperlösung ersetzt, mit der die Membran 30min lang inkubiert wurde. Der anti-Digoxigenin-AP Antikörper (*Fab fragments, Roche*) wurde 1:10000 in Blockierungslösung verdünnt eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit dem Waschpuffer für jeweils 10min wurde die Membran für 5min in Detektionspuffer eingelegt. Anschließend wurde die Membran auf einem Papiertuch abgetupft und 5min in CSPD-Lösung (*Roche*)- 1:100 in Detektionspuffer verdünnt- eingelegt. Die Membran wurde dann in eine Klarsichtfolie eingeschlagen, 15min bei 37°C inkubiert, dann ein Film (*Amersham Pharmacia*) aufgelegt und für 30-40min exponiert.

3.2.12. Untersuchungen zur zellulären Transformation

- **Koloniebildung in Soft-Agar-Assay**

Die Koloniebildung in Soft-Agar wird als ein Testsystem eingesetzt, um die Transformation/ Malignität von Zellen zu prüfen. In einem klonalen Auswachsen transformierter Zellen zu Kolonien im Soft-Agar zeigt sich deren Fähigkeit, ohne den Kontakt zur Unterlage (*anchorage-independent*) zu proliferieren. Für diese Versuche wurden NIH-TM Zellen in 6-Loch-Platten kultiviert und mit je 1µg DNA der zu untersuchenden Konstrukte mittels Polyfect™ (Abschnitt 3.2.2.4.) transfiziert. Nach Kultivierung ü.N. im Brutschrank wurden die Zellen wie beschrieben trypsiniert (Abschnitt 3.2.2.1.) und nach Inkubation für 4min im Brutschrank bei 37°C mit 5ml Komplettmedium versetzt. Diese Suspension wurde in 15ml

3. Material und Methoden

Schraubdeckelröhrchen überführt und 5min bei 209rcf zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2ml Komplettmedium resuspendiert, wovon 50 μ l für die Bestimmung der Zellzahl eingesetzt wurden (Abschnitt 3.2.2.3.).

In jede Vertiefung einer 24-Loch-Platte wurden zunächst 0,5ml einer 0,3%-igen Agarlösung (AgarNoble; *Difco Laboratories, Detroit, USA*) gegeben. Diese wurde nach dem Aushärten bei RT mit einer Mischung aus 0,5ml Zellsuspension (2×10^4 Zellen) und 0,5ml einer 1,2%-igen Agarlösung überschichtet. Die 24-Loch-Platte wurde für 10min bei 4°C inkubiert und danach wurden auf jede Agarschicht 200 μ l Komplettmedium mit bzw. ohne 25ng/ml NGF aufgetragen. Alle drei bis 4 Tage wurde das vorhandene Medium abgenommen und durch frisches mit/ohne NGF ersetzt. Nach Inkubation der Ansätze im Brutschrank für 10-14d wurden die im Soft-Agar gewachsenen Kolonien angefärbt. Dazu wurden 0,5ml 3-(4,5-Dimethylthiaol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)-Lösung (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*) pro Vertiefung pipettiert und die Platten 2h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Koloniezahl pro Gesichtsfeld durch Auszählen von mindestens 10 Feldern unter dem Lichtmikroskop bei 100x Vergrößerung ermittelt. Alle Ansetzungen eines Versuchs erfolgten in Duplikaten. Zur Auswertung wurden wurde 3 unabhängige Experimente mit NIH-TM Zellen herangezogen.

- **Matrigel-Invasions-Assay**

Im Matrigel-Invasions-Assay wird die Fähigkeit transformierter Zellen simuliert die ECM zu überwinden. Hierfür wurde mit *24mm Transwell*[®]-Platten (Kat.Nr. 3428; *CoStar GmbH, Bodenheim, Deutschland*) gearbeitet. Diese bestehen aus einem Plastikeinsatz (oberes Kompartiment), der in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte (unteres Kompartiment) eingesetzt wird. In das obere Kompartiment wurden pro Vertiefung 200 μ l der 1:50 in Komplettmedium verdünnten Matrigellösung (BD Matrigel[™] Matrix; *BD Biosciences, Bedford, MA, USA*) pipettiert. Das BD Matrigel[™] wird aus der extrahierten Basalmembran eines EHS Maus Sarkoms präpariert, einem Tumor der reich an Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) ist. Die Hauptbestandteile sind Laminin, Kollagen IV, Heperansulfat Proteoglykane und Entaktin. Zellen, die auf dieser Matrix kultiviert werden, verhalten sich wie *in vivo* (Angaben des Herstellers) und nur transformierte Zellen überwinden diese Barriere. Die Platten wurden anschließend ü.N. im Brutschrank inkubiert und tags darauf wurde das untere Kompartiment mit 1,5ml Komplettmedium befüllt.

Cos-7 Zellen wurden in 6-Loch-Platten kultiviert und mit je 1 μ g DNA eines jeden Konstruktes unter Verwendung von Polyfect[™] transfiziert (s. Abschnitt 3.2.2.4.). Nach Kultivierung ü.N. im Brutschrank wurden die Zellen wie beschrieben trypsiniert (s. Abschnitt 3.2.2.1.) und nach Inkubation für 4min im Brutschrank bei 37°C mit 5ml Komplettmedium versetzt. Diese Suspension wurde in 15ml Schraubdeckelröhrchen überführt und 5min bei 209rcf zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2ml Komplettmedium resuspendiert, wovon 50 μ l für die Bestimmung der Zellzahl eingesetzt wurden (Abschnitt 3.2.2.3.). Auf das Matrigel im oberen Kompartiment wurden 2×10^5 Zellen in 1ml Komplettmedium pro Vertiefung pipettiert. Jeder Ansatz erfolgte in Doppelbestimmung. Die *Transwell*-Platten wurden für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Nach 48h und 72h wurde die Migration der eGFP-transfizierten Zellen vom oberen in das untere Kompartiment der *Transwell*-Platte unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abschnitt 3.2.9.1.) analysiert. Dafür wurden die eGFP-positiven Zellen im unteren Kompartiment bei 100x Vergrößerung in mindestens 10 Gesichtsfeldern ausgezählt. Der Assay wurde in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Aus den Daten der einzelnen Ansätze (eGFP positive Zellen) wurde der Mittelwert bestimmt und in einem Diagramm zusammen mit dem berechneten Standardfehler aufgetragen.

3.2.13. Densitometrische Auswertung der Signale

Der nach Exposition der Membran entwickelte Film wurde zunächst eingescannt und dann mit der AIDA-Software (Version 2.11.002; *Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt, Deutschland*) densitometrisch ausgewertet. Die Signalstärke eines einzelnen Spots und des Hintergrundes (negativ) entspricht der Schwärzung (*integral*) in *arbitrary units* der Fläche (*area*) in Pixeln. Aus dem Verhältnis der Flächen von

3. Material und Methoden

Spot und Hintergrund ($area_{Spot} / area_{negativ}$) wurde ein Korrelationsfaktor F ermittelt, mit dem die densitometrischen Signale eines jeden Spots nach $integral_{Spot} - F \times integral_{negativ}$ berechnet wurden. Diese wurden auf den Durchschnitt aller densitometrischen Signale der entsprechenden Membran bezogen. Aus den Mittelwerten der Duplikate ergaben sich dann die „relativen densitometrischen Einheiten“.

3.2.14. Statistische Analyse

Für die statistischen Analysen wurde das Programm SPSS für Windows verwendet. Um Differenzen zwischen einzelnen Parametern auf ihre Signifikanz zu prüfen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney (U) Test angewandt. Dabei galten Unterschiede für $P \leq 0,05$ als signifikant.

4. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit beschriebenen mono- und multivalenten RBD-Konstrukte werden aus Gründen der Übersichtlichkeit unter dem Oberbegriff MSOR zusammengefasst. Diese lassen sich in Varianten gruppieren, die aus einer einzelnen oder zwei oder drei verknüpften Bindedomäne bestehen und als RBD-1, RBD-2 bzw. RBD-3 (Mono-, Di- bzw. Trimer) bezeichnet werden. Diese wiederum können entweder die wildtypische (WT) oder mutierte RBD tragen. Bei der Beschreibung individueller Konstrukte werden WT oder der Name der Mutation(en) zusammen mit der Anzahl der Bindedomänen angegeben (z.B. WT-1 für die Bezeichnung einer einzelnen wildtypischen Bindedomäne).

4.1. Konstruktion und Charakterisierung der MSOR-Konstrukte

Die Klonierung der mono-, di und trimeren *raf-RBD*-Konstrukte erfolgte sukzessiv, d.h. zunächst wurde eine einzelne Bindedomäne in den Vektor eingefügt, daran anschließend die zweite und an diese die dritte. Im Folgenden wird beispielhaft die Klonierung der wildtypischen *RBD*-Mono-, Di- und Trimere (*WT-1*; -2 bzw. -3) in den bakteriellen Expressionsvektor pRSET B beschrieben. Die erfolgreiche Entwicklung der Mono-, Di- bzw. Trimere, bei denen jede einzelne Bindedomäne die R59A- bzw. T68A-Mutation trägt, erfolgte auf die gleiche Art wie bei den *WT*-Konstrukten.

Die Primer für die Amplifikation der einzelnen Bindedomänen wurden so konzipiert, dass sich jeweils an ihren 5'-Enden Schnittstellen für Restriktasen befinden (Abschnitt 3.1.4.1.). Über diese Schnittstellen erfolgte dann der Einbau in pRSET B. Außerdem wurden die Primer so konzipiert, dass bei der Klonierung der Di- und Trimere über die entsprechenden Primerpaare zwischen dem Ende der einen und dem Beginn der nächsten *RBD* 15 Nukleotide eingebaut wurden. Die Konstruktion der MSOR in pRSET B ist schematisch in Abb. A1 dargestellt.

4.1.1. Konstruktion der MSOR-Konstrukte

Die erste Bindedomäne (*RBD*, AS 51-131) aus *c-raf-1* (*WT-RBD-1*) wurde durch PCR mit den Primern RBD1_fwd (*XhoI* Schnittstelle am 5' Ende) und RBD1_rev (*Bam*HI und *Pst*I Schnittstellen am 5' Ende) aus dem *rafRBD*/pGEX-2T Vektor amplifiziert. Das ca. 260bp große PCR-Produkt wurde aufgereinigt, danach erst mit *XhoI* und nach erneuter Fällung der DNA mit *PstI* gespalten. Der Vektor pRSET B wurde wie das einzuführende PCR-Fragment präpariert. Nach Ligation von Fragment und Vektor folgte die Transformation in den *E.coli* Stamm Top10F'. Von einigen auf Agarplatten gewachsenen Klonen wurde die Plasmid-DNA mittels Minipräparation isoliert. Durch Restriktionsanalyse mit *XhoI/PstI* wurde das entsprechende PCR-Fragment in positiven Klonen nachgewiesen (Abb. 8A). Von jeweils zwei dieser positiven Klone wurde die DNA mittels Midipräparation vervielfältigt, und das eingebrachte Fragment durch Restriktion wiederum nachgewiesen. Die Sequenzierung der positiven Klone zeigte eine völlige Übereinstimmung mit der Originalsequenz. Einer der Klone, als *WT-1*/pRSET bezeichnet, diente als Vorlage um im Anschluss an die erste Bindedomäne die zweite zu knüpfen.

Die zweite Bindedomäne *WT-RBD-2* wurde mit dem Primerpaar RBD2_fwd (am 5' Ende *PstI*-Schnittstelle) und RBD2_rev (am 5' Ende *NcoI*-Schnittstelle) in einer PCR-Reaktion aus dem Vektor *WT-1*/pRSET amplifiziert. Dieses Fragment wurde ebenso wie *WT-1*/pRSET zunächst mit *PstI* und nach Fällung der DNA mit *NcoI* geschnitten und aufgereinigt. Nach Ligation, Transformation und Minipräparation wurden durch nachfolgende Restriktionsanalyse mit *PstI/NcoI* positive Klone identifiziert, welche die zweite RBD integriert haben (Abb. 8A). Von diesen positiven Klonen wurde einer ausgewählt (*WT-2*/pRSET), bei dem die Sequenzierung die korrekte RBD-Sequenz und den intakten Leserahmen bestätigte. Die DNA dieses Konstruktes wurde durch Midipräparation angereichert. Durch Restriktion mit *XhoI* und *Hind*III wurde ein ca. 510bp großer Abschnitt aus dem Vektor geschnitten, der die dimere Bindedomäne (*WT-RBD-2*) repräsentiert (nicht gezeigt).

4. Ergebnisse

Um die dritte Bindedomäne *WT-RBD-3* zu einfügen, wurde die Bindedomäne mit den Primern RBD3_fwd (5' Ende mit *NcoI*-Schnittstelle) und RBD3_rev (5' Ende mit *EcoRI*-Schnittstelle) aus *WT-2/pRSET* durch PCR amplifiziert. *WT-RBD-3* wurde gleichsam wie *WT-2/pRSET* mit *NcoI* und nach Fällung der DNA mit *EcoRI* geschnitten. Die Spaltprodukte *WT-RBD-3* und *WT-2/pRSET* wurden gereinigt und ligiert. Nach Transformation und Isolation der Plasmid-DNA wurden die *WT-RBD-3* enthaltenden Klone durch Spaltung mit *NcoI/EcoRI* identifiziert (Abb. 8A). Durch Spaltung mit *XhoI* und *HindIII* konnten in den positiven Klonen alle drei in pRSET B eingebauten RBD (ca. 760bp) nachgewiesen werden. Der fehlerfreie Einbau der RBD in den Vektor sowie die korrekte Basenfolge aller drei RBD bestätigte sich nach Sequenzierung. Eines dieser Konstrukte, als *WT-3/pRSET* fortgeführt, wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die erfolgreiche Einführung der mono-, di- bzw. trimeren WT- und mutierten (R59A, T68A) Bindedomänen in pRSET B ist anhand der Restriktion der entsprechenden trimeren Konstrukte in Abb. 8B dargestellt. Diese wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten, so dass entweder nur das Fragment der ersten (*BamHI*), der ersten beiden (*XhoI/NcoI*) oder aller drei RBD (*XhoI/HindIII*) aus dem jeweiligen Vektor herausgeschnitten wurde. Wie die Abbildung zeigt, ergibt sich aufgrund der unterschiedlichen Größe der *RBD*-Konstrukte ein stufenartiges Muster. Die richtige Größe der Fragmente konnte anhand des mitgeführten Größenstandards nachgewiesen werden. Die Sequenzierung der einzelnen Konstrukte bestätigte deren korrekten Einbau sowie deren Übereinstimmung mit den entsprechenden *RBD*-Sequenzen. In Tabelle 9 sind die einzelnen *MSOR*/ pRSET B Konstrukte aufgelistet.

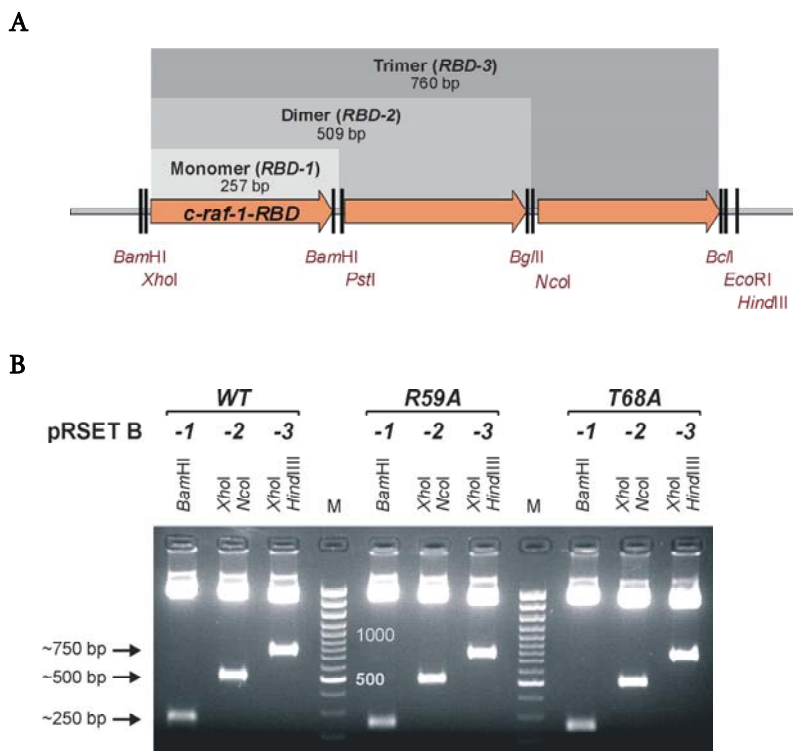


Abb. 8. Nachweis der einzelnen *MSOR* in pRSET B. Schematische Darstellung eines Ausschnittes von pRSET B mit den *MSOR*-Konstrukten (A). Die in pRSET B (ca. 2,9kb) klonierten mono-, di- und trimeren Varianten (ca. 260bp, 509bp bzw. 760bp) bestehend entweder aus *WT*-, *R59A*- oder *T68A*-*RBD* (von links nach rechts) wurden mit den ausgewiesenen Restriktasen aus dem Vektor mit den trimeren *MSOR* geschnitten und durch Gelelektrophorese nachgewiesen (B).

Tabelle 9
MSOR des *WT*-; *R59A*- oder *T68A*-*RBD* in pRSET B

Monomere:	<i>WT-1/pRSET</i>	<i>R59A-1/pRSET</i>	<i>T68A-1/pRSET</i>
Dimere:	<i>WT-2/pRSET</i>	<i>R59A-2/pRSET</i>	<i>T68A-2/pRSET</i>
Trimere:	<i>WT-3/pRSET</i>	<i>R59A-3/pRSET</i>	<i>T68A-3/pRSET</i>

4.1.2. Verhalten der MSOR *in vitro*

4.1.2.1. Rekombinante Expression der MSOR und H-Ras(G12V) als His-Fusionsproteine

Zunächst sollten die Bindungseigenschaften der MSOR-Konstrukte an Ras-GTP *in vitro* charakterisiert werden. Deshalb wurden die in pRSET B klonierten Konstrukte nach Transformation in den *E.coli* Stamm *BL21(DE3)pLysS* als His-Fusionen exprimiert und mittels Affinitätschromatographie (Ni²⁺-NTA Säule) aufgereinigt, dialysiert und anschließend aufkonzentriert (Abb 9A; B). Abb 9C zeigt zusammenfassend die derart präparierten Proteine von WT-1, -2 bzw. -3 und H-Ras(G12V). Die rekombinanten Proteine der RBD-Mutanten R59A bzw. T68A wurden gleichermaßen hergestellt. Die Reinheit der Proben einer Präparation wurde anhand der Coomassie-gefärbten Gele auf ca. 90% bestimmt.

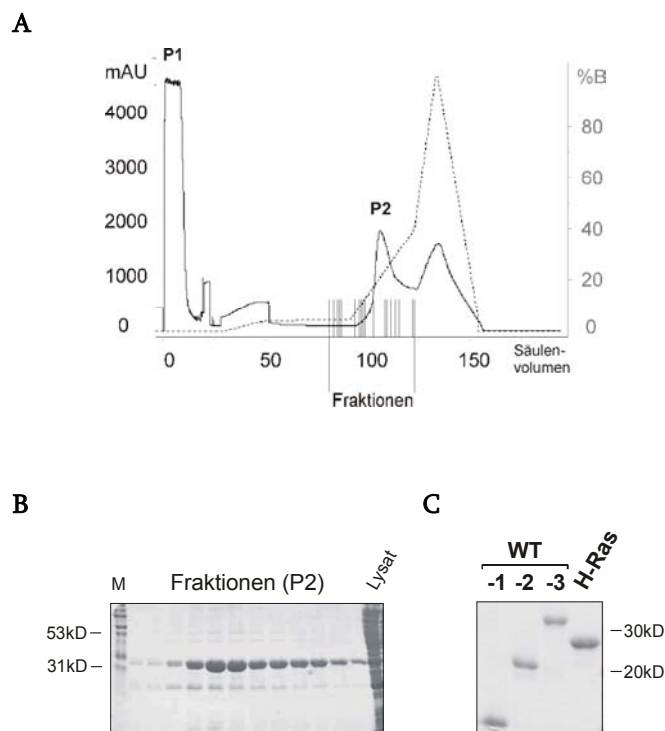


Abb. 9. **Aufreinigung rekombinanter His-Proteinen mittels Affinitätschromatographie.** (A) UV-Spektrum einer Proteinaufreinigung (schwarz), in dem der Verlauf des Gradienten von Puffer B (gestrichelt) hinterlegt ist. P1 repräsentiert Proteine aus dem Zell-Lysat, die während der Beladung nicht an die Säule binden. Während des Waschens mit steigendem Anteil an Puffer B werden weitere unspezifisch gebundene Proteine eluiert. Bei einem Puffer B Anteil von ca. 14% begann die Elution der His-Fusionsproteine (P2), die in 1ml Fraktionen gesammelt wurden. (B) Mittels PAGE und Coomassie-Färbung wurde der Anteil an Zielprotein (P2) in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Fraktionen mit einem Anteil von ca. 90% wurden vereinigt, dialysiert und aufkonzentriert. (C) 5µg final präparierter His-Fusionsproteine von WT-1; -2 bzw. -3 und konstitutiv-aktivem H-Ras wurden in einem PAA-Gel getrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert.

4.1.2.2. Untersuchung der MSOR/Ras Interaktion mittels Ras/GAP-Assay

Um den Einfluss (die Auswirkungen) mutierter und/ oder oligomerisierter Bindedomänen auf die Interaktion mit Ras-GTP *in vitro* zu testen, wurde der sogenannte Ras/GAP-Assay angewandt. Dabei wurde K-Ras4B mit radioaktiv-markiertem [γ ³²-P]GTP beladen, das durch zugegebenes NF-1cat (katalytische Domäne des RasGAP) hydrolysiert wird. Dadurch wird das radioaktiv-markierte γ -Phosphat freigesetzt, dessen Menge über die Zeit (verfolgt) gemessen wird und ein Maß für die GAP-Aktivität (Kontrolle) ist. Bei der Vorinkubation des Beladungsansatzes mit einem MSOR-Konstrukt bindet dieses abhängig von seiner Affinität an Ras- $[\gamma$ ³²-P]GTP und wirkt dabei als kompetitiver Hemmer, da beide GAP und RBD die Schalterregion I von Ras binden (Scheffzek *et al.*, 1997). In Abhängigkeit von der Affinität wird so die NF-1 stimulierte GTP-Hydrolyse blockiert. Es entsteht weniger freies ³²P_i als im Kontrollansatz ohne Bindedomäne. MSOR Varianten mit sehr geringer Affinität zu Ras-GTP interferieren nicht mit der NF-1-vermittelten Hydrolyse.

Zunächst wurde in einer Versuchreihe der Einfluss der mutierten MSOR auf die GAP-vermittelte Hydrolyse von Ras-GTP getestet (Abb. 10A). Dafür wurden die wildtypischen und mutierten (i) Mono- oder

4. Ergebnisse

(ii) Trimere eingesetzt, die Ras-GTP in abgestufter Weise binden, d.h. WT > T68A >> R59A (Nassar *et al.*, 1996). Dabei konnte gezeigt werden, dass die untersuchten MSOR-Konstrukte entsprechend ihrer Affinität für Ras-GTP die GAP vermittelte Hydrolyse blockieren. WT-1/-3 zeigt den flachsten Kurvenverlauf, schirmt also Ras-GTP im Vergleich zu den beiden RBD-Mutanten am effektivsten gegen NF-1 ab. Gemäß den K_D -Werten binden die T68A- besser als die R59A-Varianten Ras-GTP. In Abb. 10B sind die Auswirkungen der Oligomerisierung auf die Blockade der NF-1 katalysierten GTP-Hydrolyse dargestellt. Für diese Versuche wurde in jedem Ansatz die gleiche Gesamtmenge an Bindungsvalenzen, d.h. die gleiche Zahl an RBD pro Ansatz eingesetzt. Wie ein Vergleich der Kurvenverläufe für (i) WT- oder (ii) T68A-1, -2 bzw. -3 zeigt, verstärkt sich der blockierende Effekt mit der Anzahl der verknüpften Bindedomänen: Trimer > Dimer > Monomer. Dabei fällt auf, dass sich die Kurven für die WT-Di- und Trimere im Gegensatz zu R59A oder T68A auch nach einer Reaktionszeit von 15min (nicht gezeigt) nicht an die Kurve der Kontrolle annähern und nicht in den Sättigungsbereich gelangen. Das könnte daran liegen, dass diese beiden Konstrukte Ras-GTP so stark binden, dass ein Teil des Ras permanent über den Messzeitraum (15min) gebunden ist und dadurch dauerhaft den Zugang von NF-1 an Ras-GTP verhindert. Diese *in vitro* Versuche zeigen, dass die Stärke der Blockade der MSOR Konstrukte zum einen von der Affinität für Ras-GTP und zum anderen von der Anzahl der verbundenen Bindedomänen (Oligomerisierungsgrad) abhängt.

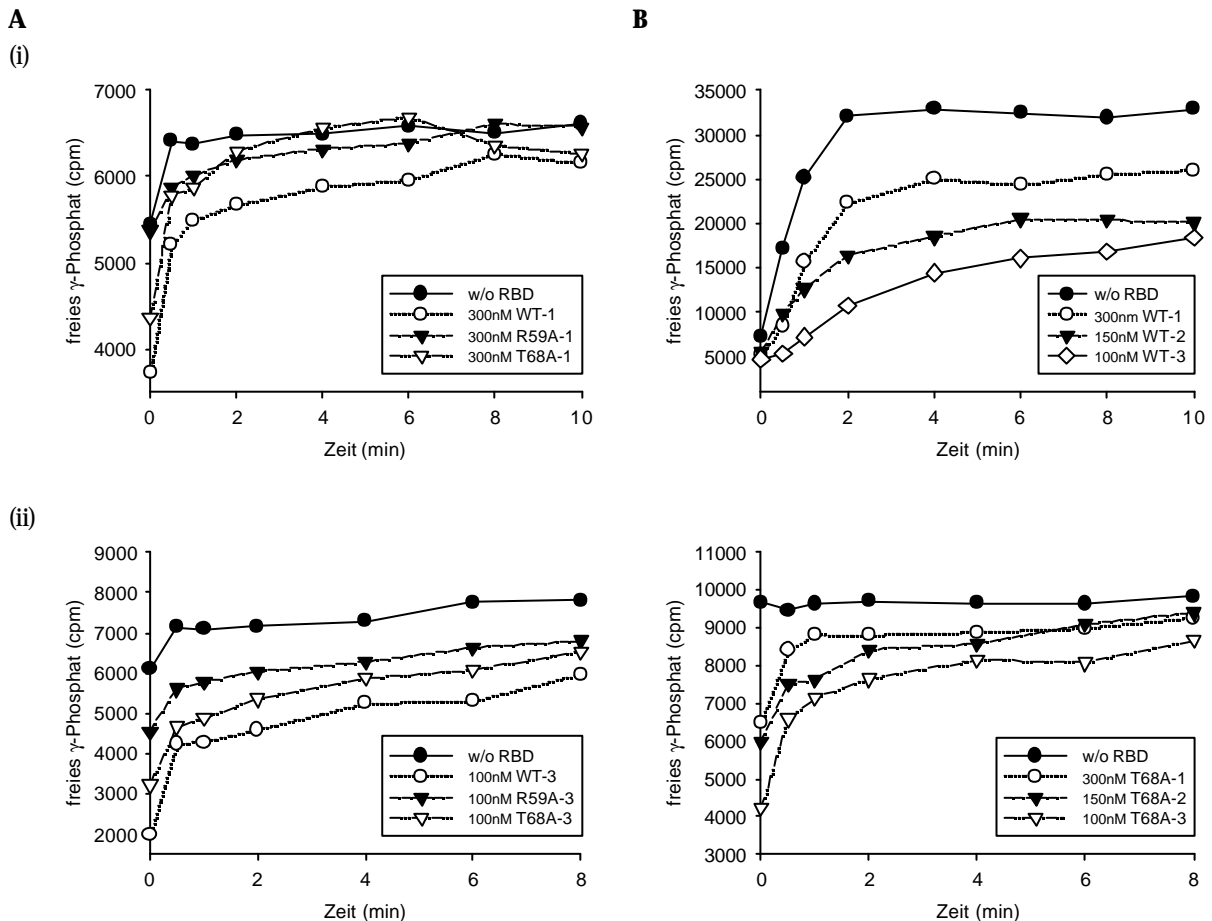


Abb. 10. **Charakterisierung der Ras/MSOR Interaktion *in vitro* mittels Ras/GAP- Assay.** Ras wurde mit [32 -P]GTP beladen und entweder mit Puffer (w/o RBD) oder verschiedenen MSOR inkubiert. Durch Zugabe von NF-1 wurde die Reaktion gestartet und die Hydrolyse von Ras-GTP aufgezeichnet. **(A)** Um den Einfluss der Affinität auf die Ras/MSOR Interaktion zu untersuchen, wurden (i) Mono- oder (ii) Trimere der wildtypischen (WT) versus mutierten Bindedomänen (R59A; T68A) eingesetzt, die Ras-GTP abgestuft binden. **(B)** Einfluss der Oligomerisierung am Beispiel der mono-, di- bzw. trimeren (i) WT- und (ii) T68A-Konstrukte auf die Affinität der MSOR für Ras-GTP. Die Konzentrationen der MSOR wurden so eingestellt, dass in jedem Ansatz die gleiche Konzentration an Bindungsvalenzen vorlag.

4.1.2.3. Untersuchung des kooperativen Effekt mittels Isothermer Titrationskalorimetrie

Anhand der Ras/GAP-Assays konnte gezeigt werden, dass multivalente RBD (Di- bzw. Trimer) Ras-GTP stärker binden als monomere. Eine kausale und auch quantitative Erklärung dieser Beobachtung konnte damit allerdings nicht gegeben werden. Deshalb wurde die ITC eingesetzt, mit der sich die thermodynamischen Parameter N , K_A , ΔH° , ΔS° für die MSOR/Ras Interaktion einzeln und quantitativ bestimmen lassen. Letztlich sollte auf diesem Wege die Frage beantwortet werden, ob die stärkere Bindung oligovalenter MSOR an Ras tatsächlich auf einem kooperativen, d.h. entropiegetriebenen Effekt beruht. Eine kurze Einführung in diese Methodik ist in Abschnitt 3.2.8.5. gegeben. In der Studie von Rudolph *et al.* (2001) wurde die Bindung einer einzelnen RBD (entspricht WT-1) und H-ras mittels ITC bereits charakterisiert (Details in Abschnitt 5.1.).

Für die kalorimetrischen Experimente wurden aufgereinigte His-Fusionsproteine eingesetzt. Zunächst wurde die Interaktion von WT-1 und GTP beladenem H-Ras(G12V) bei 25°C untersucht. Die Bindedomäne wurde in der Messzelle vorgelegt, und Ras schrittweise zutitriert. Nach jeder Zugabe von Ras wurde die Wärmeleistung als Funktion der Zeit ($\mu\text{cal/s}$) in Form von typischen Injektionspeaks aufgezeichnet. Entgegen den Erwartungen wurden endotherme Prozesse mit einer Enthalpieänderung von +2 bis 10 kcal/mol gemessen (nicht gezeigt). Diese Werte resultieren u.a. aus Verdünnungswärmen nicht gebundenen GTP und dem Zerfall von Mg^{2+} /EDTA-Chelatkomplexen, da die gleichen Effekte auch bei der Titration von GTP beladenem H-Ras(G12V) bzw. Beladungspuffer in Puffer A beobachtet wurden (nicht gezeigt). Diese Wärmeeffekte sind viel größer als die bei der Ras/RBD Bindung entstehenden und überlagern diese folglich. Um die Interaktion zwischen RBD und Ras untersuchen zu können, war es notwendig, identische Pufferbedingungen für beide Komponenten zu schaffen. Aus diesem Grund wurde GTP beladenes H-Ras(G12V) mittels Gelfiltration von den anderen Bestandteilen des Beladungsansatzes (Mg^{2+} , EDTA, GTP) getrennt und in Puffer A überführt. In Abb. 11 ist eine typische Aufreinigung des Beladungsansatzes gezeigt. Die anschließende Bestimmung der H-Ras(G12V) Proteinkonzentration und des GTP Anteils ergab, dass im Gesamtansatz abhängig von der Präparation zwischen 65-80% Ras GTP beladen sind.

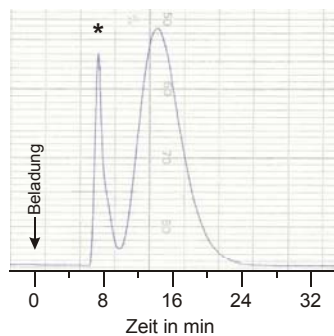


Abb. 11. **Gelfiltration des H-Ras(G12V) Beladungsansatzes.** GTP-beladenes H-Ras(G12V) wurde auf eine Sephadex G25-Säule aufgetragen ($t=0$) und mit Puffer A getrennt von anderen Bestandteilen des Beladungsansatzes eluiert. Die proteinreiche Fraktion (*) wurde gesammelt (5,5-9,5min), aufkonzentriert und in für die ITC verwendet.

Alle weiteren Versuche wurden in Puffer A bei 25°C mit aufgereinigtem H-Ras(G12V) und der gleichen Konzentration an RBD-Valenzen pro Ansatz durchgeführt. Die Messzelle wurde mit $20\mu\text{M}$ WT-1; -2 oder -3 befüllt und GTP beladenes H-Ras(G12V) zutitriert. Unter diesen Bedingungen konnten die für exotherme Bindungsreaktionen typischen Titrationskurven (Abb. 12A) aufgenommen werden. Die freigesetzten Wärmen werden mit der sukzessiven Zugabe von Ras von ca. -2.5 kcal/mol bis -0.1 kcal/mol immer kleiner. Mit zunehmender Ras-Konzentration in der Messzelle, werden die RBD-Bindestellen zunehmend besetzt bis sich schließlich ein Sättigungsgleichgewicht einstellt. Dabei fällt auf, dass die Sättigung im Falle des Dimers (ii) und Trimers (iii) bereits nach ca. 90min erreicht wird, beim Monomer (i) aber erst nach ca. 120min. Die Rohdaten einer Messung wurden anschließend in eine Reaktionsisotherme überführt, aus der anhand einer berechneten Anpassungskurve die thermodynamischen Größen N , K_A , ΔH° und ΔS° (Tabelle 10) abgeleitet wurden. Die einzelnen Isothermen der Messungen sind in Abb. 12B zusammenfassend dargestellt.

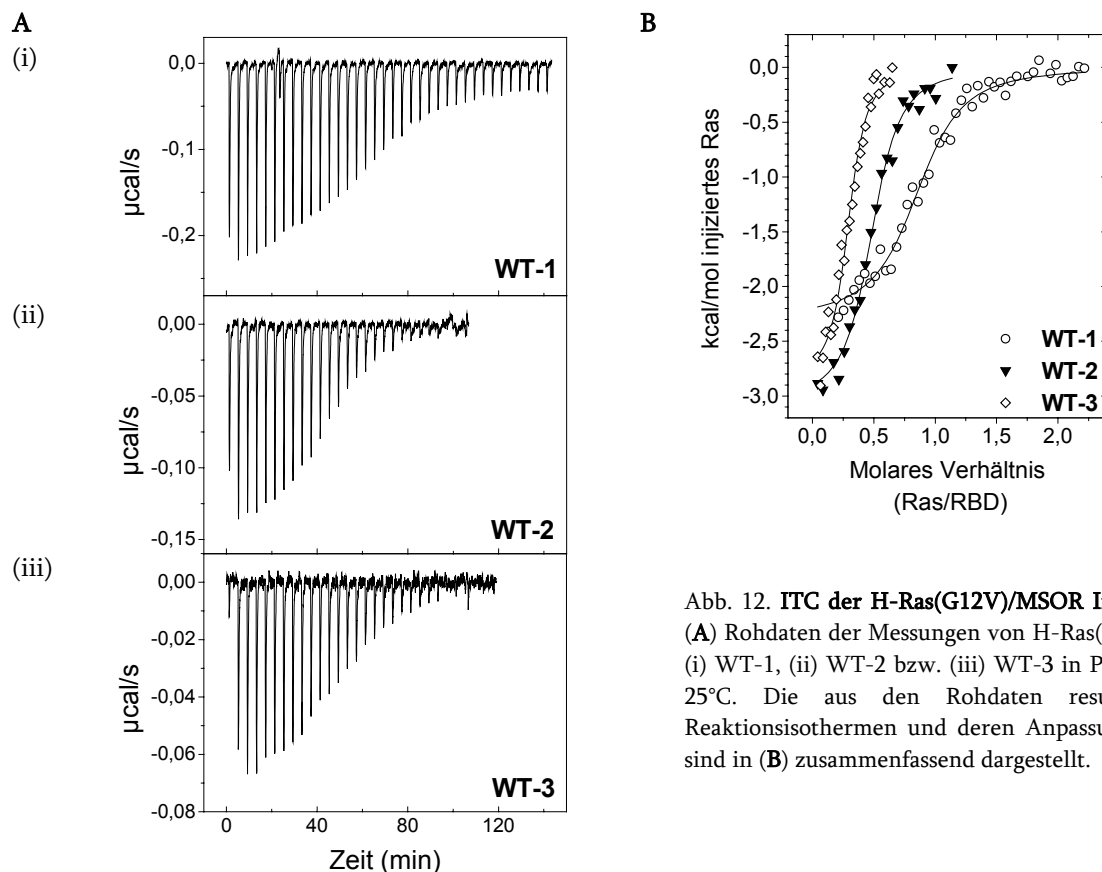


Abb. 12. ITC der H-Ras(G12V)/MSOR Interaktion. (A) Rohdaten der Messungen von H-Ras(G12V) und (i) WT-1, (ii) WT-2 bzw. (iii) WT-3 in Puffer A bei 25°C. Die aus den Rohdaten resultierenden Reaktionsisothermen und deren Anpassungskurven sind in (B) zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 10

Thermodynamische Parameter der Interaktion zwischen H-Ras(G12V) und WT-1, -2 bzw. -3. Die Messungen wurden bei 25°C in Puffer A durchgeführt. H-Ras(G12V) wurde mit GTP beladen und gegen die gleiche Anzahl an Bindedomänen von WT-1; -2 oder -3 titriert. K_A ist in Einheiten $\cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ und ΔH° und $T\Delta S^\circ$ in $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ angegeben. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

H-Ras(G12V)					
	N	K_A	ΔH°	$T\Delta S^\circ$	
WT-1	0,93 $\pm 0,05$	5,86 $\pm 0,17$	-2,22 $\pm 0,08$	5,57 $\pm 0,16$	
WT-2	0,59 $\pm 0,05$	16,39 $\pm 0,40$	-2,94 $\pm 0,06$	5,49 $\pm 0,15$	
WT-3	0,35 $\pm 0,03$	18,53 $\pm 0,30$	-3,00 $\pm 0,08$	5,54 $\pm 0,17$	

Die Kurven für WT-1, -2 und -3 sind bezüglich des molaren Verhältnis Ras:RBD gegeneinander verschoben. Da die genauen Konzentrationen beider Interaktionspartner bekannt sind, lässt sich aus diesem Verhältnis am Äquivalenzpunkt unmittelbar die Stöchiometrie N der Bindung bestimmen. Interessanterweise ergeben die Messungen- innerhalb des Standardfehlers- ca. 1,0 für das Monomer; ca. 0,5 für das Dimer und ca. 0,3 für das Trimer. Weil sich diese Angaben auf die gleiche Gesamtzahl an RBD-Bindestellen in den Ansätzen beziehen, die 20 μM WT-1, 10 μM WT-2 und 6,7 μM WT-3 entsprechen, ergibt sich aus den Werten ein stöchiometrisches Verhältnis zwischen WT-1, -2 bzw. -3 und Ras von 1:1. Dies bedeutet pro Molekül MSOR wird ein Molekül Ras gebunden und nicht pro RBD ein Molekül Ras. Die Kurvenverläufe der Isothermen für die Messungen von Ras mit WT-2 und WT-3 sind sehr ähnlich, was sich in den entsprechenden Werten für K_A ($16,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ bzw. $18,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) und ΔH° ($-2,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ bzw. $-3,0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) widerspiegelt. Demgegenüber verläuft die Isotherme von WT-1 mit Ras flacher. Daraus ergibt sich eine

kleinere Enthalpieänderung ($\Delta H^{\circ} = -2,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) und aus dem geringeren Anstieg der berechneten Kurve mit $5,9\cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ eine deutlich kleinere Bindungskonstante K_A . Die anhand von K_A und ΔH° berechenbare Entropieänderung ΔS° weist jedoch für alle Ansätze, innerhalb des experimentellen Fehlers den gleichen Wert von ca. $5,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ auf. Die stärkere Bindung des Di- und Trimer an Ras gegenüber dem Monomer beruht also nicht auf einem Zuwachs der Entropie, sondern auf einer günstigeren Enthalpieänderung. Dieses Ergebnis ist insofern unerwartet, da jede einzelne Bindedomäne, unabhängig von einer Verknüpfung, die gleiche Affinität (ΔH) zu Ras besitzen sollte.

4.1.3. Charakterisierung der MSOR *in vivo*

4.1.3.1. Konstruktion von eGFP-MSOR Fusionen

Bondeva *et al.* (2002) und de Castro *et al.* (2004) kommen in ihrer Arbeiten zu dem Schluss, dass eine einzelne GFP-geknüpfte RBD unzureichend für die Beobachtung der endogenen Ras-Aktivierung in lebenden Zellen ist. Aufgrund der besseren Bindungseigenschaften gegenüber monovalenten MSOR, sollten deshalb die multivalenten eine Detektion des endogenen Ras-GTP ermöglichen. Um dies detaillierter zu untersuchen, wurde eGFP an den N-Terminus der MSOR fusioniert (eGFP-MSOR). Diese Konstrukte können in Säugerzellen als fluoreszenzmarkierte Sonden für Ras-GTP eingesetzt werden. Für die Funktion des Reporters ist es dabei irrelevant, ob das Fluoreszenzprotein C- oder N-terminal mit der RBD verknüpft ist (Walker und Lockyer, 2004). Ausgehend von den in pRSET B hergestellten Varianten wurden alle MSOR-Konstrukte des WT und der R59A- bzw. T68A-Mutanten (Mono-, Di- und Trimere) mit *XhoI/EcoRI* aus diesem Vektor herausgeschnitten. Der Empfängervektor pEGFP-C2 wurde über die selben Schnittstellen geöffnet und die MSOR durch Ligation an das 3'-Ende von EGFP gefügt. Die Ligationsprodukte wurden dann in *E.coli* Top10F' transformiert. Danach erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA und durch Restriktionsanalyse mit *XhoI/EcoRI* die Identifikation positiver Klonen (nicht gezeigt). Die Vektor-DNA eines jeden positiven Klones wurde nach einer Midipräparation gereinigt und anschließend sequenziert. Die pEGFP-Plasmide mit den korrekt integrierten und fehlerfreien MSOR Sequenzen, die für die nachfolgenden Arbeiten verwendet wurden, sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11
WT-; R59A- oder T68A-MSOR in pEGFP-C2

Monomere:	WT-1/pEGFP	R59A-1/pEGFP	T68A-1/pEGFP
Dimere:	WT-2/pEGFP	R59A-2/pEGFP	T68A-2/pEGFP
Trimere:	WT-3/pEGFP	R59A-3/pEGFP	T68A-3/pEGFP

4.1.3.2. Einfluss der eGFP-MSOR auf die Morphologie von Cos-7 Zellen

In einführenden Versuchen wurden Cos-7 Zellen transient entweder mit pEGFP allein oder den Vektoren für eGFP-WT-1, -2 oder -3 transfiziert und nach 48h, die eine 24h Starvationsphase beinhaltet, konfokal mikroskopiert. Die eGFP-exprimierenden Cos-7 Zellen zeigen die für sie typische runde, abgeflachte Morphologie mit ausgeprägten Lamellipodien (siehe Abb. 16), wobei die gesamte Zelle gleichmäßig fluoresziert und der nierenförmige Zellkern etwas stärker als das Zytosol betont ist. Bei Expression einer einzelnen Bindedomäne (eGFP-WT-1) ist das Bild insgesamt ähnlich wie bei eGFP exprimierenden Zellen (Abb. 13). Im Unterschied dazu aber akkumuliert die Bindedomäne deutlich stärker im Nukleus, was bereits beschrieben worden ist (Chiu *et al.*, 2002; Choy und Philips 2001) und durch Kernfärbung mit TP-PRO[®]-3 nachgewiesen wurde (Abb. A3). Überraschend und stark verschieden von den Ansätzen mit eGFP und eGFP-WT-1 jedoch ist das mikroskopische Bild eGFP-WT-2. bzw. -3 exprimierender Zellen (Abb. 13).

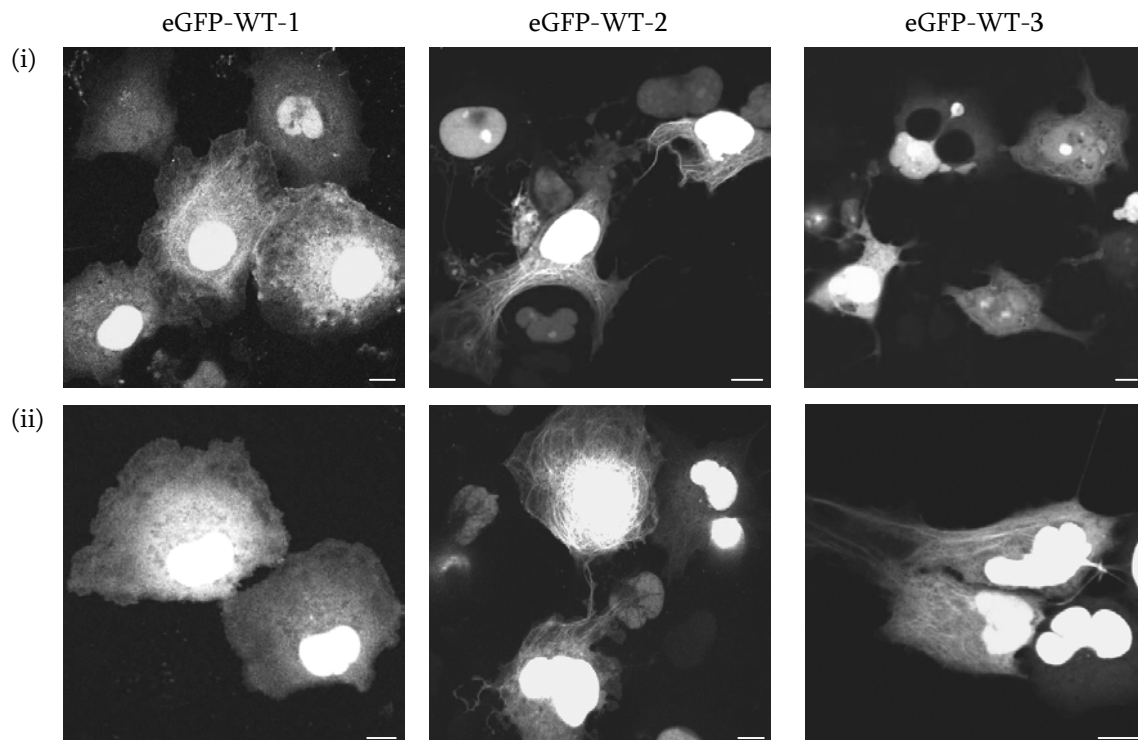


Abb. 13. **Morphologie eGFP-WT-1; -2 bzw. -3 exprimierender Cos-7 Zellen.** Die Konstrukte für eGFP-WT-1; -2 bzw. -3 wurden transient in Cos-7 Zellen transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die starvierten Zellen unter dem Konfokalmikroskop analysiert. Für jeden Ansatz sind jeweils zwei repräsentative Beispiele für den beobachteten Phänotyp abgebildet (i bzw. ii). Balken 10 μ m

Obwohl Cos-7 Zellen vielgestaltig sind, weist die überwiegende Zahl eine untypische Form auf. Die adhären Zellen sind meist spindelförmig oder asymmetrisch verformt und besitzen lange schmale Ausläufer, möglicherweise Fillopodien (nicht untersucht). Das Zytoplasma wird von grün fluoreszierenden faserartigen Strukturen durchzogen (nicht untersucht), ist z.T. von Vakuolen unterschiedlicher Größe durchsetzt und/oder teilweise stark um den Kern kondensiert. Der für Cos-7 Zellen typische nierenförmige Nucleus fluoresziert sehr stark wurde und ist in manchen Zellen fragmentiert. Außerdem finden sich Zellen mit Apoptose-typische Merkmalen wie Membranausstülpungen (*blebs* genannt), die sich mitunter zu Vesikeln mit zytosolischem und/oder nukleärem Inhalt ausformen und von der Zelle abschnüren. Derartige Zellen haben sich partiell oder vollständig von der Unterlage gelöst, sind abgerundet oder bereits vollständig in membrangebundene Vesikel, sogenannte *apoptotic bodies*, aufgegangen (Abb. 14). Nach Kerr *et al.* (1972) und Häcker (2000) sind derartige morphologischen Veränderungen todsichere Merkmale für apoptotische Zellen. Insgesamt wurden in Ansätzen mit eGFP-WT-2 bzw. 3 nur sehr wenige Zellen mit einer vergleichbaren Morphologie wie bei eGFP-WT-1 beobachtet.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Beobachtungen durch Artefakte instabiler eGFP-MSOR Fusionen hervorgerufen werden, wurden die Zellsate von eGFP, eGFP-WT-1; -2 oder -3 exprimierender Cos-7 Zellen durch Western-Blot mit einem GFP-spezifischen Antikörper analysiert. Wie die abgestuften Größenunterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen zeigen, sind die eGFP-MSOR Fusionen auch 48h nach Transfektion in Cos-7 Zellen intakt (siehe Abb. 29).

Interessanterweise finden sich die für die WT-Varianten beschriebenen morphologischen Veränderungen auch bei der Expression der multivalenten T68A- und R59A-Bindedomänen in Cos-7 Zellen wieder (Abb. 14), und das obwohl beide Mutanten deutlich schwächer Ras binden als die WT-MSOR. Aus diesen Beobachtungen wurde gefolgert, dass all diese multivalenten eGFP-Konstrukte (WT-, R59A-, T68A-2 bzw. -3) nach (Über)expression zur Apoptose in Cos-7 führen.

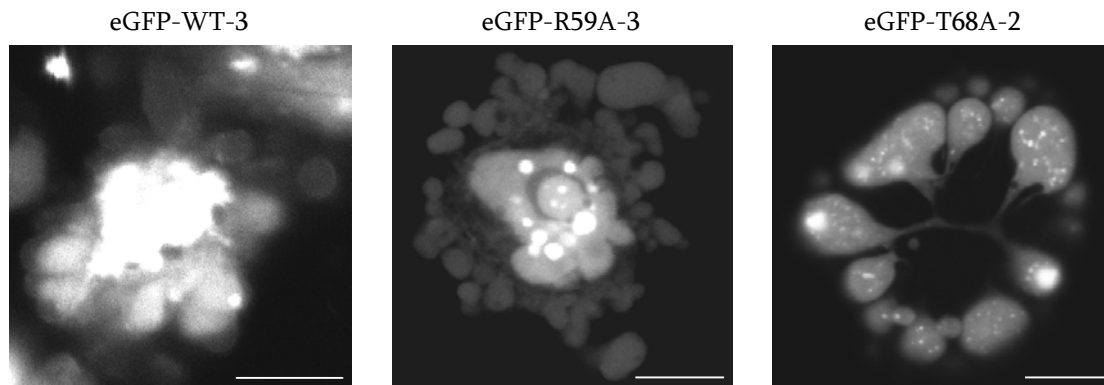


Abb. 14. **eGFP-MSOR-exprimierende Cos-7 Zellen zeigen eine Apoptose-typische Morphologie.** Die Zellen wurden transient mit den entsprechenden eGFP-Konstrukten wie angezeigt transfiziert und 48h später unter konfokal aufgenommen. Balken 10 μ m

4.1.3.3. Einfluss der eGFP-MSOR auf die Auslösung der Apoptose in Cos-7 Zellen

Im Gegensatz zu eGFP führt die Expression von eGFP-MSOR zu einer drastisch veränderten Morphologie der Cos-7 Zellen, die u.a. charakteristische Merkmale apoptotischer Zellen (z.B. *apoptotic bodies*) aufweist. Deshalb sollte nachfolgend durch Annexin V-Färbung und FACS-Analyse untersucht werden, ob diese Beobachtungen auch mit einer quantitativ, erhöhten Apoptoserate korrelieren. Die Identifikation apoptotischer Zellen mittels Annexin V beruht auf dessen spezifischer Bindung an Phosphatidylserin. Dieses wird bei toten (apoptotischen), nicht jedoch bei intakten Zellen, auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran exponiert. Sterbende Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose sind Annexin V-positiv, lassen sich aber nicht mit Propidiumiodid (PI) anfärben (A^+/PI^-). Dagegen sind nekrotische oder spät-apoptotische Zellen Annexin V- und PI-positiv (A^+/PI^+).

Cos-7 Zellen wurden transient mit pEGFP, *WT-1*/pEGFP oder *WT-3*/pEGFP transfiziert und nach Kultivierung für 48h in Kompletmedium mit Annexin V-APC gefärbt. Durch anschließende FACS-Analyse wurde der Anteil transfizierter, toter Zellen quantitativ erfasst und als Verhältnis von Annexin V-positiven (A^+)-Zellen zu eGFP dargestellt (Abb. 15). Dabei ist der Anteil an A^+ -Zellen schon bei eGFP-WT-1 Expression um ca. 20%, bei eGFP-WT-3 gar um ca. 50% im Vergleich zu eGFP signifikant erhöht ($P < 0,05$). Die zusätzliche Färbung mit Propidiumiodid ergab, dass es sich bei ca. 84% der toten Zellen (A^+) tatsächlich um apoptotische (A^+/PI^-) handelt. Zusammen mit der Konfokalmikroskopie zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression von eGFP-WT-1 bzw. -3 in Cos-7 Zellen zur verstärkten Apoptose führt. Dabei erhöht sich der Anteil sterbender Zellen deutlich bei der Expression multivalenten MSOR (eGFP-WT-3), was gut mit den mikroskopischen Beobachtungen übereinstimmt. Die dabei auffälligen morphologischen Veränderungen vor allem des Zellkerns gelten (mehr noch als die Annexin V-Färbung) als ein todsicherer Indikator für den programmierten Zelltod (Willingham 1999) und zeigen sich auch nach Überexpression der anderen multivalenten eGFP-MSOR (R59A- und T68A-2 bzw. -3). Demnach wird durch diese hochaffinen Konstrukte (möglicherweise) das gesamte endogene Ras und damit ein für das Überleben von Zellen wichtiger Faktor (Barradas *et al.*, 1999; Wolfman und Wolfman, 2000) dauerhaft sequestriert und dadurch die Apoptose eingeleitet.

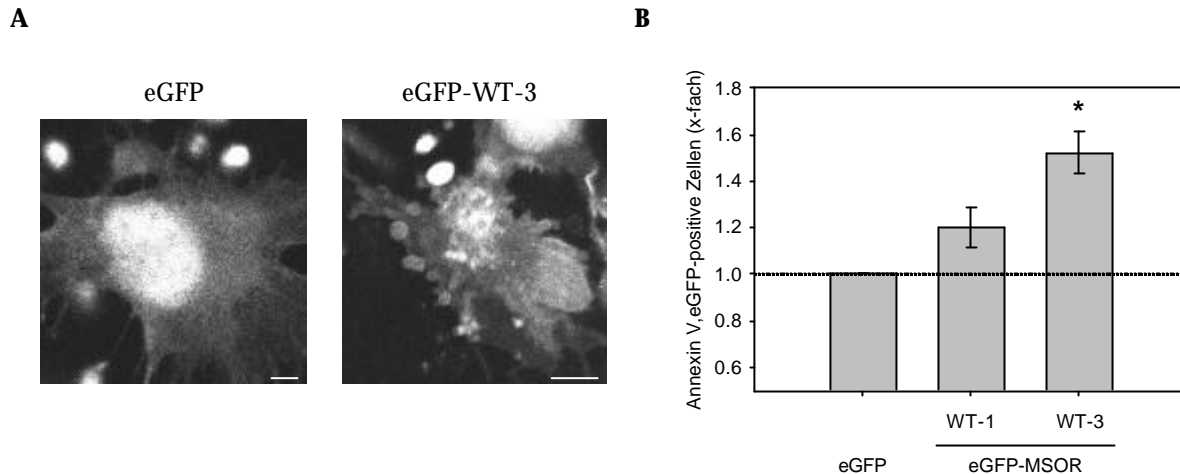


Abb. 15. **Untersuchungen zur Apoptose eGFP-WT-3 exprimierender Cos-7 Zellen.** (A) Cos-7 Zellen wurden mit den Konstrukten für eGFP und eGFP-WT-3 transient transfiziert und 48h später unter dem Konfokalmikroskop analysiert. Balken 10µm. (B) Parallel wurde der Anteil apoptotischer Cos-7 Zellen aus Transfektionsansätzen mit den Vektoren für eGFP, eGFP-WT-1 und eGFP-WT-3 durch Annexin V-Färbung und FACS Analyse quantitativ bestimmt. (* P<0,05; signifikant gegenüber eGFP)

4.1.3.4. Beobachtungen bei Koexpression von eGFP-MSOR und dsRed1-Ras/Rap-Konstrukten

Wenn die in MSOR exprimierenden Cos-7 Zellen beobachteten Veränderungen tatsächlich durch die Sequestrierung endogenen Ras hervorgerufen werden, dann sollten diese Effekte- zumindest partiell- durch heterologe Expression von Ras, das folglich die MSOR „abfangen“ kann, aufgehoben werden. Um dies zu überprüfen und dabei gleichzeitig die Ras/MSOR Interaktion darzustellen, wurden fluoreszenzmarkierte Varianten beider Proteine eingesetzt. Dazu wurde wie nachfolgend beschrieben DsRed1 N-terminal mit konstitutiv aktivem H-Ras, H-Ras(G12V) fusioniert (Abb. A2). Nach Choy *et al.* (1999) unterscheidet sich die Lokalisation GFP-gekoppelter Ras-Proteine nicht von der ungekoppelter nach Expression in verschiedenen Zellen (CHO, MDCK).

In einer PCR Reaktion wurde *H-ras(G12V)* zunächst mit dem Primerpaar H-Ras_fwd und H-Ras_rev aus dem Donorvektor peXV3 heraus amplifiziert und anschließend über *XhoI/HindIII* in den Vektor pDsRed1 C1 kloniert. Durch Restriktions- und Sequenzanalyse wurden korrekte Plasmide identifiziert, von denen einer für die nachfolgenden Arbeiten verwendet wurde (Abb. 17). DsRed1-H-Ras(G12V) wurde dann gemeinsam mit eGFP oder eGFP-WT-1, -2 bzw. -3 in starvierten Cos-7 Zellen exprimiert und konfokal mikroskopiert (Abb. 16). Die Abbildung zeigt die Aufnahmen der einzelnen Fluoreszenzkanäle von eGFP (obere Reihe), DsRed1 (mittlere Reihe) sowie die Überlagerung beider Kanäle (untere Reihe). Die Expression von eGFP und DsRed1-H-Ras(G12V) zeigt, dass H-Ras perinukleär (linke Zelle) und in der Plasmamembran lokalisiert ist, während eGFP getrennt davon einheitlich im Zytosol und im Zellkern verteilt vorliegt (Abb. 16A). Im Gegensatz dazu ko-lokalisieren (gelb-orange) DsRed1-H-Ras(G12V) und eGFP-WT-1, -2 bzw. -3 unter den gleichen Bedingungen (Abb. 16B-D). Insgesamt unterscheidet sich das äußere Erscheinungsbild kotransfizierter Zellen zwischen den einzelnen WT-Varianten kaum. Die Überexpression von H-Ras(G12V) hebt die durch WT-2 bzw. -3 verursachten morphologischen Veränderungen der Cos-7 Zellen tatsächlich auf, wie der „korrigierte“ Phänotyp belegt (vergleiche Abb. 14). Wie die Abbildungen dokumentieren, kolokalisieren eGFP-markiertes WT-1, -2 bzw. WT-3 und DsRed1-gekoppeltes H-Ras(G12V) in kurzen, wellenartig verlaufenden Membranabschnitten der Plasmamembran (periphere Lamellipodien und *ruffles*), in Vesikeln und im perinukleären Bereich. Letzterer wurde durch Kolokalisation von Ras und spezifischen Markern als Golgi-Apparat identifiziert (Chiu *et al.*, 2002; Choy *et al.*, 1999; de Castro *et al.*, 2004). Durch die Expression von aktivem H-Ras werden also die verschiedenen WT-Konstrukte gleichermaßen an Ras-lokalisierte Kompartimente rekrutiert. Trotzdem akkumuliert ein

4. Ergebnisse

Teil der WT-Bindedomänen im Nukleus unabhängig vom heterolog exprimierten Ras (linke und rechte Reihe). Neben der nachgewiesenen Ras/RBD Interaktion *in vitro*, deutet die Kolokalisation auch auf eine funktionelle Wechselwirkung *in vivo* hin.

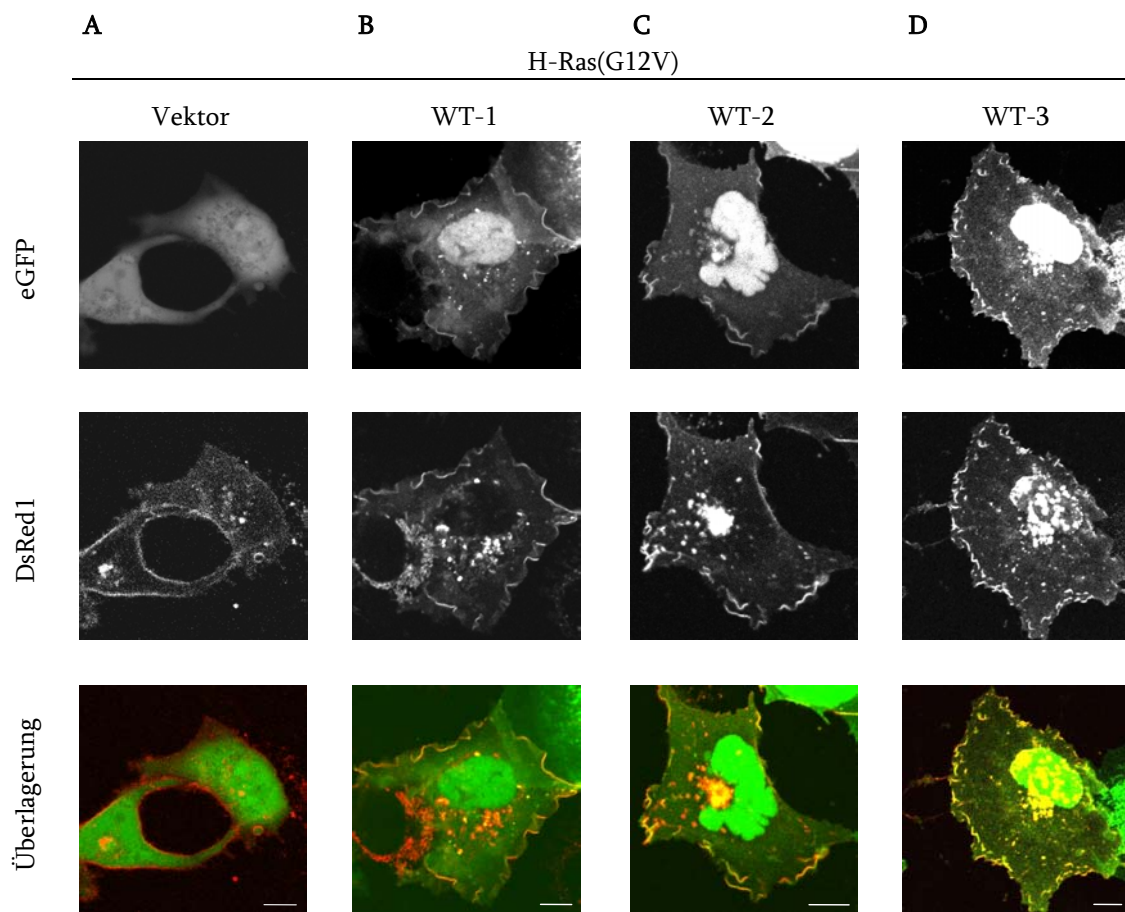


Abb. 16. **DsRed1-H-Ras(G12V) vermittelt die Interaktion mit eGFP-WT-MSOR *in vivo*.** Cos-7 Zellen wurden mit den Konstrukten für eGFP oder eGFP-WT-1, -2 bzw. -3 und DsRed1-H-Ras(G12V) transfiziert, starviert und 48h nach Transfektion konfokal analysiert. Während eGFP (A) allein vollständig separiert von Ras im Zytosol und Zellkern lokalisiert, werden die eGFP gekoppelten WT-MSOR, WT-1 (B) , -2 (C) bzw. -3 (D) allesamt an die Plasmamembran rekrutiert. Dort kolokalisieren sie ebenso wie in der Peripherie des Zellkerns mit dsRed1-H-Ras(G12V). Balken 10µm

In einer nächsten Versuchsreihe wurde nun die Spezifität der Ras/WT-3 Interaktion untersucht. Zu diesem Zweck wurden DsRed1 Fusionen mit K-Ras4B(G12V), H-Ras(G12V/D38A); H-Ras(G12V,C186S), H-Ras(G12V,C181S,C184S), H-Ras(S17N), M-Ras(Q71L) und TC21(Q72L) hergestellt. Hierfür wurden die kodierenden Bereiche dieser Ras-Varianten nach dem gleichen Prinzip wie *H-ras(G12V)* in pDsRed1 kloniert. Abbildung 17 zeigt zusammenfassend den erfolgreichen Einbau der entsprechenden Konstrukte in pDsRed1, die durch Spaltung mit *XhoI/HindIII* bzw. *XhoI/EcoRI* nachgewiesen werden konnten.

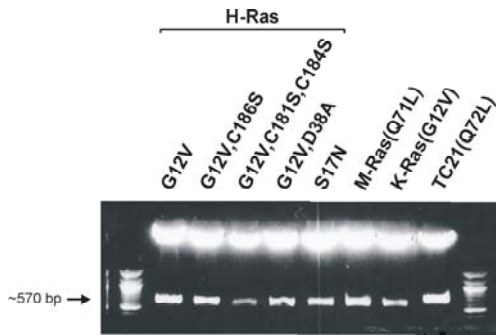


Abb. 17. **Nachweis der *ras*-Konstrukte in pDsRed1.** Die kodierenden Bereiche der verschiedenen *H-ras*-Varianten, *K-Ras4B(G12V)*, *M-ras(Q71L)* und *TC21(Q72L)* wurden mittels PCR aus dem Donorvektor amplifiziert und über *XhoI/HindIII* bzw. *XhoI/EcoRI* in den pDsRed1-C1 eingebracht. Der erfolgreiche Einbau der Konstrukte in den Vektor wurde durch Restriktion mit diesen Enzymen bestätigt.

Die verschiedenen DsRed1-Fusionen wurden jeweils mit eGFP-WT-3 in Cos-7 exprimiert und mikroskopiert (Abb. 18; siehe nächste Seite). Wie bereits für H-Ras(G12V) beobachtet, wird WT-3 auch durch die konstitutiv aktiven Varianten von K-Ras4B(G12V), M-Ras(Q71L) und TC21(Q72L) nahezu vollständig aus dem Zytoplasma an die Plasmamembran rekrutiert, wobei eGFP-WT-3 auch in diesen Ansätzen wieder partiell im Zellkern akkumuliert. Während M-Ras(Q71L) ebenso wie H-Ras(G12V) in der Peripherie der Lamellipodien in kurzen Membranabschnitten lokalisiert ist, bildet TC21(Q72L) dort einen geschlossenen Saum um die Zelle. K-Ras4B(G12V) ist ebenfalls gleichmäßig über die gesamte Zellperipherie verteilt, die hier aber durch periphere und dorsale *ruffles* auffällig gekräuselt erscheint. Insgesamt finden sich bei K-Ras4B(G12V) weniger Zellen wie sie Abb. 18 zeigt als bei H-Ras(G12V) (nicht quantifiziert). Die unterschiedlich strukturierte Plasmamembran in Gegenwart verschiedener Ras-Isoformen stimmt mit den von Choy *et al.* (1999) beschriebenen Beobachtungen überein und ist ein Indiz für die unterschiedliche Lokalisation der Konstrukte in Mikrodomänen oder für einen Ras-Isoform-spezifischen Einfluss auf die Zellmorphologie. Aufgrund der unterschiedlichen Mechanismen/Kinetiken der Translokation zur Plasmamembran ist ein Teil von H-Ras(G12V) und TC21(Q72L) im Gegensatz zu K-Ras4B(G12V) mit dem Endomembransystem assoziiert und rekrutiert folglich die Bindedomäne in diesen Bereich. Interessanterweise reichert sich M-Ras(Q72L), das wie K-Ras4B(G12V) einen Abschnitt basischer Aminosäuren im C-Terminus besitzt, im ER/Golgi Bereich an und kolokalisiert dort mit WT-3. Das die Translokation von WT-3 an die Zelloberfläche tatsächlich Ras-spezifisch und kein Artefakt ist, konnte mit farnesylierungs- (C186S) und palmitoylierungs- (C181S,C184S) defizienten H-Ras(G12V) Mutanten nachgewiesen werden. In beiden Fällen erscheint Ras nicht in der Plasmamembran. H-Ras(G12V,C186S) wird nicht prenyliert, gelangt daher nicht in das Endomembransystem und ist fast ausschließlich im Zytoplasma und interessanterweise im Nukleus lokalisiert (Abb. 18 und Chiu *et al.* (2002). Deshalb wird WT-3 in diesem Ansatz auch nicht an die Zelloberfläche rekrutiert, sondern interagiert mit der Ras-Mutante im Zytoplasma und auch im Zellkern. Die konstitutiv-aktive H-Ras-Variante C181S,C184S wird korrekt farnesyliert, aber nicht weiter zur Plasmamembran transportiert und reichert sich deswegen im Bereich des ER bzw. Golgi-Apparates an (Abb. 18). Wie bereits von Chiu *et al.* (2002) gezeigt, rekrutiert diese Ras-Mutante die GFP-RBD zum ER/Golgi-Apparat. Das ist ein Beleg dafür, dass Ras auch an Endomembranen aktiviert wird. Dementsprechend lässt sich auch die Kolokalisation von H-Ras(G12V,C181S,C184S) und WT-3 u.a. in großen und kleinen Vesikeln des Endomembransystems nachweisen (Insertion). Es gibt dort allerdings auch kleine Bereiche, in denen zwar WT-3 nicht jedoch die Ras-Mutante lokalisiert ist. Das MSOR-Konstrukt akkumuliert in diesem Ansatz wie bei H-Ras(G12V,C186S) ebenfalls im Zytoplasma und zudem in endosomen-ähnlichen Vesikeln, die aber nicht näher charakterisiert wurden. Diese Beobachtungen zeigen, dass eine Translokation der RBD an die Zelloberfläche durch membranständiges Ras vermittelt wird.

WT-3

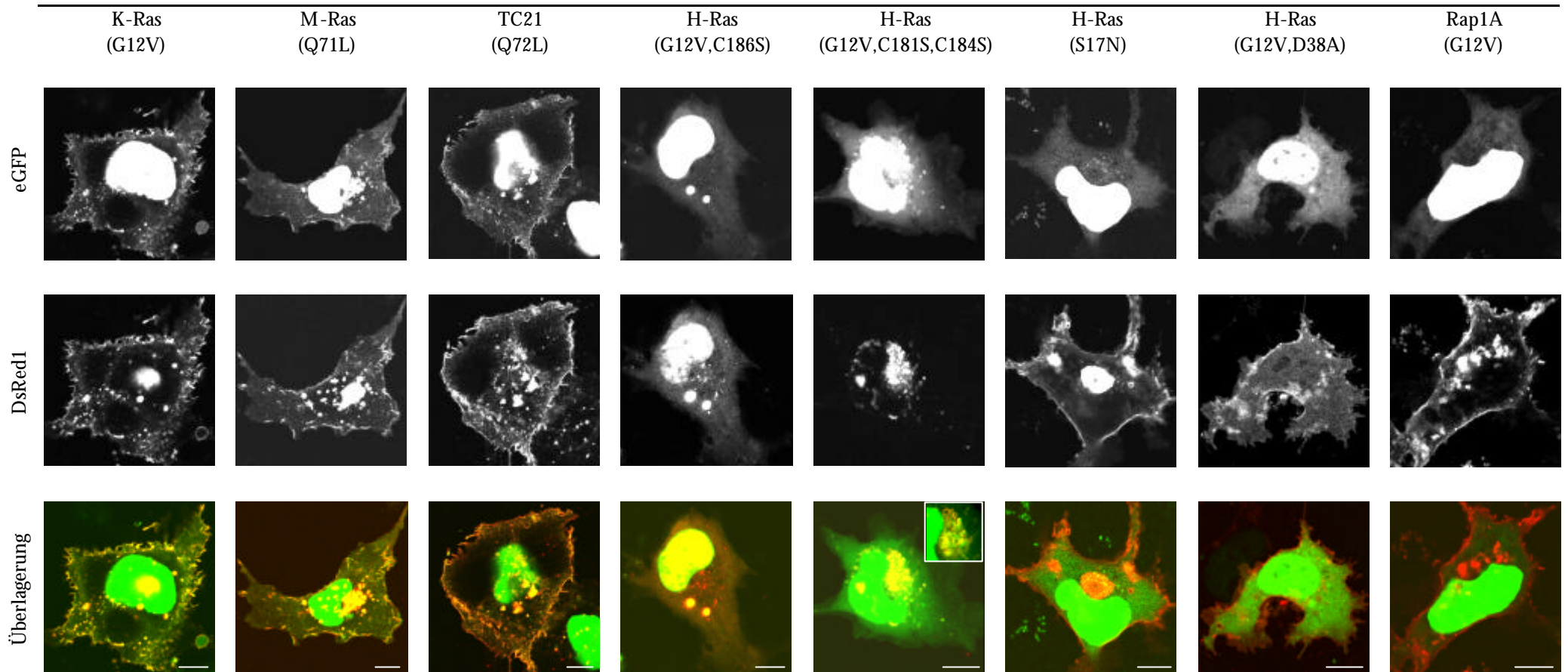


Abb. 18. **eGFP-WT-3 interagiert spezifisch mit Ras-GTP.** Cos-7 Zellen wurden mit den Vektoren für eGFP-WT-3 gemeinsam mit den angezeigten Ds-Red1-fusionierten GTPasen transient transfiziert. 48h später wurden die starvierten Zellen konfokal mikroskopiert. Die eGFP- und DsRed1-Fluoreszenzsignale sind einzeln (obere bzw. mittlere Reihe) oder übereinander gelagert (untere Reihe) wiedergegeben. Die orange-gelbe Färbung in der unteren Reihe repräsentiert Stellen der Kolokalisation von WT-3 und GTPasen. Balken 10µm.

4. Ergebnisse

ersten *MSOR*-Konstrukte (s. Abschnitt 4.1.3.1.)- mit *XhoI/EcoRI* aus pRSET herausgeschnitten und über diese beiden Schnittstellen in den pEGFP Vektor umkloniert (nicht gezeigt). In Tabelle 12 sind die Konstrukte der Doppelmutanten (*R59A,N64D*; *R59A,R67A*; *R59A,T68A*) in pRSET B und pEGFP-C2 zusammengefasst.

Tabelle 12
MSOR von R59A,N64D-; R59A,R67A- oder R59A,T68A-RBD in pRSET B und pEGFP-C2

<i>R59A,N64D-1/pRSET</i>	<i>R59A,R67A-1/pRSET</i>	<i>R59A,T68A-1/pRSET</i>
<i>R59A,N64D-2/pRSET</i>	<i>R59A,R67A-2/pRSET</i>	<i>R59A,T68A-2/pRSET</i>
<i>R59A,N64D-3/pRSET</i>	<i>R59A,R67A-3/pRSET</i>	<i>R59A,T68A-3/pRSET</i>
<i>R59A,N64D-1/pEGFP</i>	<i>R59A,R67A-1/pEGFP</i>	<i>R59A,T68A-1/pEGFP</i>
<i>R59A,N64D-2/pEGFP</i>	<i>R59A,R67A-2/pEGFP</i>	<i>R59A,T68A-2/pEGFP</i>
<i>R59A,N64D-3/pEGFP</i>	<i>R59A,R67A-3/pEGFP</i>	<i>R59A,T68A-3/pEGFP</i>

4.1.3.6. Charakterisierung der niederaffinen eGFP-MSOR Konstrukte

4.1.3.6.1. Beobachtungen zum Verhalten niederaffiner eGFP-MSOR nach Expression in Cos-7 Zellen

Nach der Klonierung dieser neuen eGFP-MSOR-Varianten wurden sie transient in Cos-7 Zellen eingebracht und wie zuvor mikroskopisch untersucht. Zellen, die mit dem Trimer der *R59A,T68A*-Doppelmutante (*R59A,T68A-3/pEGFP*) transfiziert worden sind, zeigten eine vergleichbare Morphologie wie Zellen mit den bereits vorhandenen, hochaffinen WT-, *R59A* bzw. *T68A*-Trimeren: die Zellen zeigen z.T. Anzeichen für tote Zellen (nicht gezeigt), wie auch die Akkumulation des Konstruktes im Kern, der mitunter fragmentiert oder in Vesikel partitioniert ist. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass *R59A,T68A-3* Ras Funktionen gleichsam stark wie die bereits vorhandenen trimeren MSOR inhibiert und daher als Sonde für endogenes, aktiviertes Ras ungeeignet ist.

Im Gegensatz dazu ist das Erscheinungsbild eGFP-*R59A,N64D-3* (Abb 19A) bzw. -*R59A,R67A-3* (nicht gezeigt) exprimierender Cos-7 Zellen ähnlich wie das von eGFP-WT-1. Damit sind diese die ersten beiden verfügbaren Trimere, welche die Morphologie der Cos-7 nicht so drastisch beeinflussen. In diesen Ansätzen akkumulieren die Konstrukte ebenfalls im Zellkern und in den Nukleoli, aber es gibt wie bei eGFP-WT-1 kaum Zellen mit einer Apoptose-typischen Morphologie Dies konnte auch im Annexin V-Assay (Abb. 19B) quantitativ bestätigt werden, denn weder eGFP-*R59A,N64D-1* noch -*3* exprimierende Zellen weisen eine erhöhte Zahl apoptotischer Zellen gegenüber Ansätzen mit eGFP auf. Zudem ist der Anteil an toten Zellen bei diesen Konstrukten geringer als bei WT-1 (nicht signifikant). Demzufolge blockieren *R59A,N64D-1* und -*3* Ras-initiierte Signalwege nicht so stark, dass die Zellen sterben- eventuell binden diese Konstrukte Ras aber auch gar nicht mehr. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde die Interaktion von *R59A,N64D-1* bzw. -*3* und Ras-GTP *in vitro* im Ras/GAP-Assay untersucht.

Die Einführung dominant-negativen H-Ras in Zellen demonstriert zudem, dass die RBD nur mit aktiviertem, d.h. Ras-GTP nicht jedoch mit Ras-GDP interagiert (Abb. 18). Das WT-Trimer bindet wie die Abbildung zeigt weder plasma- noch endomembranständiges H-Ras(S17N), sondern akkumuliert separat davon im Zytosol und vor allem im Kern. Das gleiche Bild ergibt sich auch mit H-Ras(G12V/D38A), das zur Aufhebung der Interaktion von Ras mit Effektorproteinen führt, und in Rap1A(G12V) exprimierenden Zellen (Abb. 18). Dabei ist bekannt, dass GTP-gebundenes Rap1A die RBD bindet, wenngleich mit einer 50x schwächeren Affinität als Ras-GTP (Herrmann *et al.*, 1996). Die eigene Beobachtung ist aber konsistent mit der von Chiu *et al.* (2002), deren GFP-RBD (entspricht GFP-WT1) gleichfalls nicht mit Rap1A(G12V) kolokalisiert und damit die Ras-spezifische Interaktion belegt. Die Bindung von WT-3 an Ras *in vivo* erfolgt also GTP-abhängig und sehr spezifisch für die Ras-Subfamilie. Allerdings lassen sich mit diesem MSOR-Konstrukt die einzelnen Ras-Isoformen (H- bzw. K-Ras4B) oder Mitglieder der Ras-Subfamilie (M-Ras, TC21) nicht getrennt voneinander betrachten, da diese nämlich alle in der Lage sind WT-3 zu rekrutieren. Außerdem akkumuliert WT-3 bei allen untersuchten Kombinationen partiell im Nukleus, was auch nicht durch einen Interaktionspartner aufgehoben (verhindert) werden kann.

Ebenso wie für das WT-3 Konstrukt wurde die Kolokalisation von eGFP-R59A-3 mit verschiedenen DsRed1-Ras-Konstrukten untersucht. Die Aufnahmen sind im Anhang (Abb. A4) dargestellt. Obwohl die Affinität der R59A-Mutante für aktives Ras gegenüber dem WT deutlich geringer ist, wird sie ebenfalls an die Stellen rekrutiert, an denen K-Ras(G12V), H-Ras(G12V) bzw. H-Ras(G12V,C186S) lokalisiert sind. Durch die Verwendung von H-Ras(G12V) mit Mutationen in der Effektorschleife (S35T, G37E und C40Y) lässt sich zudem die hohe Spezifität der MSOR nachweisen. Diese Ras-Mutanten interagieren *in vitro* und *in vivo* nur mit bestimmten Ras-Effektoren. So aktiviert die Ras-Mutante G37E RalGDS, Nore1 (Khokhlatchev *et al.*, 2002) und PLC ϵ (Cullen, 2001), während C40Y PI(3)K bindet und aktiviert (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1997). Diese beiden Ras-Mutanten sind aber nicht in der Lage Raf zu binden (Khosravi-Far *et al.*, 1996) und interagieren folglich auch nicht mit eGFP-MSOR (Abb. A4). Dagegen kolokalisiert H-Ras(G12V,S35T), das Raf-1, nicht aber PI(3)K oder RalGDS bindet und aktiviert (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1997), deutlich mit eGFP-MSOR (Abb. A4).

4.1.3.5. Konstruktion niederaffiner eGFP-MSOR-Varianten

Mit Hilfe der vorhandenen multivalenten MSOR-Konstrukte lässt sich die Interaktion mit Ras *in vivo* beobachten, allerdings nur durch Überexpression der kleinen GTPase. Aufgrund der stark blockierenden Wirkung der bisher eingesetzten MSOR ist eine Detektion der endogenen Ras-Aktivierung nicht möglich. Um dafür Sonden zu entwickeln, wurden weitere MSOR-Varianten mit geringeren Affinitäten für Ras-GTP konstruiert. Dazu wurde in den vorhandenen R59A-Hintergrund eine weitere Mutationen eingefügt. Anhand ihrer K_D -Werte wurden die Mutationen N64D ($K_D=0,25\mu\text{M}$), R67A ($K_D=0,6\mu\text{M}$) und T68A ($K_D=0,45\mu\text{M}$) ausgewählt (Nassar *et al.*, 1996). Für die R59A,N64D-Kombination beträgt der $K_D=3,8\mu\text{M}$, wonach diese RBD-Mutante Ras-GTP etwa 200x schwächer als der WT bindet (Nassar *et al.*, 1996). Durch Oligomerisierung dieser Bindedomänen sollte aber die Bindung an Ras-GTP aufrechterhalten werden. Im Folgenden wird die Einführung von N64D in *R59A-1/pRSET* mittels Mutagenese-PCR beschrieben. Die Herstellung der entsprechenden Konstrukte von *R59A,R67A* bzw. *R59A,T68A* erfolgte auf die gleiche Weise. Zunächst wurde mit N64D_fwd und dem komplementären Primer N64D_rev, die beide die N64D-Mutation enthalten, das komplette Plasmid in einer PCR Reaktion amplifiziert. Das synthetisierte, ca. 3100bp große, lineare PCR-Fragment wurde gelelektrophoretisch nachgewiesen (nicht gezeigt). Das PCR Produkt wurde anschließend mit *DpnI* geschnitten, wodurch die methylierte *template*-DNA (*R59A-1/pRSET*) gespalten wird. Nach Reinigung der DNA im Ansatz wurde diese in *E.coli* Top10F' Zellen transformiert. Aus den auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert, aufgereinigt und anschließend sequenziert. Dadurch konnten Klone identifiziert werden, bei denen die N64D-Mutation (AAC \rightarrow GAC) erfolgreich eingeführt wurde. Einer dieser positiven Klone *R59A,N64D-1/pRSET* diente als Ausgangspunkt für die Konstruktion der entsprechenden Di- und Trimere, die analog den *WT-MSOR* hergestellt wurden (s. Abschnitt 4.1.1.). Für die Verwendung als Ras gerichtete fluoreszenzmarkierte Proben wurden die *MSOR*-Doppelmutanten (Mono,- Di- und Trimere)- genau wie die

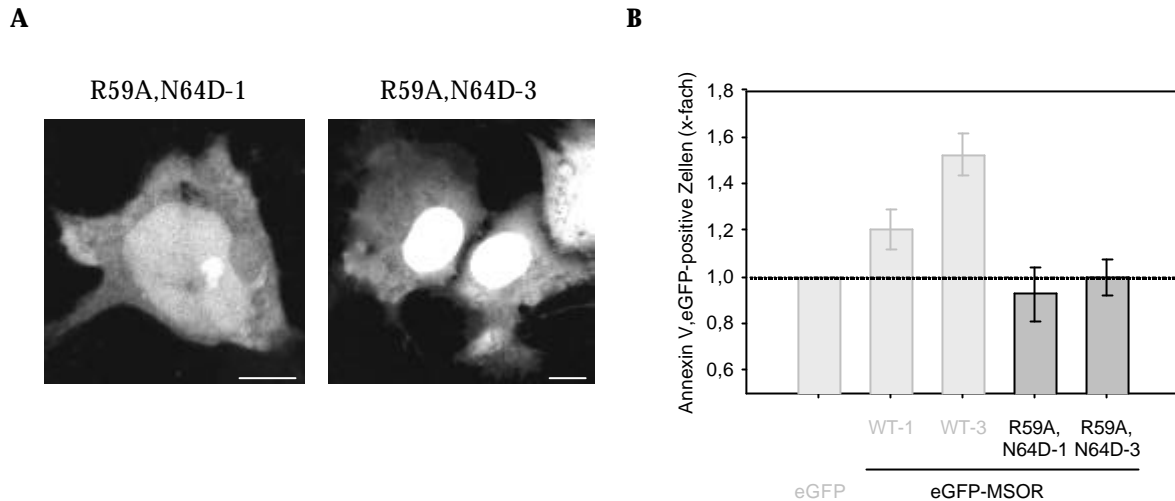


Abb. 19. **Auswirkungen der R59A,N64D Doppelmutante auf Morphologie und Überleben von Cos-7 Zellen.** Cos-7 Zellen wurden transient mit den Konstrukten für eGFP-R59A,N64D-1 oder -3 transfiziert und nach 48h unter dem Konfokalmikroskop analysiert. Balken 10µm (A). Mit dem Annexin V-Assay lässt sich 48h nach Transfektion in Cos-7 weder für eGFP-R59A,N64D-1 noch -3 ein erhöhter Anteil toter Zellen gegenüber eGFP nachweisen. Die Proben von eGFP, eGFP-WT-1 bzw. -3 sind zum Vergleich als hellgraue Balken eingefügt (B).

4.1.3.6.2. Charakterisierung der Interaktion niederaffiner MSOR und Ras-GTP *in vitro* und *in vivo*

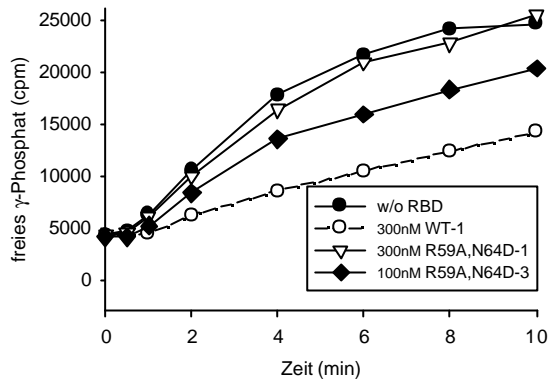
Die R59A,N64D-1 bzw. -3 wurden wie die anderen Konstrukte als rekombinante His-Konstrukte exprimiert, wie Abschnitt 3.2.8.3. beschrieben aufgereinigt und im Ras/GAP-Assay (Abschnitt 3.2.8.4.) analysiert. Zunächst wurden die Bindungseigenschaften von R59A,N64D-1 und -3 im Vergleich zu WT-1 untersucht (Abb. 20A (i)). Der Kurve für R59A,N64D-1 entspricht dem der Kontrolle, d.h. dieses Konstrukt nimmt keinen Einfluss auf die NF-1 katalysierte GTP-Hydrolyse und bindet also tatsächlich nicht mehr Ras-GTP. Im Gegensatz dazu blockiert R59A,N64D-3 den Zutritt von NF-1 wie der flachere Kurvenverlauf gegenüber der Kontrolle zeigt, wenn auch nicht so stark wie WT-1. Die Einführung von N64D in das R59A-Monomer hebt die Interaktion mit Ras-GTP komplett auf, was in der ca. 200-fach geringeren Affinität gegenüber dem WT begründet ist. Durch Oligomerisierung (Trimer) dieser Bindedomänen (R59A,N64D-3) wird die Bindung an Ras-GTP wiederhergestellt.

In einem weiteren Versuch wurde R59A,N64D-1 und -3 gegen ein Trimer der RalGDS-Bindedomäne, (freundlicherweise von R. Pusch zur Verfügung gestellt) getestet. Im Ras/GAP-Assay zeigt der direkte Vergleich (Abb. 20A (ii)), dass die Trimere von RalGDS und R59A,N64D ungefähr die gleiche hemmende Wirkung besitzen, also in etwa gleich stark Ras-GTP binden, was in guter Übereinstimmung zu den sehr ähnlichen K_D -Werten für die H-Ras-GTP Interaktion von RalGDS (3,5µM; Vetter *et al.*, 1999) und R59A,N64D-RBD (3,8µM; Nassar *et al.*, 1996) steht.

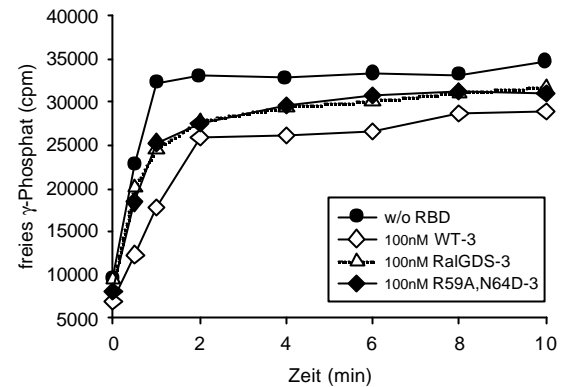
Die Bindungseigenschaften von R59A,N64D-1 und -3 *in vitro* konnten mit den entsprechenden eGFP-Fusionen durch Koexpression mit dsRed1-H-Ras(G12V) auch *in vivo* bestätigt werden. Denn dabei zeigt sich in Cos-7 Zellen, dass R59A,N64D-1 und H-Ras(G12V) separat voneinander lokalisiert sind, während R59A,N64D-3 durch H-Ras effektiv an die Plasma- und Endomembran rekrutiert wird (Abb. 20B). Ebenso wie das Trimer kolokalisiert auch das Dimer der Doppelmutante (eGFP-R59A,N64D-2) mit konstitutiv-aktivem H-Ras an der Plasmamembran und im perinukleären Bereich (nicht gezeigt). Die Untersuchungen mit niederaffinen MSOR belegen eindrucksvoll das Konzept des MSOR-Ansatzes: die deutliche Abschwächung der Affinität führt bei einem Monomer zum kompletten Verlust der Ras-Bindung *in vitro* und *in vivo*. Diese wird jedoch durch Verknüpfung dieser niederaffinen RBD kompensiert, und die Fähigkeit mit Ras zu interagieren wiederhergestellt.

4. Ergebnisse

A (i)



(ii)



B

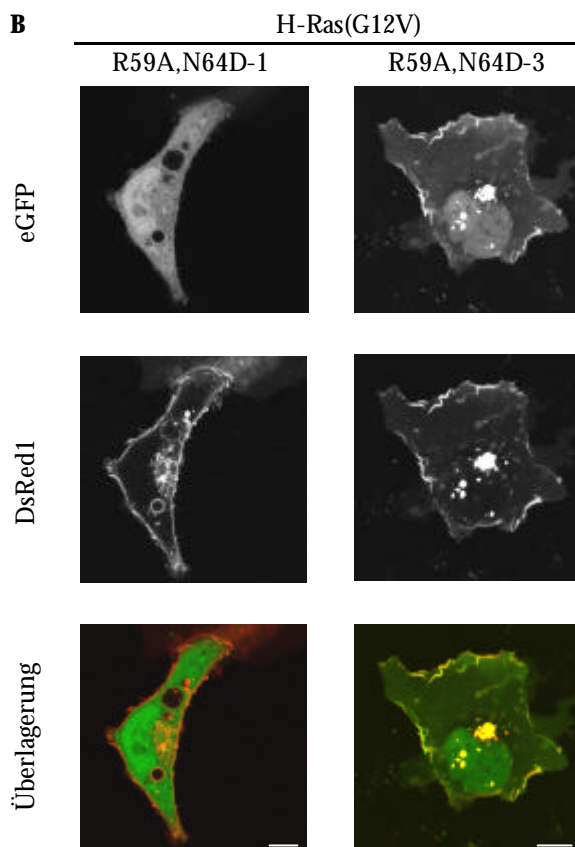


Abb. 20. **R59A,N64D-3 nicht jedoch R59A,N64D-1 bindet Ras-GTP *in vitro* und *in vivo*.** (A) Im Ras/GAP-Assay wurde die Interaktion von Ras-GTP und R59A,N64D-1 bzw. -3 (i) oder R59A,N64D-3, RalGDS-3 (ii) *in vitro* untersucht. [32 -P]GTP beladenes Ras wurde entweder mit Puffer (w/o RBD) oder den angezeigten MSOR inkubiert. Nach Start der Reaktion durch NF-1 wurde die Hydrolyse von Ras-GTP verfolgt. Die Konzentrationen der MSOR wurden so eingestellt, dass in jedem Ansatz die gleiche Konzentration an Bindungswerten vorlag. (B) Cos-7 Zellen wurden transient mit DsRed1-H-Ras(G12V) und eGFP-R59A,N64D-1 (links) oder -3 (rechts) transfiziert und nach 48h inklusive 24h Starvation unter dem Konfokalmikroskop analysiert. eGFP (obere Reihe) und DsRed1- (mittlere Reihe) ergeben bei Kollaboration eine gelb-orange Färbung in der Überlagerung (untere Reihe). Balken 10 μ m.

4.1.3.6.3. Beobachtungen bei Koexpression niederaffiner eGFP-MSOR und dsRed1-Ras-Konstrukte

Um die Spezifität der Wechselwirkung zwischen R59A,N64D-3 und Ras *in vivo* genauer zu charakterisieren, wurde das eGFP-fusionierte Konstrukt, wie zuvor WT-3 (s. Abschnitt 4.1.3.4.), mit verschiedenen dsRed1-Ras/Rap Konstrukten in Cos-7 Zellen transient transfiziert und 48h später mikroskopiert. Dabei verhält sich eGFP-R59A,N64D-3 trotz einer gegenüber dem WT-3 stark herabgesetzten Affinität für Ras-GTP wie das hochaffine MSOR (Abb. 21, siehe S. 78): die Interaktion der Doppelmutterte erfolgt *in vivo* nur mit aktivierten, d.h. GTP-beladenen Ras-Isoformen und R-Ras Mitgliedern (K-Ras4B; M-Ras, TC21). Die Rekrutierung an die Plasmamembran ist ebenfalls Ras getrieben wie die Untersuchungen mit den Ras-Mutanten G12V,C186S bzw. G12V,C181S,C184S zeigen. Diese Varianten werden nicht korrekt prozessiert und deshalb nicht in die Plasmamembran eingebaut werden.

4. Ergebnisse

Folglich findet auch keine Translokation der RBD an die Zelloberfläche statt, wohl aber eine Ko-lokalisierung im Zytosol bzw. Endomembransystem. GDP-gebundenes H-Ras, H-Ras(S17N), wird ebenso wenig von eGFP-R59A,N64D-3 detektiert, wie Rap1A(G12V) oder H-Ras(G12V/D38A), das die Fähigkeit verloren hat Effektoren zu binden.

Außerdem lässt sich auch für R59A,N64D-3 eine Anreicherung der Bindedomänen im Nukleus beobachten. Interessanterweise akkumuliert dieses MSOR aber sehr differenziert in den Nukleoli (Abb. 22A). Die Anreicherung des Konstruktes in den Nukleoli (Pfeil) wurde nämlich vor allem dann beobachtet, wenn eGFP-R59A,N64D-3 allein oder zusammen mit bindungsdefizienten Ras-Varianten wie H-Ras(S17N), H-Ras(G12V/D38A) oder Rap1A(G12V) überexprimiert wurde (in ca. 85% der analysierten Zellen). Nach Kotransfektion dieses MSOR-Konstruktes mit bindungsfähigen Ras-Varianten (z.B. TC21(Q72L)) trat die Akkumulation in den Nukleoli nur bei wenigen Zellen (ca. 15%) auf. Die sichtbare Akkumulation von eGFP-R59A,N64D-3 in den Nukleoli lässt sich also durch zusätzliche Bindungspartner aufheben. Im Gegensatz dazu akkumulieren die hochaffinen MSOR wie eGFP-WT-3 (Abb. 22B) oder eGFP-R59A-3 unabhängig von einem Interaktionspartner wie TC21(Q72L) in den Nukleoli (Pfeil) von ca. 85% der analysierten Zellen. Der Hintergrund dieser Beobachtung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher charakterisiert.

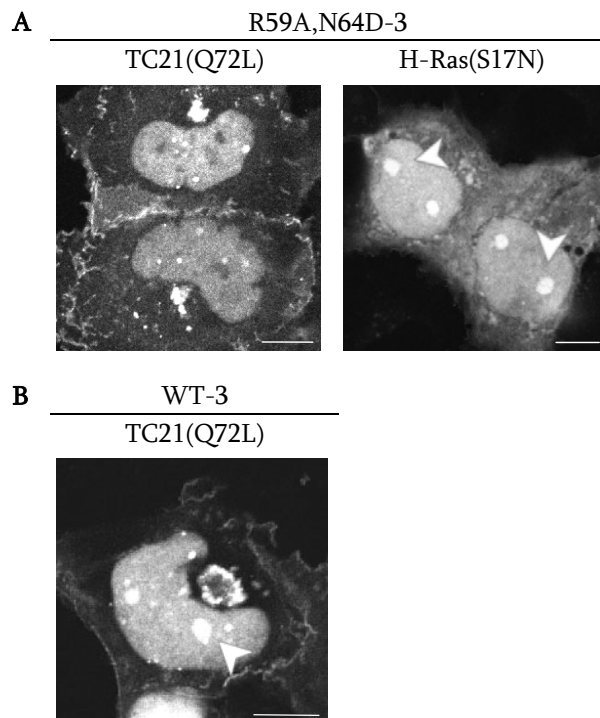


Abb. 22. **Verteilung der eGFP-MSOR in den Nukleoli.** Cos-7 Zellen, die eGFP-WT-3 bzw. eGFP-R59A,N64D-3 allein oder gemeinsam mit verschiedenen Ras-Konstrukten exprimieren, zeigen eine deutliche Akkumulation der Konstrukte im Nukleus. **(A)** eGFP-R59A,N64D-3 reichert sich im Kern an, in Gegenwart eines Interaktionspartners (z.B. TC21(Q72L)) aber nur außerhalb der Nukleoli. Die Doppelmutante findet sich aber ebenfalls in den Nukleoli, wenn sie allein oder mit einem nicht-bindenden GTPase Konstrukt, für H-Ras(S17N) gezeigt, in den Zellen exprimiert wird. **(B)** Im Gegensatz zu eGFP-R59A,N64D-3 akkumuliert eGFP-WT-3 unabhängig von einer Bindung an Ras im Kern und den Nukleoli (Pfeil). Balken 10µm

R59A,N64D-3

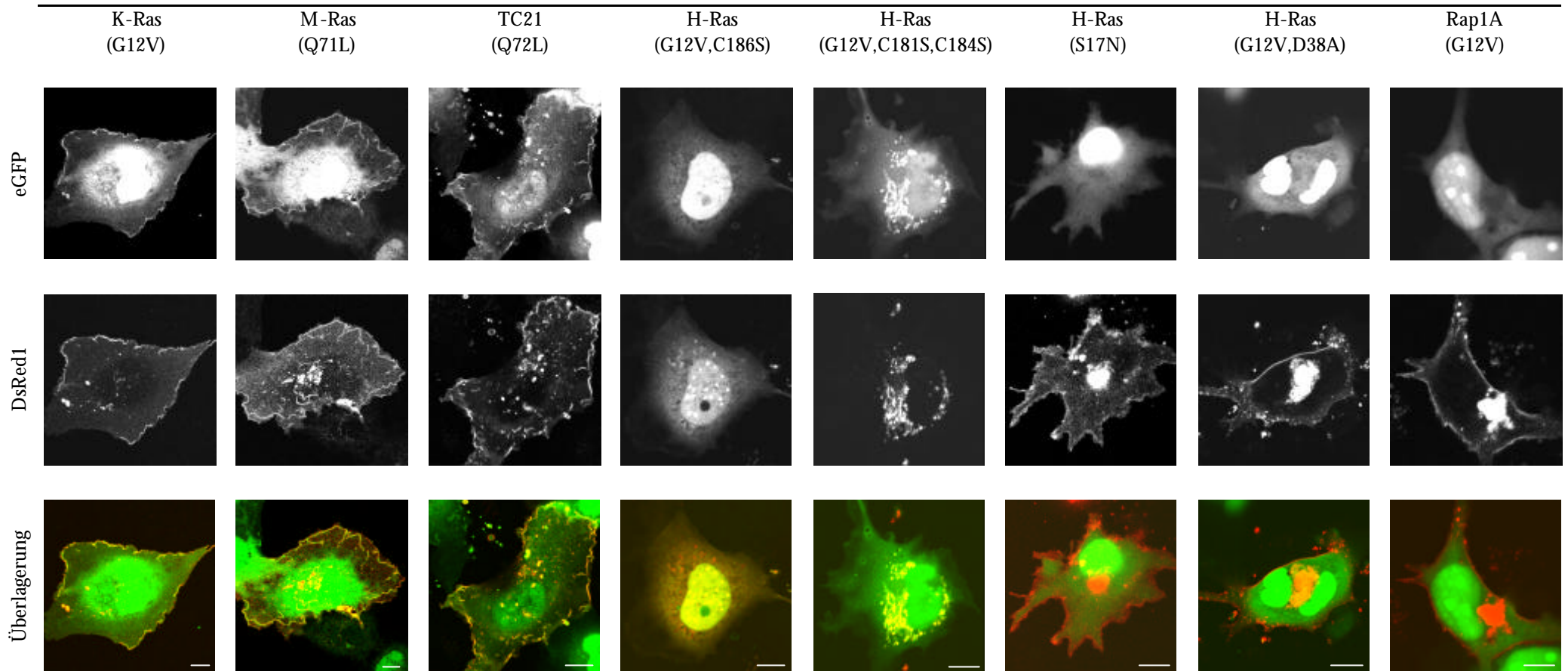


Abb. 21. **Ras-GTP rekrutiert eGFP-R59A,N64D-3.** Cos-7 Zellen wurden mit den Vektoren für eGFP-R59A,N64D-3 gemeinsam mit den angezeigten Ds-Red1-fusionierten GTPasen transient transfiziert. 48h später wurden die starvierten Zellen konfokal mikroskopiert. Die eGFP- und DsRed1-Fluoreszenzsignale sind einzeln (obere bzw. mittlere Reihe) oder in der Überlagerung (untere Reihe) dargestellt. Die orange-gelbe Färbung in der unteren Reihe resultiert aus der Kolokalisation von R59A,N64D-3 und GTPasen. Balken 10µm.

4.2. Visualisierung der Ras-Aktivierung in lebenden Zellen

Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, in welchen Bereichen der Zelle Ras *in vivo* aktiviert wird. Neuere Arbeiten postulieren die Ras-Aktivierung an Plasma- und Endomembranen (Bivona *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2002; de Castro *et al.*, 2004). Allerdings wurde dieser Modus der Aktivierung nur bei heterologer Expression von Ras beobachtet und konnte nicht für endogenes Ras bestätigt werden (Bondeva *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2001). Eventuell verursacht die Überexpression Artefakte durch eine unphysiologische Anreicherung von Ras-GTP in intrazellulären Kompartimenten und innerhalb der Plasmamembran (Jiang und Sorkin, 2002; Prior *et al.*, 2003). Deshalb ist es fraglich, ob die Ergebnisse mit überexprimiertem Ras tatsächlich auf die *in vivo* Situation übertragbar sind. Das verdeutlicht aber auch die Notwendigkeit Reporter zu entwickeln, mit denen die direkte Echtzeit-Beobachtung der *endogenen* Ras-Aktivierung in lebenden Zellen möglich ist.

4.2.1. Anwendung von eGFP-R59A,N64D-3 als Detektor der endogenen Ras-Aktivität

Aufgrund seiner Fähigkeit Ras-spezifisch zu binden, ohne dabei zytotoxisch zu wirken, könnte eGFP-R59A,N64D-3 potentiell als ein solcher Reporter der endogenen Ras Aktivierung fungieren. Um dies zu prüfen, wurden Cos-7 Zellen transient mit diesem Konstrukt transfiziert, starviert, konfokal mikroskopiert und die Veränderungen infolge der Stimulation mit 50ng/ml EGF durch Aufnahme einer Zeitserie (2 Bilder/min) verfolgt (s. Abschnitt 3.2.9.1.). In Abb. 23A sind die Einzelbilder (0; 2; 5; 15min EGF Stimulation) zweier unabhängig voneinander aufgenommener Zeitserien dargestellt. Vor der EGF Zugabe (-EGF) zeigen die Zellen eine für Cos-7 typische Morphologie mit einer gleichmäßigen Verteilung von eGFP-R59A,N64D-3 im Zytosol und einer stärkeren Anreicherung im Zellkern. In manchen Zellen ist bereits vor Stimulation eine Anreicherung des Konstruktes an diskreten Stellen der Plasmamembran sichtbar-wahrscheinlich aufgrund der Basalaktivität der GTPase. Bereits 1min nach Stimulationsbeginn wird eine Rekrutierung von eGFP-R59A,N64D-3 an die distinkte Bereiche der Membran sichtbar, indem kurze, wellenförmige Abschnitte hervortreten (Pfeilspitze), was auf die Aktivierung von *endogenem* Ras hindeutet. Cos-7 Zellen reagieren auf EGF-Stimulation mit zwei unterschiedlichen morphologischen Änderungen: der Ausstülpung von Lamellipodien und *membrane ruffling* (Takaya *et al.*, 2004). Diese phänotypischen Änderungen konnten auch in diesen Untersuchungen beobachtet werden. So bilden sich nach der Stimulation Lamellipodien-artige Strukturen aus, die in sich kollabieren und an anderer Stelle erneut ausformen. In deren Peripherie entsteht ebenfalls endogenes Ras-GTP, wie die Translokation des Reporters zeigt. Selbiges trifft auch für *ruffles* zu (Pfeilspitzen), die infolge der EGF-Stimulation als kurze, distinkte, falten-ähnliche Strukturen hervortreten, sich innerhalb von ca. 5-10min in Richtung des Zellkörpers bewegen zurückschieben und wieder auflösen (Abb. 23B). Die Detektion der Ras-Aktivierung in Lamellipodien und *ruffles* ist in guter Übereinstimmung zu anderen Studien (Bondeva *et al.*, 2002; Hibino *et al.*, 2003; Jiang und Sorkin, 2002; Mochizuki *et al.*, 2001). Im Verlauf der Stimulation fällt vor allem auch die Dynamik im Aktivierungsmuster auf, denn die Aktivierung von Ras erfolgt zum einen an den gleichen Stellen wie zu Beginn aber auch an neuen Stellen (vergleiche 2min, 5min und 15min EGF in Abb. 23A). Die Ras-Aktivierung lässt sich analog zu Mochizuki *et al.* (2001) vorwiegend an freien Enden der Zellen, aber auch an Zell-Zell-Kontakten beobachten. Es wurde aber in keinem derartigen Experimente-über den gesamten Beobachtungszeitraum (bis ca. 45min)- eine Rekrutierung von eGFP-R59A,N64D-3 an perinukleäre Abschnitte (insbesondere den Golgi-Apparat) infolge der EGF-Stimulation beobachtet (Abb. A5). Damit stehen diese Daten in starkem Gegensatz zu denen von Chiu *et al.* (2002), die auch in Cos Zellen eine Aktivierung von endogenem Ras am Golgi-Apparat nach ca. 10-40min EGF-Stimulation postulieren. In der gleichen Weise wie zuvor wurde auch die Aktivierung des endogenen Ras auch in EGF-stimulierten HeLa Zellen verfolgt (Abb. 23C). Vor der Stimulation ist eGFP-N64D/R59A-3 nahezu gleichmäßig im Zytosol verteilt. Wie in Cos-7 Zellen lässt sich nach EGF Zugabe eine rasche Rekrutierung des Reporters an die Plasmamembran (nach ca. 1min) beobachten. Entsprechend der durch Ras-GTP hervorgerufenen Umverteilung von eGFP-N64D/R59A-3 aus dem Zytosol an die Plasmamembran, erscheint das an die Plasmamembran angrenzende Zytosol nach Stimulation aufgeklärt (als Stern markiert), während diskrete

4. Ergebnisse

Stellen der Plasmamembran (Pfeilspitze) verstärkt fluoreszieren. Interessanterweise erfolgt die Aktivierung von Ras bei HeLa Zellen in einer großen Zahl punktueller und weniger in wellenartigen Strukturen wie bei Cos-7 Zellen.

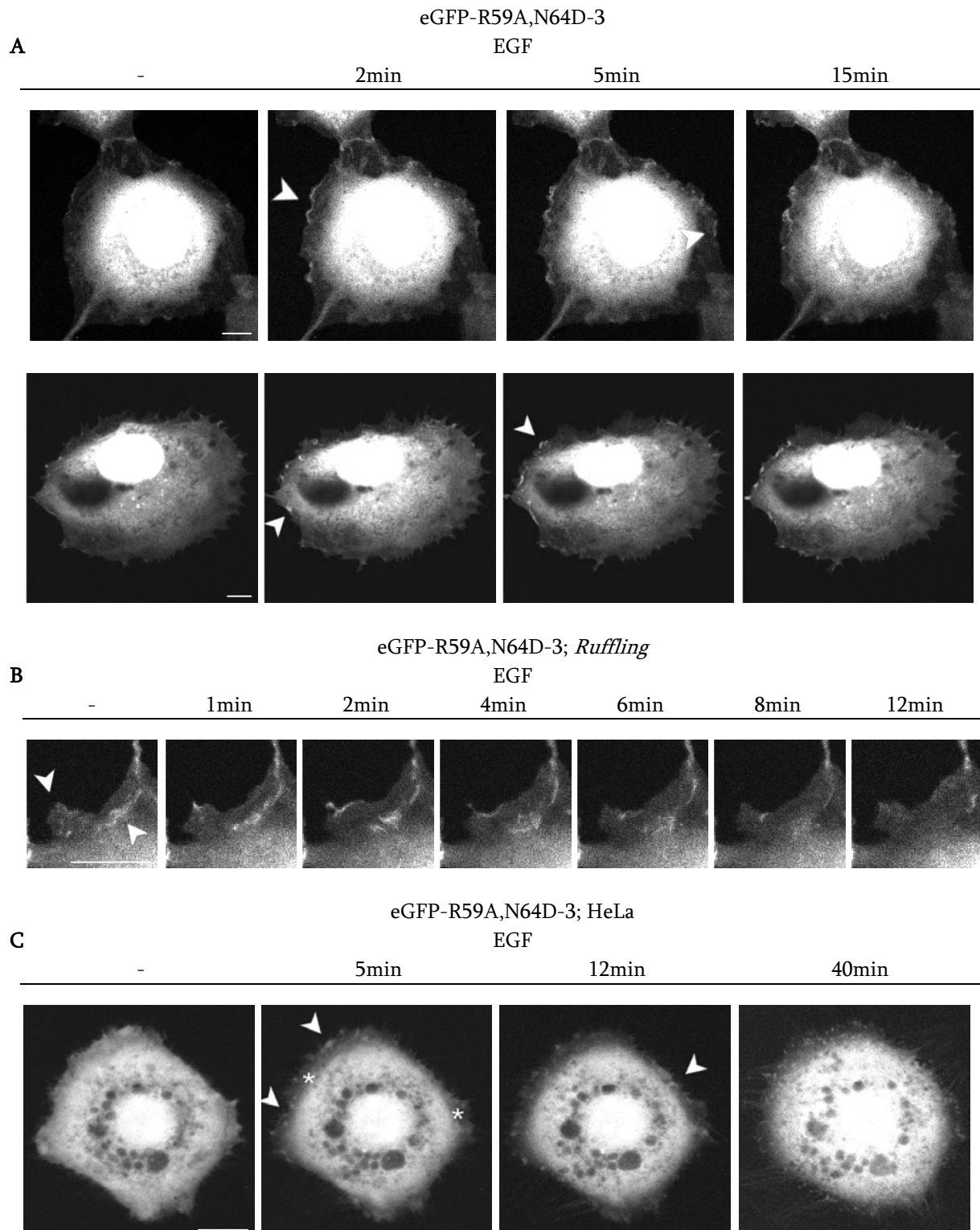


Abb. 23. **Visualisierung von endogenem Ras nach EGF-Stimulation in Echtzeit.** Cos-7 (A,B) bzw. HeLa Zellen (C) wurden mit pEGFP/*R59A,N64D-3* transfiziert und 48h später, starviert konfokal mikroskopiert. Nach Stimulation mit 50ng/ml EGF wurde in einer Bilderserie der immer gleiche konfokale Schnitte aufgenommen. Die Rekrutierung von eGFP-R59A,N64D-3 an Abschnitte der Plasmamembran signalisiert Stellen der endogenen Ras-Aktivierung (ausgefüllter Pfeil). Infolge der Rekrutierung des Reporters an die Plasmamembran hellt sich der zytosolische Bereich nahe der Zelloberfläche auf (Stern in C). Balken 10µm

4. Ergebnisse

Neben der Stimulation mit EGF wurde auch die Ras-Aktivierung durch TPA-Stimulation analysiert. TPA ist ein Mitogen, das über PKC (Marais *et al.*, 1998) und die Isoenzyme des GEF RasGRP (Kazanietz, 2002) ebenfalls Ras aktiviert und die Ausbildung von *ruffles* induziert (Nishiyama *et al.*, 1994). Um die Aktivierung von endogenem Ras durch TPA zu verfolgen, wurden Cos-7 Zellen mit dem eGFP-R59A,N64D-3 Konstrukt transfiziert, ü.N. starviert und tags darauf mit 100nM TPA stimuliert. Wie bereits für die Versuche mit EGF beschrieben, führt auch die Applikation von TPA zu einer schnellen Aktivierung des endogenen Ras, was durch die Translokation des eGFP-Konstruktes an distinkte Bereiche der Plasmamembran sichtbar wird (Abb. 24). Durch TPA wird Ras in *ruffles* und punktuellen Strukturen (Pfeil) aktiviert, eine Rekrutierung an das Endomembransystem im Zuge der Stimulation (bis 40min, nicht gezeigt) wurde aber auch hier nicht beobachtet. Die observierte Kondensation des Zellkörpers ist auch eine typische Reaktion TPA-stimulierter Zellen.

Diese Untersuchungen demonstrieren, dass sich eGFP-N64D/R59A-3 als Reporter zur Aufzeichnung der endogenen Ras Aktivierung in Echtzeit eignet. Die Ras-Aktivierung erfolgt exklusiv an diskreten Stellen der Plasmamembran, überträgt sich aber nicht wie postuliert (Bivona *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2002) auf das Endomembransystem. Das Aktivierungsmuster von endogenem Ras durch verschiedene Stimuli (TPA, EGF) ist ähnlich, variiert jedoch abhängig vom untersuchten Zelltyp (Cos-7, HeLa).

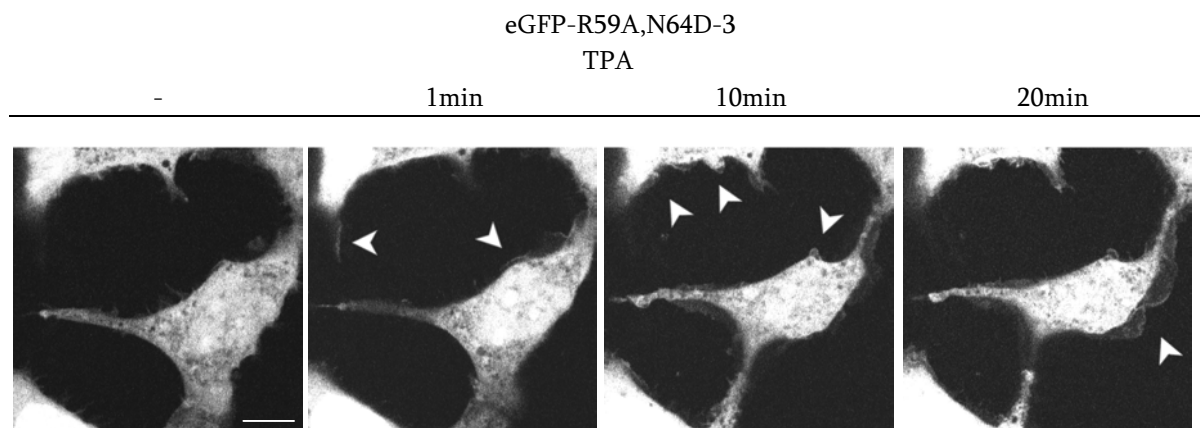


Abb. 24. **Visualisierung des endogenen Ras in Echtzeit nach TPA-Stimulation mit eGFP-R59A,N64D-3 als Reporter.** Cos-7 Zellen wurden mit dem eGFP-R59A,N64D-3 Konstrukt transfiziert und 48h später konfokal mikroskopiert. Die Aktivierung endogenen Ras (ausgefüllter Pfeil) nach Stimulation mit 100nM TPA wurde in einer Bilderserie des immer gleichen konfokalen Schnittes aufgenommen und wird durch die Rekrutierung von eGFP-R59A,N64D-3 an diskreten Stellen der Plasmamembran sichtbar. Balken 10µm

4.2.2. Untersuchungen zur Spezifität des Reporters eGFP-R59A,N64D-3

Bislang konnte die stimulations-abhängige Translokation des Reporters zu definierten Bereichen der Plasmamembran nachgewiesen werden. Nun wurde geprüft, ob dieser Effekt spezifisch auf einer Rekrutierung an aktiviertes Ras beruht. Zunächst wurde das Verhalten von eGFP-R59A,N64D-3 in Gegenwart von dsRed1-H-Ras nach EGF-Stimulation analysiert. Dazu wurden Cos-7 Zellen mit beiden Konstrukten transient transfiziert und ü.N. starviert. Die Zellen wurden mit 50ng/ml EGF stimuliert und wie oben unter dem Konfokalmikroskop observiert. In Abb. 25A sind die Fluoreszenzaufnahmen vor (-EGF) und ca.15min nach EGF Zugabe (+EGF) von eGFP-R59A,N64D-3 (links), dsRed1-H-Ras (Mitte) und deren Überlagerung (rechts) dargestellt. Vor Stimulation (-EGF) dekoriert Ras (rot) die gesamte Plasmamembran in den beiden kotransfizierten Zellen, während die Bindedomäne separat von Ras im Zytoplasma lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu kolokalisieren dsRed1-H-Ras und eGFP-R59A,N64D-3 bereits vor EGF Zugabe perinukleär und auch während der Stimulationsphase (+EGF) lassen sich in diesem Bereich keine Veränderungen feststellen. Dies weicht wiederum von bereits postulierten Daten ab Chiu *et al.* (2002). Es kommt aber in der Peripherie der Zellen, u.a. in Lamellipodien und *ruffles* zu einer EGF-abhängigen

Aktivierung von Ras. Denn nach Stimulation der Zellen wird der im Zytoplasma lokalisierte Reporter nahezu vollständig an die Plasmamembran rekrutiert. Dies wird durch die Änderung der Fluoreszenzintensität von Zytosol bzw. Plasmamembran (vergleiche - vs. +EGF in den linken Bildern) und die Kollokalisierung von Ras und eGFP-R59A,N64D-3 (gelb/orange gefärbte Plasmamembran im rechten Bild) an der Plasmamembran belegt. Hierbei markiert die Sonde fast die komplette Plasmamembran der Zellen, was in guter Übereinstimmung mit der Verteilung von DsRed1-H-Ras ist. Die Translokation des Reporters in die Zellperipherie beginnt bereits ungefähr 30s nach EGF-Zugabe und erfolgt innerhalb von 4min fast vollständig, wie die Zeiterie des GFP-Fluoreszenzkanals (eGFP-R59A,N64D-3) dokumentiert (Abb 25B), und bleibt interessanterweise über den gesamten Beobachtungszeitraum von ca. 1h stabil (nicht gezeigt). Die offenen Pfeile in den Einzelbildern markieren Stellen, an denen eGFP-R59A,N64D-3 an die Plasmamembran rekrutiert wird. Derartige Veränderungen im Bereich der Zelloberfläche sind auch bei der nur eGFP-R59A,N64D-3 exprimierenden Zelle (Abb 25B; oben links) im Zeitverlauf der Stimulation zu beobachten, was die Aktivierung von *endogenem* Ras signalisiert (ausgefüllter Pfeil). Bei dieser Zelle kommt es ebenfalls zu einer partiellen Anreicherung von eGFP-R59A,N64D-3 an der Plasmamembran, die ca. 1,5min nach EGF Zugabe deutlich wird und im Folgenden in sehr dynamischen wellenartigen Bewegungen Ausstülpungen der Membran (Lamellipodien) verläuft. Die Aktivierung des heterolog exprimierten Ras an der Plasmamembran von Cos-7 Zellen nach Stimulation lässt sich anhand der Rekrutierung von eGFP-R59A,N64D-3 direkt nachweisen. Umgekehrt belegt dieser Versuch die Ras-GTP-spezifische Translokation des Reporters in die Zellperipherie. Demgegenüber ist dsRed1-H-Ras aber unabhängig von einem Stimulus mit dem Endomembransystem assoziiert und dort aktiviert, wie die Kollokalisierung mit eGFP-R59A,N64D-3 zeigt (Abb 25). Dies lässt sich auch vor und nach Stimulation mit EGF in Cos-7 Zellen beobachten, die eGFP-R59A,N64D-3 zusammen mit der palmitoylierungsdefizienten dsRed1-Ras Mutante, H-Ras(C181S,C184S), exprimieren (Abb. A6).

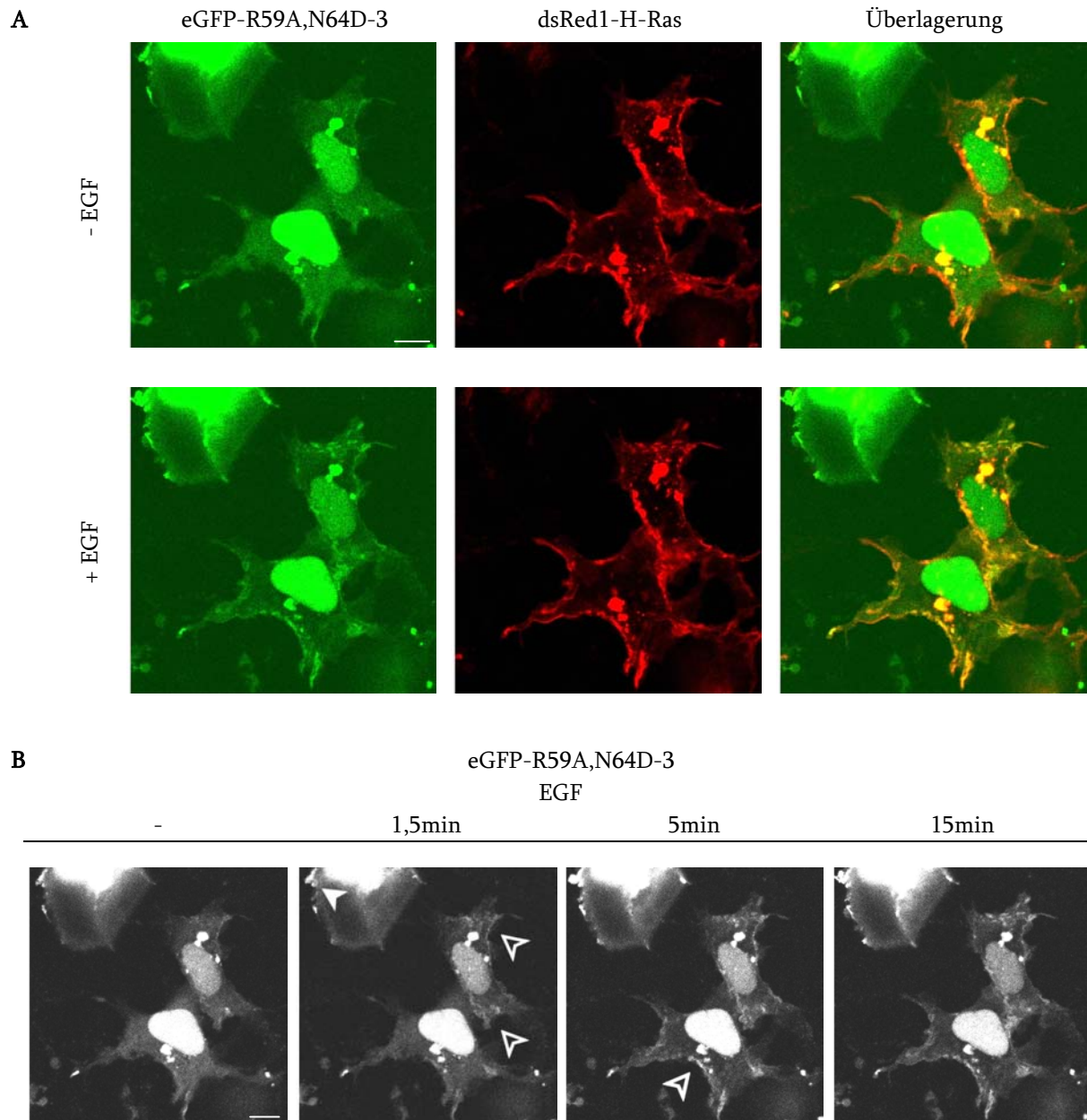


Abb. 25. **Visualisierung der Rekrutierung von eGFP-R59A,N64D-3 durch DsRed1-H-Ras nach EGF-Stimulation in Cos-7 Zellen.** (A) eGFP-R59A,N64D-3 und DsRed1-H-Ras exprimierende Cos-7 Zellen wurden zunächst starviert (-EGF) und anschließend mit 50ng/ml EGF stimuliert (+EGF). Nach Stimulation mit EGF wird eGFP-R59A,N64D-3 aus dem Zytoplasma fast vollständig an die Plasmamembran umverteilt und kolokalisiert mit DsRed1-H-Ras (offener Pfeile), wobei dieser Status über den gesamten Beobachtungszeitraum erhalten bleibt. Dabei sind einzelne, repräsentative Bilder einer Zeitserie dargestellt, die den Verlauf der Translokation des Reporters wiedergeben (B). Balken 10 μ m

Um die Ras-Spezifität weiter zu untermauern, wurde der gleiche Versuch wie zuvor, unter Verwendung von dominant-negativem Ras durchgeführt. H-Ras(S17N) sequestriert GEF und verhindert dadurch die EGF-vermittelte Ras- und MAPK-Aktivierung (Matallanas *et al.*, 2003; Ueda *et al.*, 1996) nicht aber das Ras-unabhängige *membrane ruffling* (Ridley und Hall, 1992). DsRed1-H-Ras(S17N) und eGFP-R59A,N64D-3 exprimierende Cos-7 Zellen wurden nach Starvation für ca. 5h in serumfreien Medium mit EGF stimuliert (Abb. 26A und B) und wie zuvor untersucht. Hier wurde wiederum ein Bildausschnitt gewählt, in dem Zellen zu sehen sind, welche die Bindedomäne allein bzw. gemeinsam mit Ras exprimieren. In Analogie zu den vorherigen Ansätzen führt auch hier die Stimulation der Zellen mit EGF- wie die Rekrutierung von eGFP-R59A,N64D-3 zeigt- zu einer schnellen Aktivierung (ca. 1,5min) von *endogenem* Ras, insbesondere in

4. Ergebnisse

ruffles (Abb. 26A und B ausgefüllte Pfeile). Dagegen führt die Überexpression von DsRed1-H-Ras(S17N) zu einer vollständigen Blockade der EGF-vermittelten MSOR-Rekrutierung über den gesamten Beobachtungszeitraum von ca. 45min. Überraschend ist dabei, dass nicht nur die Rekrutierung des Reporters unterbleibt, sondern auch die Ausbildung von Lamellipodien und *ruffles*. Die Aktivierung von endogenem Ras (nur eGFP-R59A,N64D-3 exprimierende Zellen) in diesem Ansatz belegt, dass das zugegebene EGF die Zellen erreicht und stimuliert. Deshalb ist das Ausbleiben einer Reaktion in Zellen mit DsRed1-H-Ras(S17N) auf dessen dominant-negative Wirkung zurückzuführen und nicht auf das Fehlen des Stimulus.

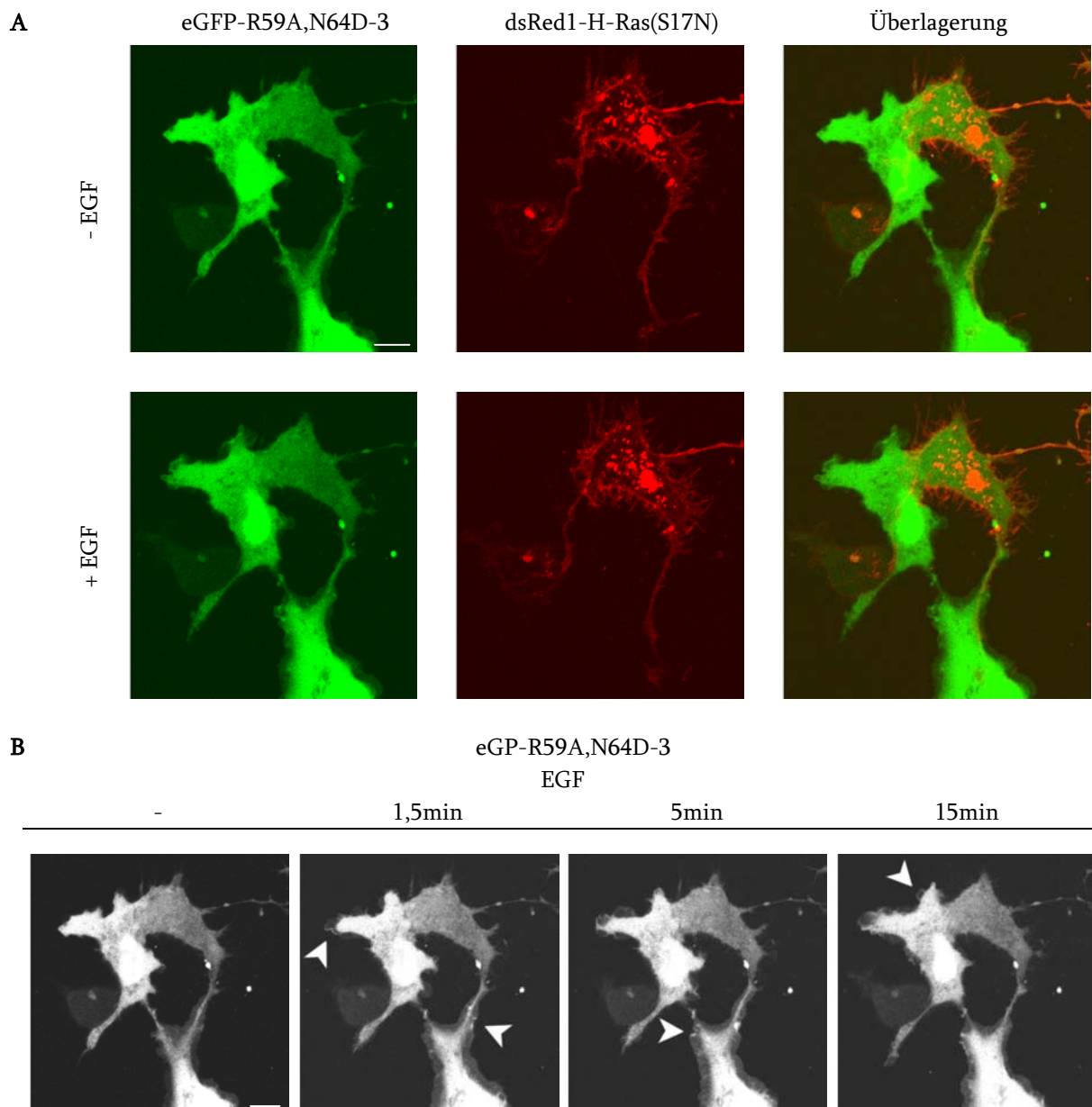
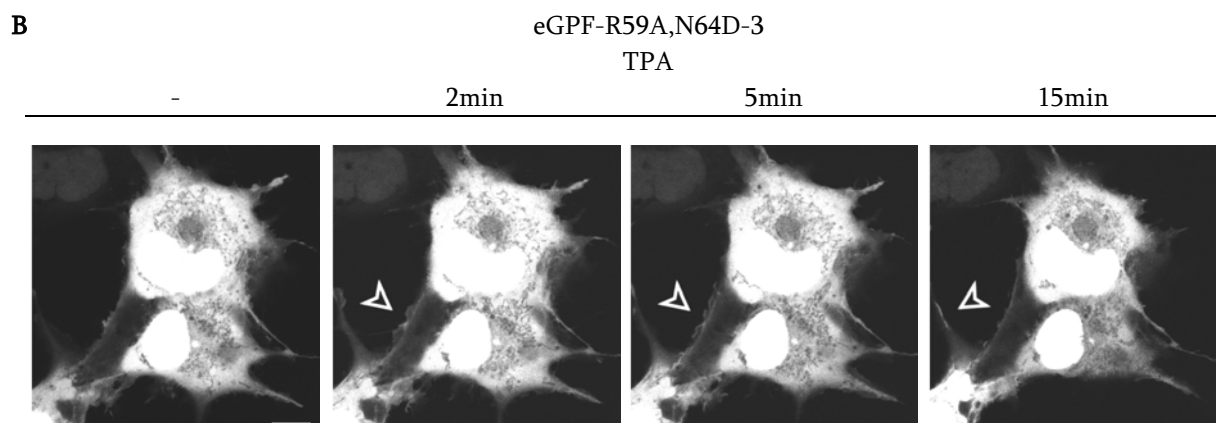
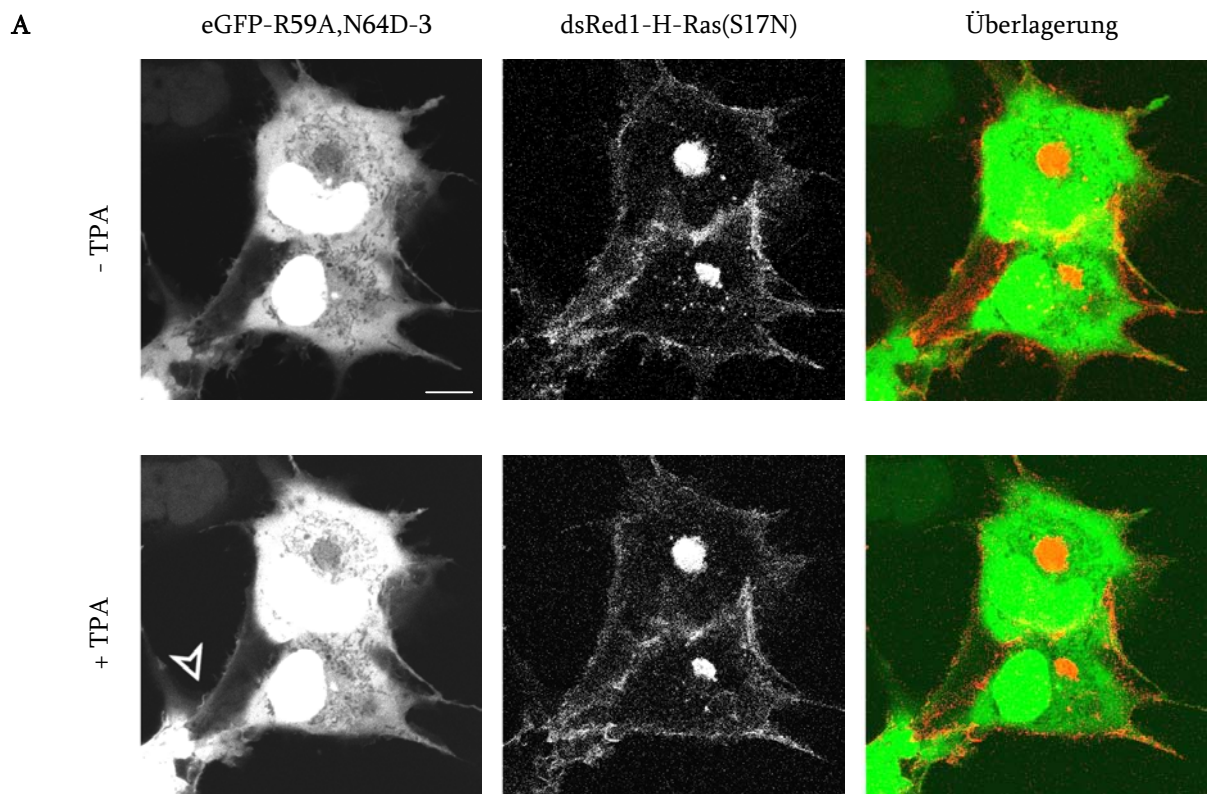


Abb. 26. **H-Ras(S17N) hemmt die Translokation von eGFP-R59A,N64D-3 in die Zellperipherie nach EGF-Stimulation.** (A) eGFP-R59A,N64D-3 und DsRed1-H-Ras(S17N) exprimierende Cos-7 Zellen wurden zunächst starviert (-EGF) und anschließend mit 50ng/ml EGF stimuliert (+EGF). In DsRed1-H-Ras(S17N) exprimierenden Zellen wird die Translokation des Reporters (eGFP-R59A,N64D-3) an die Membran unterbunden. In Zellen, die nur den Reporter exprimieren, ist die Rekrutierung desselben in die Zellperipherie aber evident. (B) Repräsentative Einzelbilder verschiedener Zeitpunkte einer aufgenommenen Zeitserie zeigen die zu beobachtenden Veränderungen im Zuge der EGF-Stimulation. Die ausgefüllten Pfeile dokumentieren Bereiche der endogenen Ras-Aktivierung in der Plasmamembran. Balken 10µm

4. Ergebnisse

Im Unterschied zu EGF ist dominant-negatives H-Ras in Cos-7 Zellen nicht in der Lage die TPA-vermittelte Raf-Aktivierung zu blockieren (Marais *et al.*, 1998). Damit bietet die Stimulation TPA eine weitere gute Kontrolle für den entwickelten Ras-Reporter. In den vorangegangenen Versuchen ließ sich die Aktivierung von endogenem Ras durch EGF und TPA, sowie die Inhibition der EGF-stimulierten Aktivierung durch H-Ras(S17N) demonstrieren. Nun wurden in Cos-7 Zellen eGFP-R59A,N64D-3 und dsRed1-H-Ras(S17N) exprimiert, die Zellen ü.N. starviert, dann mit 100nM TPA stimuliert und wie zuvor mikroskopiert. Entsprechend der bekannten Wirkung von TPA reagieren die Zellen auf diesen Stimulus mit einer Aktivierung von Ras (Translokation der Bindedomäne), die durch dominant negatives H-Ras nicht geblockt wird. Wie in Abb. 27 zu sehen ist, wird durch TPA- im Gegensatz zu EGF- weder die Ausbildung von Lamellipodien noch die Rekrutierung der eGFP-Sonde an die Plasmamembran und in *ruffles* durch DsRed1-H-Ras(S17N) unterdrückt. Der Ras-Reporter lokalisiert hier an sehr distinkten, eher punktuellen Bereichen der Membran. Auffällig und ebenfalls unterschiedlich gegenüber EGF ist wiederum das deutliche Zusammenziehen des Zellkörpers unter der Wirkung von TPA. Wie auch schon bei EGF bleibt der perinukleäre Bereich vor und nach TPA-Zugabe von eGFP-R59A,N64D-3 vollständig ausgespart, während DsRed1-H-Ras(S17N) dort akkumuliert. Dies bestätigt die für endogenes Ras gemachte Beobachtung, dass die TPA-vermittelte Ras-Aktivierung exklusiv an der Plasmamembran erfolgt.



4.3. Untersuchungen zur blockierenden Wirkung der MSOR auf Ras-vermittelte zelluläre Prozesse

Ein Vorzug des MSOR Konzeptes liegt in der Vielseitigkeit der möglichen Anwendungen. Je nach Stärke und Kinetik der Bindung an Ras-GTP, die aufgrund des modularen Aufbaus der Konstrukte definiert justierbar ist, können MSOR möglicherweise auch als Ras-spezifische Blocker eingesetzt werden. Das Ziel dieses Ansatzes ist es, die Ras-abhängige Signalübertragung so zu blockieren, dass entartete Zellen ihren transformierten Phänotyp verlieren. Um zu untersuchen, ob die hergestellten MSOR dafür geeignet sind, wurden Ras- und MSOR-transformierte Zellen hinsichtlich einiger transformations-relevanter Elemente untersucht.

4.3.1. Einfluss der eGFP-MSOR auf die Ras-vermittelte Aktivierung der MAPK-Kaskade

Aufgrund der bisherigen Resultate sollte sich die Expression der MSOR-Konstrukte auch auf Ras-gesteuerte Signalwege auswirken. Deswegen wurde der Einfluss verschiedener MSOR auf die Ras(G12V)-initiierte Phosphorylierung am Beispiel von ERK2/MAPK zunächst in NIH 3T3 Zellen untersucht. Die Expression der verschiedenen trimeren eGFP-Konstrukte (WT-3, R59A-3 oder R59A,N64D-3), bzw. von eGFP (Kontrolle) führt wie in Cos-7 auch in NIH 3T3 Zellen zu deutlichen morphologischen Unterschieden zwischen den einzelnen Ansätzen. Während eGFP in der gesamten Zelle gleichmäßig verteilt ist, akkumulieren die eGFP-MSOR mit zunehmender Affinität für Ras immer stärker im Kern (Abb. 28).

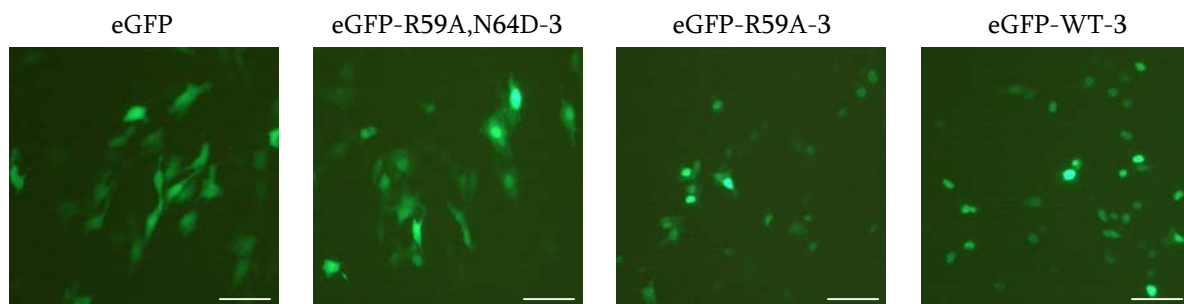


Abb. 28. **Fluoreszenzmikroskopie eGFP- oder eGFP-MSOR exprimierender NIH 3T3 Zellen.** Die Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert, ü.N. im Brutschrank inkubiert, tags darauf unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert und repräsentative Areale transfizierter Zellen der einzelnen Ansätze aufgenommen. Balken 100µm

Zunächst wurde der Einfluss der mono-, di- und trimeren eGFP-WT-, R59A- bzw. R59A,N64D-Varianten auf die ERK2-Phosphorylierung in H-Ras(G12V)-exprimierenden NIH 3T3 Zellen untersucht. Um die Ras-induzierte ERK2-Phosphorylierung aufzuzeigen, wurden diese Zellen transient mit je 1µg pEGFP und *H-ras(G12V)/peXV3* bzw. *HA-erk2/pcDNA3* einzeln oder in Kombination transfiziert. Um den Einfluss der MSOR zu testen, wurden die Zellen zusätzlich mit je 1µg der ausgewiesenen Konstrukte für die eGFP-MSOR transient transfiziert.

Abb. 27. **eGFP-R59A,N64D-3 wird nach TPA-Stimulation in Gegenwart von H-Ras(S17N) an die Plasmamembran rekrutiert.** (A) eGFP-R59A,N64D-3 und DsRed1-H-Ras(S17N) exprimierende Cos-7 Zellen wurden zunächst starviert (-TPA) und anschließend mit 100nM TPA stimuliert (+TPA). DsRed1-H-Ras(S17N) ist nicht in der Lage die TPA-vermittelte Ras-Aktivierung (Pfeile) zu blockieren, wie die Translokation von eGFP-R59A,N64D-3 im Verlauf der Stimulation dokumentiert. (B) Die Einzelbilder einer Zeitserie repräsentieren die beobachteten Veränderungen nach Stimulation der Cos-7 Zellen. Balken 10µm

4. Ergebnisse

Die transfizierten Zellen wurden für zwei Tage im Brutschrank inkubiert, dabei für 24h starviert, und danach lysiert. Anschließend wurden ca. 20µg Gesamtprotein im Gel getrennt, und der pERK2-Anteil in jedem Versuchsansatz durch Western-Blot-Analyse bestimmt (Abb. 29). Da das verwendete ERK2-Konstrukt mit einem Hämagglutinin (HA)-Epitop versehen ist, lässt es sich getrennt von den endogenen ERK-Proteinen nachweisen und fungiert als spezifischer Reporter transfizierter Zellen. Die selbe Membran wurde mit einem HA-spezifischen Antikörper zum Nachweis des gleichmäßigen Probenauftrags detektiert (Abb. 29; Mitte). Letztlich wurde mit dem anti-GFP Antikörper die gleichmäßige Expression und Stabilität der eGFP-MSOR Konstrukte in den einzelnen Ansätzen belegt (Abb. 29; unten). Wie die Abb. zeigt, führt die Expression von H-Ras(G12V) oder HA-ERK2 (Bahn 1 bzw. 2) nur zu einer schwachen Phosphorylierung des endogenen bzw. überexprimierten ERK1/2, während die Koexpression beider Konstrukte ein sehr starkes Signal liefert (Bahn 3). Die verschiedenen Varianten der eGFP-MSOR des WT, R59A und R59A,N64D interferieren genau entsprechend ihrer Affinität für Ras mit der H-Ras(G12V)-induzierten ERK2-Phosphorylierung (Bahn 4-12). Die Trimere (Bahn 6,9,12) blockieren folglich stärker als die Dimere (Bahn 5,8,11) und diese wiederum stärker als die Monomere (Bahn 4,7,10). Bei Letzteren weist, bezieht man die Expressionskontrolle (HA-Blot) ein, nur WT-1 nicht jedoch R59A-1 und R59A,N64D-1 eine blockierende Aktivität auf, was an der sehr geringen Affinität der Mutanten für Ras-GTP liegt.

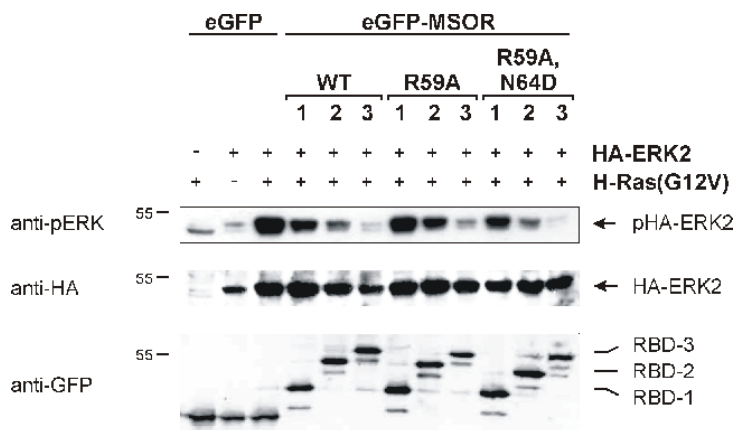


Abb. 29. **Untersuchung zur inhibierenden Wirkung der MSOR auf die H-Ras(G12V)-vermittelte ERK2-Phosphorylierung.** NIH 3T3 Zellen wurden mit den Konstrukten für H-Ras(G12V), HA-ERK2 und mono-, di- und trimeren eGFP-MSOR (WT; R59A; R59A,N64D) transient transfiziert, ü.N. starviert und 48h nach Transfektion lysiert. Das Gesamtprotein des Zell-Lysats wurde mittels SAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und pHA-ERK2; Gesamt-ERK2 sowie die eGFP-Konstrukte nacheinander im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

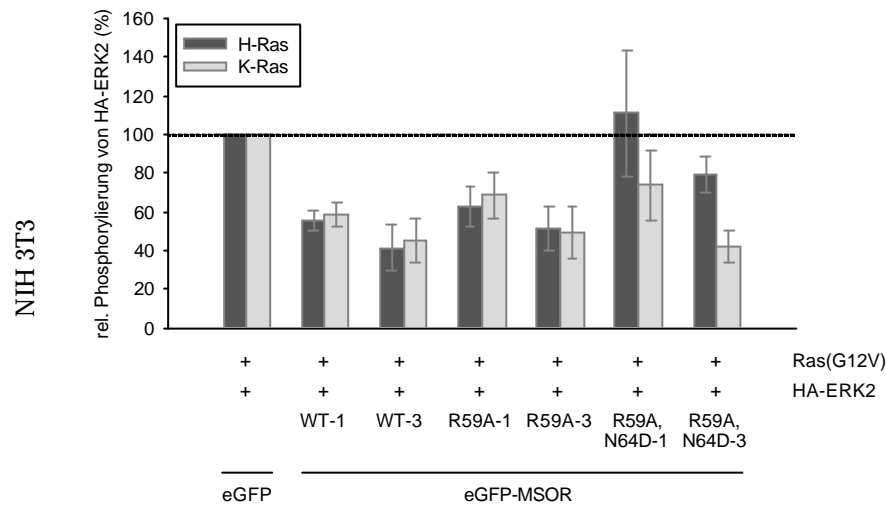
In weiteren Versuchen wurden die Auswirkungen der MSOR auf die H-Ras(G12V) und K-Ras4B(G12V) vermittelte HA-ERK2-Phosphorylierung untersucht. Für diese Experimente wurden nur die monomeren und trimeren MSOR-Varianten verwendet, da die Unterschiede bezüglich der Blockierung zwischen diesen Konstrukten am deutlichsten hervortreten. Diese Versuche wurden dreimal, und ebenfalls mit Cos-7 und NIH 3T3 Zellen durchgeführt. In Abb. A7 sind die Ergebnisse der Western-Blots für jeweils einen Versuch in NIH 3T3 und in Cos-7 dargestellt. Die Expression von H- bzw. K-Ras4B(G12V) oder HA-ERK2 führt in Cos-7 wie in NIH 3T3 Zellen nur zu einer schwachen Phosphorylierung des (endogenem/exogenem) ERK1/2. Die Koexpression beider Konstrukte dagegen stimuliert die Phosphorylierung sehr stark, was durch die Präsenz der MSOR in unterschiedlichem Maße beeinflusst wird. Um diese Unterschiede auch quantitativ zu erfassen, wurden die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten erhaltenen pHA-ERK2-Signale der einzelnen Ansätze densitometrisch ausgewertet und auf die entsprechenden Werte für Gesamt-HA-ERK2 (Expressionskontrolle) abgeglichen (Abb. 30A und B). Geringe Unterschiede zwischen den individuellen Ansätzen sind auf den semi-quantitativen Charakter dieser Untersuchungsmethode und die densitometrische Analyse zurückzuführen und wurden deshalb nicht als tatsächliche, funktionelle Unterschiede betrachtet.

In Cos-7 Zellen wird die H-Ras(G12V)- und K-Ras4B(G12V)-vermittelte ERK2-Phosphorylierung durch die eingesetzten MSOR (WT, R59A) kaum blockiert. Eine Ausnahme bildet R59A,N64D: während das Monomer wie die anderen Konstrukte nicht in der Lage ist die Ras-stimulierte ERK2-Antwort zu hemmen, führt das Trimer zu einer Senkung des stimulatorischen Effekt um ca. 40% (Abb. 30B). Demgegenüber zeigt

4. Ergebnisse

sich in NIH 3T3 Zellen ein differenzierteres Bild. Sowohl Mono- und Trimer des WT als auch der Mutante R59A haben einen inhibierenden Einfluss auf die durch konstitutiv aktives Ras (H-Ras und K-Ras4B) vermittelte ERK2-Aktivierung. Dabei blockiert das Trimer (ca. 50-60%) tendenziell stärker als das entsprechende Monomer (ca. 30-40%). R59A,N64D-1 besitzt aufgrund seiner stark herabgesetzten Affinität für Ras keine inhibierende Wirkung. In Gegenwart der trimeren Doppelmutante R59A,N64D-3 zeigt sich ein unerwarteter Effekt. Offenbar ist die inhibierende Wirkung dieses Konstruktes Ras-Isoform-spezifisch. Denn während die H-Ras(G12V)-initiierte ERK2-Phosphorylierung kaum supprimiert wird, senkt R59A,N64D-3 die K-Ras4B(G12V)-initiierte ERK2-Antwort deutlich um etwa 60% (Abb. 30A).

A



B

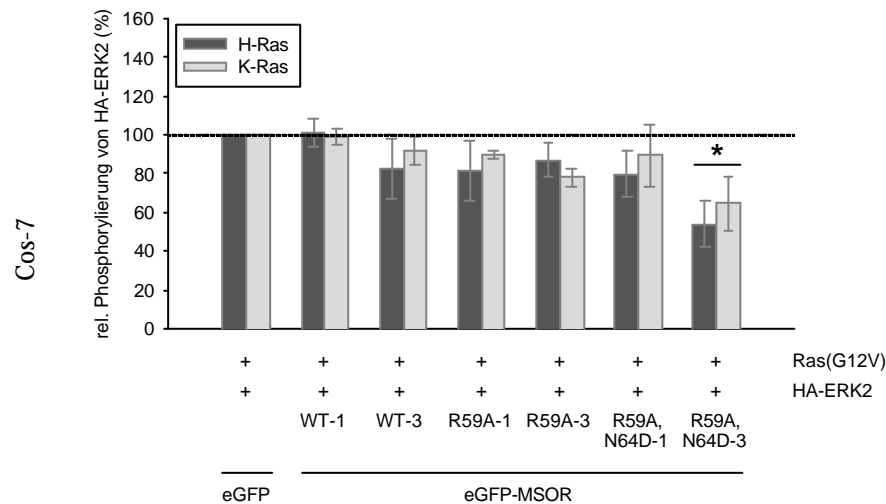


Abb. 30. MSOR wirken differenziell auf die Ras(G12V)-vermittelte ERK2-Phosphorylierung. NIH 3T3 (A) bzw. Cos-7 (B) Zellen wurden gleichermaßen zunächst mit den Konstrukten für H- oder K-Ras4B(G12V), HA-ERK2 und mono- und trimeren eGFP-MSOR (WT; R59A; R59A,N64D) transient transfiziert. 48h nach Transfektion inklusive Starvation ü.N. wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blot die pHA-ERK2 und Gesamt-HA-ERK2 Spiegel detektiert. Die pHA-ERK2-Signale der einzelnen Ansätze wurden densitometrisch ausgewertet und auf die Expressionskontrolle (HA-ERK2) abgeglichen. (* $P < 0,05$; signifikant gegenüber Ras(G12V)/HA-ERK2/eGFP)

4.3.2. Einfluss der eGFP-MSOR auf die Ras-getriebene Genexpression

4.3.2.1. Reporter-gen-Analyse der *MMP1*-Genexpression

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die MSOR-Konstrukte mit Ras-initiierten Signalwegen interferieren, stellte sich die Frage, ob diese Konstrukte auch die Expression von Ras-responsiven Zielgenen beeinflussen. Es ist bekannt, dass aktiviertes Ras die Transkription von u.a. *c-fos*, *MMP-1*, *MMP-3* und *MMP-9* initiiert (Hodge *et al.*, 1998; Watabe *et al.*, 1998; White *et al.*, 1997). Die Promotoren dieser Gene enthalten entweder ein *Ras-responsives Element* (RRE) oder besitzen ein RRE-ähnliches *enhancer*-Motiv. Diese Elemente werden nach Ras-Aktivierung vermutlich durch die kooperative Bindung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und Ets aktiviert (Imler *et al.*, 1988). Deshalb sollte nun untersucht werden, ob die MSOR ebenfalls inhibitorisch auf die Ras-vermittelte Aktivierung Genexpression wirken. Für diese Untersuchungen wurde ein Luciferase-gekoppelter *MMP1*-Promotor als Reporter eingesetzt. Dieser Promotor weist einen Polymorphismus auf, der als *MMP1-2G* bezeichnet wird (Rutter *et al.*, 1998). Dadurch entsteht eine Konsensus Sequenz (5'-GGA-3') für die Bindung der Ets-Transkriptionsfaktoren, die u.a. durch die Ras/MAPK Kaskade angesteuert werden.

Im Versuch wurden NIH 3T3 Zellen transient mit dem *Renilla*-Luciferasevektor pRL-TK entweder allein oder zusammen mit dem *MMP1*-firefly-Reporterplasmid (*MMP1-2G/pGL3*), konstitutiv aktivem *H-ras(G12V)* oder *K-Ras4B(G12V)/peXV3* und verschiedenen *MSOR/pEGFP* Konstrukten transfiziert. Die *Renilla*-Luciferase wird nach Transfektion in den Zellen konstitutiv exprimiert und diente zur Standardisierung der verschiedenen Ansätze. Die Luciferaseaktivität beider Konstrukte wurde 48h nach Transfektion gemessen und das Verhältnis von *MMP1*-firefly-Luciferase zu *Renilla*-Luciferase ermittelt. Wie Abb. 31 zu entnehmen ist, aktiviert eGFP allein den *MMP1*-Promotor kaum. Die Koexpression von eGFP mit K-Ras4B(G12V) oder H-Ras(G12V) dagegen führt zu einer deutlichen Aktivierung des Promotors (100% gesetzt). Sowohl die H-Ras(G12V)- als auch die K-Ras4B(G12V)-vermittelte Stimulation des *MMP1*-Promotors wird durch das eGFP-WT-Trimer (eGFP-WT-3) um ca. 60% geblockt, überraschenderweise aber nicht durch das WT-Monomer (eGFP-WT-1). Im H-Ras(G12V) Ansatz wirken weder eGFP-R59A-3 (nicht gezeigt) noch das Trimer der Doppelmutante (eGFP-R59A,N64D-3) inhibierend auf die Aktivierung des Promotors. Im Gegensatz dazu wird die K-Ras4B(G12V)-vermittelte *MMP1*-Transkription durch das Trimer der Doppelmutante um ca. 25% blockiert. Das stellt eine Parallele zu der bereits beschriebenen differentiellen Beeinflussung der ERK2-Phosphorylierung dar (Abschnitt 4.3.1.). In NIH 3T3 Zellen zeigt nur WT-3 einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Ras-vermittelte Stimulation des *MMP1*-Promotors. Interessanterweise ist jedoch auch das Trimer der Doppelmutante in der Lage die Stimulation durch K-Ras4B(G12V) zu blockieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die entwickelten MSOR-Konstrukte auch mit der Ras-initiierten Genexpression interferieren.

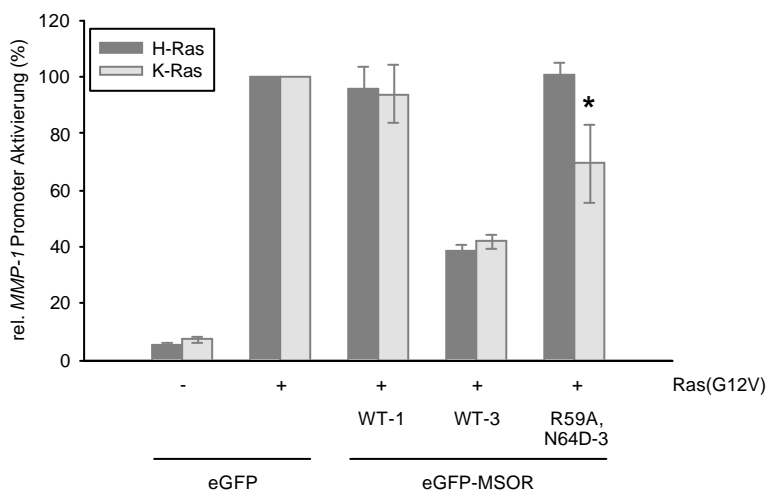


Abb. 31: **Untersuchungen zum Verhalten der eGFP-MSOR auf die Ras(G12V)-stimulierte *MMP1*-Transkription.** NIH 3T3 Zellen wurden transient mit pEGFP oder pEGFP/MSOR-Konstrukten sowie mit *H-ras(G12V)* oder *K-Ras4B(G12V)/peXV3* transfiziert. 24h später wurden zusätzlich der *MMP1*-firefly-Luciferase Reporter und das *renilla*-Luciferase-konstrukt eingebracht. 24h später wurden die Zellen lysiert und die rel. Luciferaseaktivität ermittelt. Dabei sind die Ergebnisse aus zwei unabhängig voneinander, in Duplikaten durchgeführten Experimenten eingearbeitet. (* $P < 0,05$; signifikant gegenüber K-Ras4B(G12V)/eGFP)

4.3.2.2. Expressionsprofil transformationsrelevanter Gene mittels cDNA-Array

Mit den Reportergenuntersuchungen konnte der inhibierende Effekt der MSOR, insbesondere von eGFP-WT-3, auf die Ras-vermittelte Genexpression von *MMP1* nachgewiesen werden. Deshalb sollte fortführend der Einfluss von eGFP-WT-3 auf die Transkription verschiedener anderer Proteasen und anderer Proteine, die in den Abbau der extrazellulären Matrix, der Apoptose oder der Zell-ECM-Interaktion involviert sind, mit einem cDNA-Array (siehe Material und Methoden) untersucht werden. Die Fehlregulation dieser Proteine u.a. durch Änderung der Genexpression trägt auch zur zellulären Transformation bei.

Für den Versuch wurden Cos-7 Zellen mit den Konstrukten für eGFP (Kontrolle), mit K-Ras4B(G12V) und eGFP bzw. eGFP-WT-3 transfiziert. 48h nach Transfektion wurde die RNA aus den Zellen der einzelnen Ansätze isoliert und unter Verwendung von Digoxigenin markierten Primern in cDNA umgeschrieben. Damit wurden anschließend die cDNA-Array inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Membranen gewaschen und die Signale der einzelnen Spots mit Digoxigenin spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 32A). Die Signale wurden anschließend densitometrisch erfasst und als „relative densitometrische Einheiten“ ausgewertet. Für die Auswertung und Darstellung wurden nur die cDNA von Genen berücksichtigt, die in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen die gleichen qualitativen Veränderungen aufwiesen. Als reguliert wurden nur die Gene gewertet, deren cDNA-Spiegel zwischen den Ansätzen mit K-Ras4B(G12V) und eGFP bzw. eGFP-WT-3 um mindestens den Faktor 2 variierten. Diese wenig stringente Betrachtung soll dem Umstand Rechnung tragen, dass deutlichere Unterschiede aufgrund der Transfektionseffizienz von (nur) ca. 30% nicht zu erwarten sind. Es zeigte sich, dass die Genexpression der überwiegenden Anzahl der gespotteten Gene (ca. 70%) weder durch K-Ras4B(G12V) allein noch durch die Kombination mit eGFP-WT-3 reguliert wird, d.h. es ergibt sich keine deutliche Veränderung gegenüber der eGFP-Kontrolle. Dies ist nicht unerwartet, da Ras die Transkription nur weniger Gene beeinflusst, häufig aber auf posttranskriptionelle und posttranslationale Prozesse wirkt (Coleman *et al.*, 2004; Rajasekhar *et al.*, 2003). Dennoch wurde die Transkription einiger Gene durch die Überexpression von K-Ras4B(G12V) oder K-Ras4B(G12V)/ eGFP-WT-3 reguliert. Bei manchen Genen wurde die durch konstitutiv-aktives K-Ras4B-vermittelte Erhöhung der mRNA-Spiegel durch eGFP-WT-3 partiell oder vollständig blockiert (Abb. 32B (i)). Es fällt auf, dass diese Gene der gleichen funktionellen Gruppe angehören- es handelt sich ausschließlich um Proteasen (*cathepsin L*) oder deren Regulatoren wie (*ADAM 10, 15; TACE* und *uPA*), deren Genprodukte in den Abbau der ECM involviert sind und somit bei der Transformation und Tumorigenese eine wichtige Rolle spielen (Premzl *et al.*, 2003; Tulasne *et al.*, 1999). Interessanterweise wurden einige weitere Gene durch K-Ras4B(G12V) nicht beeinflusst, die Expression zusammen mit dem WT-Trimer führte dann aber zu einer Stimulation der Transkription dieser Gene. Dazu gehören die Gene für Caspase 7,8 und 9 sowie MT1-MMP (Abb. 32B (ii)). Vor allem die deutliche Aktivierung der Caspasen- darunter sowohl Initiator- und Effektorcaspasen, die bei der Regulation der Apoptose eine zentrale Rolle spielen, stellt eine wichtige Beobachtung dar (Riedl und Shi, 2004). Offenbar ist eGFP-WT-3 auch in Gegenwart von konstitutiv-aktivem K-Ras4B in der Lage Ras nahezu vollständig zu sequestrieren, und dadurch die Transkription wichtiger Regulatoren der Apoptose in Cos-7 zu stimulieren. Möglicherweise stehen die erhöhten mRNA-Spiegel der *Caspasen* mit der im Annexin V-Assay beobachteten erhöhten Apoptoserate in eGFP-WT-3-exprimierenden Cos-7 Zellen im Zusammenhang, auch wenn Ras in diesem Ansatz nicht überexprimiert wurde. Besonders interessant ist, dass eGFP-R59A,N64D-3, das auf einem cDNA-Array mitgeführt wurde und im Annexin V-Assay keine erhöhte Apoptoserate zeigte, die Genexpression der Caspasen nicht beeinflusst (nicht gezeigt).

Die Resultate aus diesen Untersuchungen geben einen ersten Überblick über Ras/MSOR-regulierte Gene, die auch mit den Ergebnissen aus anderen Versuchen konkordant sind (z.B. Caspasen). Die mit diesem Array erhobenen Daten sollten durch Wiederholung dieser Versuche und alternative Methoden (z.B. *real-time*-PCR; Reportergen-Analyse) validiert werden. Zudem sollte deren Relevanz in u.a. anderen zellulären Systemen geprüft werden.

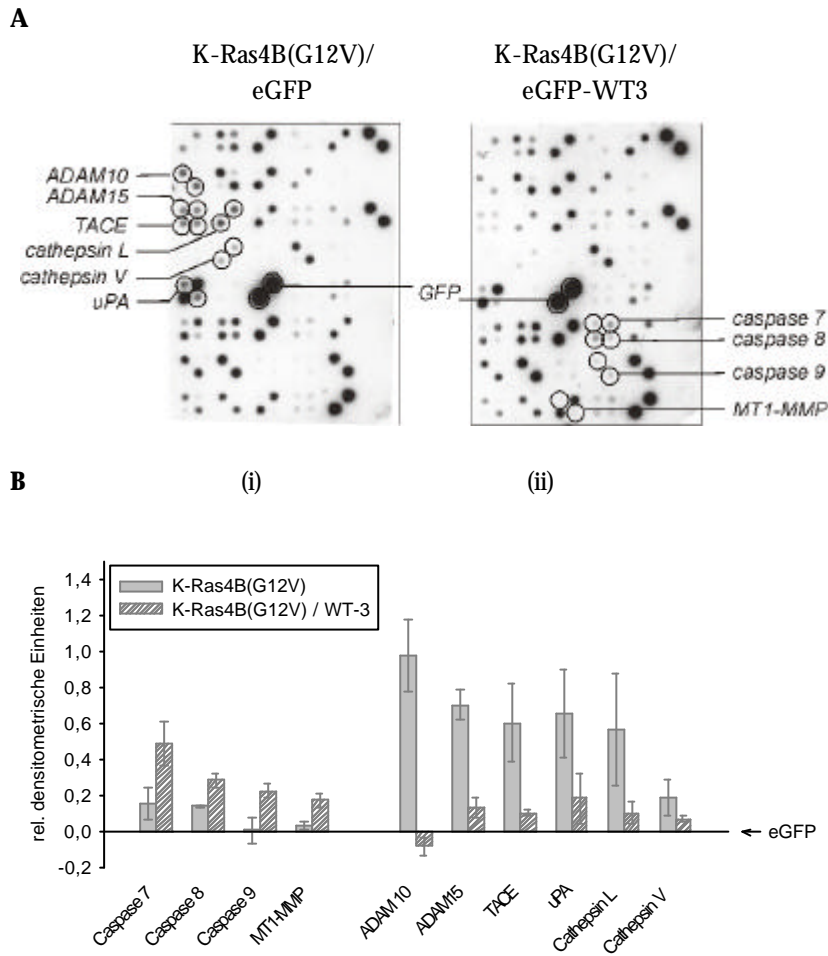


Abb. 32: **Auswirkungen von eGFP-WT-3 auf die K-Ras4B(G12V)-initiierte Genexpression.** Cos-7 Zellen wurden transient mit den Konstrukten für eGFP (Kontrolle) oder K-Ras4B(G12V) und eGFP bzw. eGFP-WT-3 transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, die mRNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde auf einen dDNA-Array aufgebracht. Anschließend wurden die Signale aus der Hybridisierung der cDNA mit den entsprechenden Fragmenten auf dem Array auf einem Film detektiert (A). Diese Signale wurden dann densitometrisch erfasst und als „relative densitometrische Einheiten“ ausgegeben. Die Veränderungen im mRNA-Spiegel der angegebenen Gene im Ansatz mit K-Ras4B(G12V)/eGFP bzw. K-Ras4B(G12V)/eGFP-WT-3 wurden auf eGFP (Abszisse) bezogen dargestellt (B). Details im Text

4.3.3. Wirkung der eGFP-MSOR auf das substratunabhängige Wachstum transformierter Fibroblasten

Die inhibitorische Wirkung der MSOR auf Ras-gesteuerter Signalwege konnte in den Studien zur ERK2-Phosphorylierung (siehe oben) und Manipulation der Genexpression nachgewiesen werden. Im Weiteren sollte die Relevanz dieser Effekte auf komplex regulierte Aspekte der zellulären Transformation untersucht werden. Wie eingangs geschildert, stimuliert onkogenes Ras eine ganze Reihe von Prozessen wie die Migration/Invasivität, Motilität oder das Matrix-unabhängige Wachstum, die zur Transformation/Tumorigenese verschiedener Zelltypen führen. Als eines der besten Modelle für die Tumorigenizität *in vivo* (Lackie und Dow, 1995), gilt die Fähigkeit transformierter Zellen in Soft-Agar- trotz der fehlenden Anbindung an die ECM- zu überleben, auswachsen und Kolonien zu bilden. Deswegen sollte der Einfluss der MSOR auf das Wachstum transformierter Fibroblasten unter diesen Bedingungen getestet werden. Dazu wurden NIH 3T3 Zellen mit *K-oder H-ras(G12V)/peXV3* allein oder in Kombination mit *WT-1* bzw. *WT-3/pEGFP* transfiziert, anschließend im Soft-Agar eingesät und für ca. 10d im Brutschrank inkubiert. Unter diesen Bedingungen kam es aber in keinem der Ansätze zur Ausbildung von Kolonien (nicht gezeigt), obwohl dies für H-Ras(G12V)-exprimierende NIH 3T3 Zellen bereits beschrieben wurde (Li *et al.*, 2004). Allerdings haben diese Autoren mit stabil transfizierten Zellen gearbeitet, was von entscheidender Bedeutung zu sein scheint, da für einige Aspekte der Transformation eine längerfristige Aktivierung

4. Ergebnisse

bestimmter Signalwege erforderlich ist (Janda *et al.*, 2002; Lehmann *et al.*, 2000). Deswegen wurde für die Versuche zum Wachstum in Softagar mit NIH-TM eine abgeleitete NIH 3T3 Zelllinie eingesetzt, in die ein *trkA/met*-Konstrukt stabil eingebracht wurde (Cramer *et al.*, 2005). Bei diesem Konstrukt handelt es sich um eine Rezeptorchimäre, welche für die extrazelluläre Domäne des humanen NGF-Rezeptors TrkA und die zytoplasmatische Domäne des murinen c-Met Rezeptors kodiert. Diese Fusion ermöglicht, eingebracht in Säugerzellen, nach Stimulation mit NGF die Untersuchung Met-spezifischer Effekte (Weidner *et al.*, 1993). Die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-Met oder seines (natürlichen) Liganden HGF/SCF fördert insbesondere invasive und metastasierende Eigenschaften (Otsuka *et al.*, 1998; Rusciano *et al.*, 1995). Die Beteiligung von Ras an diesen Prozessen konnte mit dominant-negativem Ras (Hartmann *et al.*, 1994) und durch Mikroinjektion Ras-neutralisierender Antikörper (Ridley *et al.*, 1995) gezeigt werden, welche die HGF-vermittelte Motilität von MDCK Zellen inhibieren. Die Fähigkeit der NIH-TM Zellen zur Koloniebildung in Soft-Agar nach NGF-Stimulation wurde bereits von (Cramer *et al.*, 2005) gezeigt. In den eigenen Versuchen wurden diese Zellen entweder nur mit eGFP (Kontrolle) oder mit den eGFP-WT-1 bzw. WT-3 exprimierenden Vektoren transient transfiziert und in Soft-Agar eingesät. Anschließend wurden die Zellen der einzelnen Ansätze mit Ausnahme eines Kontrollansatzes mit NGF stimuliert und für mindestens 10d im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit konnte ein Auswachsen der Zellen und die Ausbildung von Kolonien im Soft-Agar beobachtet werden (Abb. 33A). Nach Färbung der Kolonien mit MTT wurde deren Zahl in mindestens 10 Gesichtsfeldern bestimmt. In Abb. 33B sind die einzelnen Ansätze aneinander gegenübergestellt, wobei die mittlere Anzahl der Kolonien pro Gesichtsfeld aufgeführt ist. eGFP-exprimierende NIH-TM Zellen sind auch ohne NGF-Stimulus zum Wachstum in Soft-Agar befähigt. Der Met-Rezeptor kann zwar die Expression von HGF und dadurch eine autokrine HGF-Met Stimulation in NIH 3T3 Zellen induzieren (Cooper *et al.*, 1986; Rong *et al.*, 1992), der TrkA/Met-Rezeptor entzieht sich aber dieser Regulation aufgrund der abgewandelten extrazellulären Domäne (NGF-Rezeptor). Deshalb beruht die erhöhte Basalaktivität wahrscheinlich nicht auf diesem Mechanismus, könnte allerdings durch eine hohe Rezeptordichte verursacht werden, die zu einer NGF-unabhängigen, autonomen Dimerisierung, Autophosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors führt (Tulasne *et al.*, 1999). Die Stimulation der NIH-TM Zellen mit NGF führt zu einem Anstieg der Koloniezahl um ca. 40%, die- zumindest tendenziell- durch WT-1 und deutlicher, aber auch nicht signifikant durch WT-3 aufgehoben werden kann.

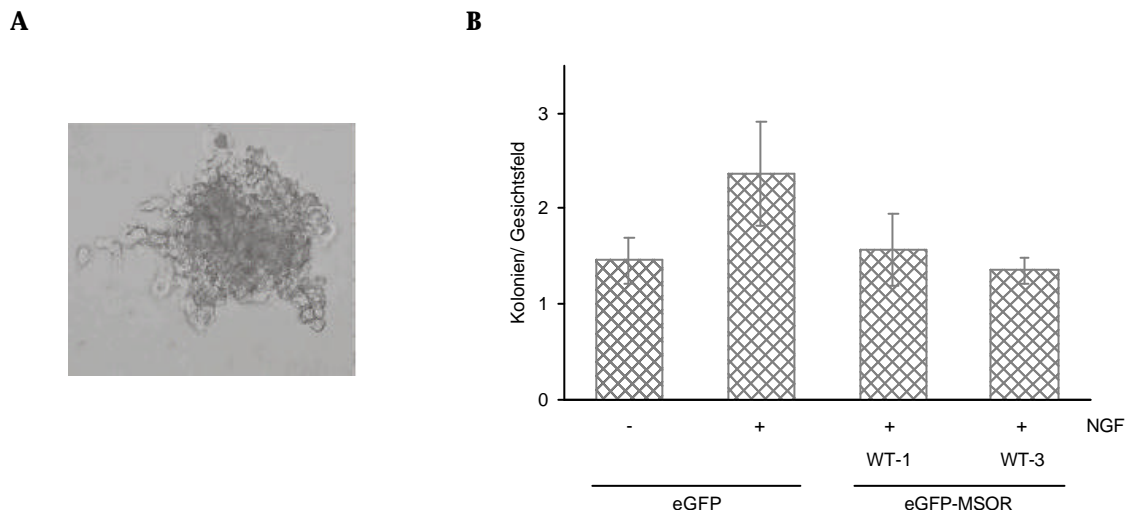


Abb. 33. **MSOR hemmen das substratunabhängige Wachstum transformierter Fibroblasten.** Trk/Met-exprimierende NIH-Zellen wurden mit den Konstrukten für eGFP, eGFP-WT-1 oder eGFP-WT-3 transient transfiziert. Anschließend wurden 2×10^4 Zellen in Soft-Agar eingesät und die Koloniebildung nach NGF-Stimulation über 10d hinweg verfolgt. Die in den einzelnen Ansätzen gewachsenen Kolonien (A) wurden mit MTT angefärbt. Von mindestens 10 Gesichtsfeldern der einzelnen Ansätze wurden die Kolonien gezählt und der Mittelwert davon dargestellt (B).

Um den Einfluss der Transfektionseffizienz auszugleichen, wurden in einer weiteren Versuchsreihe die gleichen eGFP-Konstrukte wie oben zusammen mit dem *trkA/met*-Konstrukt transient in NIH 3T3 Zellen eingebracht. In Analogie zu den Versuchen mit konstitutiv-aktivem Ras wuchsen auch hier die Zellen in den Kontrollansätzen nach Stimulation mit NGF nicht zu Kolonien aus (nicht gezeigt). Zusammengefasst ließ sich das Vermögen von eGFP-WT-1 bzw. -3 mit dem substratunabhängigen Wachstum transformierter Fibroblasten zu interferieren lediglich tendenziell unter Verwendung einer stabilen Zelllinie nachweisen.

4.3.4. Einfluss der eGFP-MSOR auf die Invasivität von Cos-7 Zellen

Eine weiteres Charakteristikum tumorigener Zellen ist deren Fähigkeit invasiv zu wachsen, d.h. Barrieren wie die extrazelluläre Matrix abzubauen und durch Migration durch zu überwinden. Auf diese Weise wird z.B. metastasierenden Krebszellen die Extravasation und Infiltration umgebenden Gewebes möglich (Chambers *et al.*, 2002). Wie bereits erläutert, spielt Ras auch bei diesen Prozessen eine Rolle und daher sollte nun untersucht werden, ob die MSOR mit der Invasivität transformierter Zellen interferieren. Ein Modellsystem, um den invasiven Charakter von Zellen nachzuweisen, stellt deren Penetration durch Matrigel dar (s. Abschnitt 3.2.12.). Voice *et al.* (1999) konnten zeigen, dass vor allem K-Ras4B(G12V) die Invasivität von Cos-7 Zellen fördert (Tabelle A). In Analogie dazu wurden transient transfizierte Cos-7 Zellen eingesetzt, die entweder eGFP allein oder K-Ras4B(G12V) zusammen mit eGFP bzw. den eGFP-Varianten von WT-1, WT-3 oder R59A,N64D-3 exprimieren. Diese Zellen wurden auf das Matrigel übertragen und für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die grün fluoreszierenden Zellen im unteren Kompartiment, d.h. die transfizierten, invasiven Zellen, unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Dabei migrieren, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von (Voice *et al.*, 1999), bereits eGFP-exprimierende Cos-7 Zellen (Abb. 34). Der Anteil wandernder Zellen erhöht sich durch Koexpression von K-Ras4B(G12V) um ca. 65% und liegt damit etwas unterhalb der anderen Studie (ca. 85%). Die Koexpression von MSOR und K-Ras4B(G12V) hebt- unabhängig vom eingesetzten MSOR- den K-Ras4B vermittelten, invasiven Effekt der Cos-7 Zellen vollständig auf. Betrachtet man die Ansätze mit den verschiedenen MSOR für sich, so blockieren die Trimere tendenziell besser als das eingesetzte Mono- bzw. Dimer. Interessanterweise verfügt jedoch keines der MSOR unter diesen Bedingungen über die Fähigkeit auch die invasiven Eigenschaften der Cos-7 Zellen selbst einzuschränken. So bleibt das invasive Verhalten von Cos-7 Zellen unbeeinflusst, wenn die verschiedenen eGFP-MSOR-Konstrukte allein, d.h. ohne K-Ras4B(G12V) exprimiert werden (nicht gezeigt). Das lässt die Vermutung zu, dass die Eigenschaft der Cos-7 Zellen invasiv zu wachsen durch andere Ras-unabhängige Signalwege vermittelt wird. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die MSOR deutlich mit der Ras-initiierten Invasivität von Cos-7 Zellen interferieren.

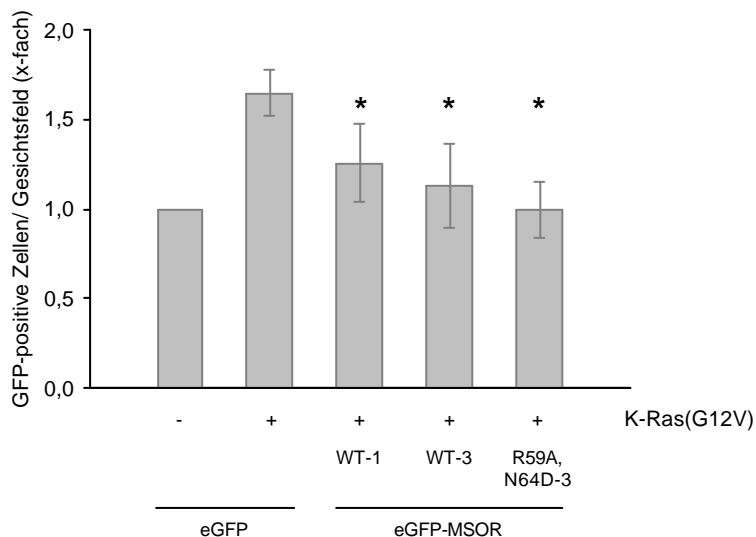


Abb. 34. **MSOR inhibieren die K-Ras4B(G12V)-initiierte Invasivität von Cos-7 Zellen.** Die Zellen wurden mit den Konstrukten für K-Ras4B(G12V) und eGFP, eGFP-WT-1, -3 bzw. eGFP-R59A,N64D-3 transfiziert und 24h später auf das Matrigel aufgebracht. Nach Inkubation für 48h im Brutschrank wurden die GFP-fluoreszierenden Zellen im unteren Kompartiment (invasive Zellen) von mindestens 10 Gesichtsfeldern eines jeden Ansatzes ausgezählt und dargestellt. (* P<0,05; signifikant gegenüber K-Ras4B(G12V)/eGFP)

5. Diskussion

Zum Einsatz multivalenter Domänen war zu Beginn dieser Arbeit nur die Studie von Gillooly *et al.* (2000) bekannt, die eine effektive Protein-Lipid-Interaktion von zwei gekoppelten FYVE-Domänen mit PI(3)P dokumentiert. Inzwischen wurden auch multivalente SH2-Domänen entwickelt, mit denen die Tyrosinphosphorylierung in lebenden Zellen in Echtzeit verfolgt wurde (Kirchner *et al.*, 2003). Die vorliegende Arbeit beschreibt die Konstruktion und Charakterisierung einer Reihe von MSOR (*multivalent scavengers of oncogenic Ras*) mit individuellen Eigenschaften. Unter diesem Oberbegriff sind oligomere Ras Bindedomänen (RBD) des Effektors c-Raf-1 zusammengefasst, die aus zwei oder drei verknüpften RBD bestehen und unterschiedliche Affinitäten für Ras-GTP aufweisen. Die spezifische Assoziation der MSOR mit Ras-GTP ermöglicht eine Diskriminierung des aktivierten, GTP-beladenen, vom inaktiven (GDP-beladenen) Ras. Durch die Kopplung der MSOR mit einem Fluoreszenzprotein (eGFP-MSOR) lässt sich nach Transfektion in Zellen deren intrazelluläre Lokalisation und die Ras-Aktivierung verfolgen. In Anbetracht von etablierten Ras-Reportern wie Raichu-Ras (Mochizuki *et al.*, 2001) oder GFP-RBD-CRD (Bondeva *et al.*, 2002) relativiert sich der methodische Ansatz der MSOR als eine innovative Neuentwicklung zur Detektion der Ras-Aktivität unter *in vivo* Bedingungen. Als mit dieser Arbeit jedoch begonnen wurde, waren derartige Ansätze nicht vorhanden und zeichneten sich auch nicht ab. Die Besonderheit und Innovation des MSOR-Ansatzes gegenüber anderen liegt vor allem in der Variabilität der Konstrukte. Denn aufgrund der justierbaren Affinitäten für aktives Ras, lassen sich die MSOR auch als Blocker Ras-vermittelter Signale einsetzen. Im Folgenden sollen die MSOR in ihrer Funktion als Reporter und Supressoren der Ras-Aktivität methodisch anderen Ansätzen gegenüber gestellt und das mögliche Potential dieses Ansatzes dargestellt werden.

5.1. Ableitung eines Modells der MSOR-Ras-Interaktion aus den *in vitro* Untersuchungen

Zunächst wurden die Bindungseigenschaften der verschiedenen MSOR (WT-, R59A-, T68A-1, -2 bzw. -3) an Ras-GTP *in vitro* untersucht. Dabei sollte insbesondere die Frage beantwortet werden, ob die Oligomerisierung der RBD die Bindung an Ras forciert- was gemäß der Arbeitshypothese der Fall sein sollte. Um die Wechselwirkungen der verschiedenen Konstrukte mit Ras-GTP zu analysieren, wurde der Ras/GAP-Assay eingesetzt. Dieser *in vitro* Ansatz ermöglicht eine qualitative Beschreibung der Protein/Protein-Interaktion in Lösung und bietet u.a. den Vorteil, dass sich Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen den verschiedenen Konstrukten durch direkte Gegenüberstellung übersichtlich darstellen lassen. Zunächst konnte mit diesem methodischen Ansatz der Einfluss von Punktmutationen in den RBD (R59A, T68A oder R59A,N64D), welche die Affinität gegenüber Ras herabsetzen, auf die Bindung gezeigt werden. Dabei korrelieren die Kurvenverläufe mit den K_D -Werten (Nassar *et al.*, 1996), da die WT Bindedomänen die höchste und R59A,N64D die geringste Affinität für Ras-GTP besitzen. Dies wurde sowohl unter Verwendung der Monomere (=RBD-1) als auch der Trimere (RBD-3) demonstriert (Abb. 10 und 20).

In weiteren Versuchen dieser Art ließ sich überzeugend zeigen, dass sich mit zunehmender Oligomerisierung der RBD entsprechend die Bindung an Ras-GTP verlängert. Um nachzuweisen, dass tatsächlich die Verknüpfung der RBD und nicht etwa ein Überschuss der RBD in Ansätzen mit Di- oder Trimeren für den beobachteten Effekt verantwortlich ist, wurde in jedem Ansatz mit gleichen RBD-Molekülzahlen und nicht mit gleichen Proteinkonzentrationen gearbeitet. Im Gegensatz zu den Kurven von WT-1 oder den verschiedenen Varianten von R59A bzw. T68A, die nach spätestens 15min (nicht gezeigt) das Niveau der Kontrolle errechen, ist der Kurvenverlauf von WT-2 oder -3 auch bei hohen NF-1-Konzentrationen nach dieser Zeit noch deutlich flacher (Abb. 10). Demnach wird in diesen Ansätzen über den Zeitraum der Messung weniger Ras-GTP umgesetzt. Dieses ist offenbar permanent mit WT-2 bzw. -3 assoziiert, dadurch quasi „gefangen“ und somit nicht zugänglich für NF-1. Der verbleibende geringe Anstieg

5. Diskussion

der Kurven in diesen Ansätzen ist möglicherweise auf die intrinsische GTPase Aktivität von Ras zurückzuführen, da diese von einer Interaktion mit der RBD unabhängig abläuft (Herrmann *et al.*, 1995). Um die Ursache dieser „verbesserten“ Bindung oligomerer Konstrukte an Ras-GTP näher zu untersuchen, wurde die ITC angewandt. Diese Methode sollte auch Aufschluss darüber geben, ob die Verknüpfung der RBD zu einem „kooperativen Effekt“ führt, bei dem zwei oder drei verknüpfte Domänen simultan an zwei bzw. drei Ras Moleküle binden. Die Interaktion einer einzelnen RBD (entspricht WT-1 dieser Arbeit) mit H-Ras sowie Rap wurde mittels ITC bereits untersucht (Rudolph *et al.*, 2001). Die einzelnen Parameter dieser Untersuchung sind der eigenen Messung für WT-1 und H-Ras(G12V) in Tabelle 13 gegenübergestellt.

Tabelle 13: *Thermodynamische Parameter der H-ras bzw. Rap1A/WT-1 Interaktion.*

Die Messungen wurden bei 25°C in Puffer A durchgeführt. H-Ras(G12V) wurde mit GTP beladen und gegen die gleiche Anzahl an Bindedomänen in den einzelnen Ansätzen titriert. K_A ist in Einheiten 10^5 M^{-1} und ΔH und $T\Delta S$ in $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ angegeben.

1) Rudolph *et al.*, 2001

2) diese Arbeit

		WT-1				
	N	K_A	ΔH	$T\Delta S$		
H-Ras	1,0	125,0	-5,2	4,5	1)	
Rap1A	1,0	15,0	-3,7	4,8	1)	
H-Ras(G12V)	0,93 ±0,05	5,86 ±0,17	-2,22 ±0,08	5,57 ±0,16	2)	

Daraus geht hervor, dass die höhere Affinität der RBD zu Ras gegenüber Rap in einer stärkeren Enthalpieänderung begründet ist. Die in dieser Arbeit erhobenen Messwerte für die RBD/Ras Interaktion weichen sehr stark von denen der anderen Studie ab. So sind K_A und ΔH etwa 20- bzw. 2,5-fach kleiner, während $T\Delta S$ etwas erhöht ist. Diese Differenzen wurden möglicherweise durch die Verwendung eines anders zusammengesetzten Puffers u.a. mit einem doppelten Gehalt an NaCl verursacht. Ein erhöhter NaCl Gehalt erniedrigt den stark salz-abhängigen K_A -Wert, andere Pufferunterschiede wirken sich stark auf ΔH aus und auch das verwendete Nukleotid (GTP *versus* nicht-hydrolysierbares GTP-Analogon) beeinflusst die Affinität der Bindungspartner (Rudolph *et al.*, 2001). Eventuell beeinträchtigten auch nicht vollständig entfernte Rückstände des Beladungsansatzes die Qualität der Messung. Weiterhin könnte auch das statt H-Ras verwendete H-Ras(G12V) einen Beitrag leisten, obwohl mit anderen Messmethoden nur minimale Unterschiede in den Affinitäten von RBD/H-Ras bzw. H-Ras(G12V) beobachtet wurden (Herrmann *et al.*, 1995). Insgesamt beruhen die starken Unterschiede vermutlich auf der Summation mehrerer kleiner Effekte (Prof. C. Herrmann, persönliche Mitteilung).

Unabhängig von den Differenzen zur Arbeit von Rudolph *et al.* (2001) konnten mittels ITC die thermodynamischen Parameter der Interaktion von H-Ras(G12V) und WT-1, -2 bzw. -3 erfasst werden, die somit untereinander vergleichbar sind. Dabei zeigt sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Ras/GAP-Assays anhand der ermittelten K_A -Werte, dass die Oligomerisierung zu einer stärkeren Bindung der MSOR an Ras-GTP führt. Dabei spielt es eine untergeordnete Rolle, ob es sich um das Di- oder Trimer handelt. Denn zumindest bei diesen hochaffinen MSOR reicht es aus, wenn eine zweite RBD als potentieller Bindungspartner in die unmittelbare Nähe von Ras-GTP gebracht wird. Dies lässt sich aus dem deutlichen Sprung in den K_A -Werten vom Monomer zum Dimer und dem geringen Unterschied zwischen WT-2 und -3 ableiten (siehe Tabelle 10). Es ist anzunehmen, dass der Oligomerisierungsgrad bei niederaffinen MSOR hingegen eine wichtigere Rolle spielt, da die Bindungswahrscheinlichkeit- trotz der geringeren Affinität für Ras-GTP- durch eine erhöhte Anzahl angebotener RBD ansteigt.

Die unterschiedlichen Affinitäten zwischen den verschiedenen MSOR-Konstrukten beruhen auf einem enthalpischen und nicht auf einem entropischen Effekt (siehe Abb. 12; Tabelle 10). Überraschend war die Beobachtung, dass die Stöchiometrie der MSOR:Ras Interaktion- vermutlich aus sterischen Gründen (siehe unten)- 1:1 beträgt. Dies bedeutet für WT-1, -2 und -3 gleichermaßen: ein Molekül dieser Konstrukte bindet ein Molekül Ras-GTP. Aufgrund dieser Stöchiometrie der Bindung ist auch ersichtlich, warum sich

die Entropieänderung zwischen den verschiedenen Ansätzen nicht unterscheidet. Die offenbar erhöhte Affinität der Oligomere *in vitro* beruht also nicht auf der zunächst vermuteten entropiegetriebenen, simultanen Bindung mehrerer Ras-Moleküle. Die Ergebnisse der Ras/GAP-Assays und der ITC legen einen alternativen Mechanismus nahe. Nach dem in Abb. 35 dargestellten Modell wirkt sich die Oligomerisierung der RBD auf die Kinetik der Ras/MSOR-Wechselwirkung aus. Der Komplex zwischen Ras-GTP und einer monomeren RBD (= WT-1) besteht über einen Zeitraum von ungefähr 50-100ms und zerfällt danach (Sydor *et al.*, 1998). Daraufhin diffundiert WT-1 in die umgebende Lösung (Abb. 35A). Dort konkurrieren dann freie WT-1 oder GAP um das aktive Ras, wobei die Inaktivierung von Ras im Wesentlichen durch die GAP-Konzentration bestimmt wird. Gemäß der ITC interagiert *ein* Molekül Ras-GTP mit *einem* MSOR-Oligomer (WT-2; WT-3). Da die gekoppelten RBD des MSOR unmittelbar zusammenliegen, wird das aktivierte Ras-Molekül nach dem Zerfall des Komplexes sofort wieder durch eine benachbarte RBD gebunden und deshalb diffundiert das MSOR nicht wie die monomere RBD in die umgebende Lösung (Abb. 35B). Da die Lebensdauer des Ras/RBD Komplexes viel kleiner ist als die intrinsische GTPase Aktivität von Ras, kann das aktive Ras weiter zwischen den RBD wechseln. Dieses „Springen“ von Ras könnte die Ursache für den Enthalpiegewinn der oligovalenten MSOR sein. Die Oligomerisierung wirkt mutmaßlich auf die k_{off} -Rate und verlängert so die Lebensdauer des Ras:MSOR-Komplexes, was sich durch kinetische Messungen prüfen ließe. Die erhöhte Lebensdauer des Komplexes ist die Konsequenz der erhöhten Affinität des Gesamt-Oligomers, zu der die miteinander verknüpften RBD beitragen. Somit resultiert die erhöhte Affinität des Di- oder Trimers aus der gesteigerten Interaktion von Ras-GTP mit dem Gesamt-Oligomer und wahrscheinlich nicht aus einer erhöhten Affinität der einzelnen RBD. Bei hochaffinen Konstrukten wiederholt sich die Wechselwirkung benachbarter RBD mit dem gleichen Ras-Molekül permanent, so dass Ras-GTP durch die resultierende „konstitutive“ Bindung sequestriert wird und- wie im Ras/GAP-Assay beobachtet- gegenüber GAP abgeschirmt ist. Die Lebensdauer des Komplexes wird dann von der intrinsischen GTPase Aktivität von Ras determiniert. Niederaffine MSOR wie R59A,N64D-3 wirken nach dem gleichen Mechanismus, bei ihnen ist aber Wechselwirkung mit Ras-GTP aufgrund der geringeren Affinität der einzelnen RBD im Vergleich zu hochaffinen Konstrukten verkürzt.

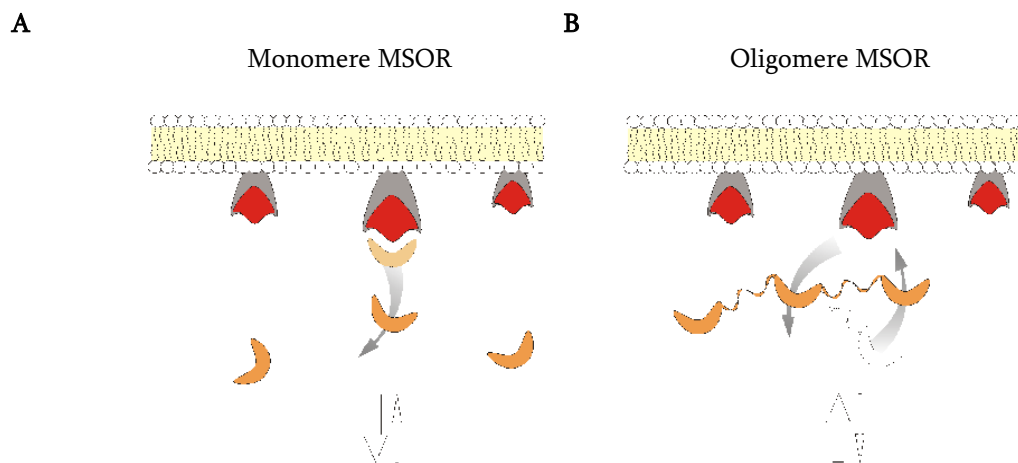


Abb. 35. **Modell des „oligomeren Effekts“**. Die Stöchiometrie der MSOR/Ras-Komplexe ist 1:1. Die ITC-Messungen ergaben, dass die Interaktion beider Proteine nicht auf einem kooperativen Effekt beruht. Die stärkere Bindung oligomerer MSOR gegenüber monomeren ist vielmehr enthalpiegetrieben. (A) Ras-GTP bindet an eine monomere RBD und diffundiert nach dem Zerfall des Komplexes in die umgebende Lösung. Dort kann es wiederum durch eine RBD oder durch GAP gebunden werden- letzteres führt zur Inaktivierung von Ras. (B) Oligomere MSOR binden Ras-GTP, das zwischen den gekoppelten RBD hin- und herwechselt. Diese Interaktion mit dem MSOR verhindert die Diffusion von Ras-GTP in die umgebende Lösung sowie den Zutritt von GAP. Details sind im Text beschrieben.

Wie bereits erwähnt, beträgt das Bindungsverhältnis von Ras zu MSOR 1:1. Dies wird wohl zumindest partiell durch den geringen Abstand (fünf AS) zwischen den einzelnen RBD eines MSOR verursacht. Dieser Abstand wurde in dieser Arbeit nicht manipuliert. Durch einen vergrößerten Abstand zwischen den RBD würden die MSOR Ras-GTP eventuell doch kooperativ binden- messbar an einer Zunahme der

Entropieänderung. Damit würde sich eine weitere Möglichkeit ergeben die Bindung an aktives Ras zu justieren.

Mit den Ras/GAP-Assays und der ITC konnten qualitative bzw. quantitative Unterschiede im Bindungsverhalten mono- versus oligomerer Konstrukte *in vitro* aufgezeigt werden. Daraus ließ sich eine Vorstellung über den mutmaßlichen Mechanismus der Interaktion multivalenter Ras-Binder und Ras-GTP entwickeln. Ras/GAP-Assay und ITC sind jedoch *in vitro* Methoden und bei beiden wird mit Ras-Proteinen in Lösung gearbeitet. Daher lassen sich diese Daten wohl nur begrenzt auf die Situation *in vivo* übertragen. Denn im zellulären Kontext ist Ras über Lipidanker in Membranen integriert und damit in zwei Dimensionen „fixiert“. Zudem ist die Aktivierung des Proteins eng mit der Lokalisation in Mikrodomänen der Plasmamembran verknüpft (Rotblat *et al.*, 2004) und der Farnesylrest von Ras beeinflusst direkt die Interaktion mit Ras-Effektoren (Rubio *et al.*, 1999). Darüber hinaus bilden offenbar H-Ras, K-Ras und auch Raf-1 *in vivo* Homodimere aus, die wohl ebenfalls wichtig für die biologische Aktivität der Proteine sind (Goetz *et al.*, 2003; Inouye *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 1996). Von diesem Standpunkt aus erscheint die Idee der Oligomerisierung der RBD als eine biotechnologische Reflektion des natürlichen Vorbildes.

5.2. Beobachtungen zum Verhalten der MSOR *in vivo*

Die Zielstellung dieser Arbeit lag in der Entwicklung von MSOR, mit denen sich die Ras-Aktivität *in vivo* modulieren und/oder blockieren lässt. Darüber hinaus sollten die MSOR aufgrund der spezifischen Interaktion mit der aktivierten Form von Ras als Reporter zur Detektion der *endogenen* Ras-Aktivierung eingesetzt werden. Um die intrazelluläre Wirkung und Lokalisation der MSOR zu analysieren, wurden die MSOR am N-Terminus mit eGFP fusioniert (eGFP-MSOR) und in Säugerzellen (über)exprimiert. Nach den Arbeiten von Choy *et al.* (1999) oder Bondeva *et al.* (2002) hat die Koppelung von Ras- oder RBD-Proteinen mit GFP keinen entscheidenden Einfluss auf deren Funktionalität. Aufgrund dessen spielt vermutlich der Fluoreszenzmarker bei der intrazellulären Wirkung der eGFP-MSOR keine wesentliche Rolle.

5.2.1. Betrachtungen zum pro-apoptotischen Effekt hochaffiner MSOR

Die Expression eGFP-fusionierter, hochaffiner MSOR (Di- und Trimere von WT, T68A bzw. R59A) in Cos-7 Zellen führt zu einer auffälligen, drastisch veränderten Morphologie dieser Zellen. Offenbar löst die Expression solch stark bindender, oligovalenter Konstrukte die Apoptose aus, was sich einmal im Auftreten Apoptose-typischer Merkmale wie z.B. *blebbing*, Bildung von *apoptotic bodies* oder Kernfragmentierung (Abb. 14) zeigt. Diese stimmen mit den Beschreibungen und Abbildungen apoptotischer Cos Zellen anderer Studien überein (Hiddinga und Eberhardt, 1999; Ura *et al.*, 2001), Zum anderen konnte mit dem Annexin V-Assay nachgewiesen werden, dass der Anteil apoptotischer Cos-7 Zellen bei Expression von eGFP-WT-1 bzw. -3 gegenüber eGFP tatsächlich signifikant erhöht ist. Der Anteil toter Zellen in den Ansätzen liegt möglicherweise auch noch höher, denn mit der Annexin V-Färbung lässt sich nach Willingham (1999) nur ungefähr 1/3 der apoptotischen Zellen markieren. Wahrscheinlich sequestrieren diese stark bindenden MSOR wie unter Abschnitt 4.1.3.3. beschrieben das endogen verfügbare Ras, was in der Folge zur Induktion der Apoptose in Cos-7 Zellen führt. In der gleichen Weise reagieren nämlich auch Fibrosarkoma Zellen, in denen die Aktivität des endogenen Ras durch Expression von dominant-negativem Ras depletiert wurde (Gardner und Johnson, 1996). Zudem lässt sich die „Apoptose-ähnliche“ Morphologie der eGFP-WT-3 Zellen durch Koexpression onkogener Ras-Varianten partiell aufheben (s. Abschnitt 4.1.3.4.). Die pro-apoptotische Wirkung von eGFP-WT-3 in Cos-7 Zellen spiegelt sich auch in einer deutlich erhöhten Genexpression pro-apoptotischer Faktoren in Form der *caspasen 7, 8* und *9* wieder- und das trotz Koexpression von onkogenem K-Ras4B (s. Abschnitt 4.3.2.2.) Interessanterweise wird durch eGFP-WT-3 die Transkription sowohl von Initiator (Caspase 8, 9)- als auch Effektorcaspasen (Caspase 7) induziert. Erhöhte mRNA-Spiegel von Caspasen führen auch zum Anstieg der Proteinspiegel der Zymogene (Procaspasen) (Sabbagh *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004). Die Überexpression oder artifizielle Oligomerisierung einiger Procaspasen, z.B. Procaspase 8 und 1 ist zudem ausreichend für die Prozessierung in die reife Form

(Muzio *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Wenn ein solcher Zusammenhang auch für Cos-7 Zellen gilt, lässt sich das Verhalten von eGFP-WT-3 in Gegenwart von K-Ras4B(G12V) möglicherweise auf den Ablauf der Apoptose insgesamt übertragen: demnach kann onkogenes K-Ras- trotz Bindung/Sequestrierung von eGFP-WT-3 (s. Abschnitt 4.1.3.4.)- dessen pro-apoptotische Wirkung nicht komplett kompensieren. Übereinstimmend dazu sind K-Ras4A oder 4B im Gegensatz zu N-Ras auch nicht in der Lage die erhöhte Sensitivität von N-Ras *knockout*-Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli wie Serumentzug aufzuheben (Wolfman und Wolfman, 2000). Eventuell wirkt K-Ras4B in Cos-7 Zellen, wie die Arbeit von Khokhlatchev *et al.* (2002) demonstriert, eher pro-apoptotisch, während N-Ras und H-Ras in die Suppression der Apoptose involviert sind. Folglich löst eGFP-WT-3 durch die permanente Sequestrierung der anti-apoptotischen Ras-Isoformen (N-Ras, H-Ras) den programmierten Zelltod aus. Bei der Exekution der Apoptose spielt dann aber vielleicht auch die Hemmung von K-Ras4B eine Rolle. Schließlich stimuliert K-Ras4B stärker als die anderen Ras-Isoformen die Aktivierung von Raf in Cos Zellen (Voice *et al.*, 1999), und die Aktivierung von MEK > ERK inhibiert u.a. Caspase 9 durch Phosphorylierung von Thr125 (Allan *et al.*, 2003).

WT-3 interagiert mit H-Ras *in vivo* (Abb. 18) und interferiert mit dessen eingeleiteten Signalprozessen (Abschnitt 4.3.1.). Eine Konsequenz der Inhibition von H-Ras besteht darin, dass dadurch u.a. die Aktivierung von PI(3)K/Akt, und damit wiederum ein anti-apoptotischer sowie ein für das Überleben von Zellen elementarer Signalweg, entkoppelt wird (Cox und Der, 2003; Downward, 1998). Außerdem wird durch Bindung der MSOR die blockierende Wirkung von H-Ras auf pro-apoptotisch wirkende Proteine wie z.B. Par-4, dessen Transkription MEK abhängig unterdrückt wird, aufgehoben. In NIH 3T3 Fibroblasten induziert die ektopische Expression von Par-4 Apoptose, wahrscheinlich durch Sequestrierung atypischer PKC-Formen (Diaz-Meco *et al.*, 1994 und 1996). Die Koexpression von onkogenem H-Ras hebt diesen pro-apoptotischen Effekt auf, der aber durch simultane Inhibition der PI(3)K wiederhergestellt wird (Barradas *et al.*, 1999). Für die Induktion der Apoptose durch hochaffine MSOR-Konstrukte könnte letztlich das Ausschalten von N-Ras verantwortlich sein. Durch das Fehlen dieser Ras-Isoform kommt es u.a. zu einer permanenten Aktivierung der JNK, die den programmierten Zelltod initiieren kann (Fan *et al.*, 2000; Putcha *et al.*, 2003; Tsuruta *et al.*, 2004; Wolfman und Wolfman, 2000). Obwohl die Interaktion der MSOR mit N-Ras in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, ist die Wechselwirkung zwischen N-Ras und der RBD *in vitro* beschrieben (Herrmann *et al.*, 1995). (Hamilton und Wolfman, 1998) fanden, dass Raf-1 *in vivo* eine höhere Affinität für N-Ras als für H-Ras besitzt. Einige der beschriebenen Mechanismen wie z.B. die JNK-vermittelte Phosphorylierung und Inaktivierung von Bcl-2 wurde auch in Cos-7 Zellen nachgewiesen (Maundrell *et al.*, 1997). Die Ergebnisse von Tournier *et al.* (2000) lassen auf eine Beteiligung der JNK an der „mitochondrialen Apoptose“ schließen und in dieser Arbeit konnte die durch eGFP-WT-3 stimulierte Genexpression von *caspase 9*, die im Zuge „mitochondrialen Apoptose“ aktiviert wird, nachgewiesen werden. Demnach könnte der in dieser Arbeit beobachtete apoptotische Effekt in Cos-7 Zellen, der durch die Wirkung hochaffiner MSOR ausgelöst wird, über die Blockade von N-Ras und permanente Aktivierung des JNK-Signalweges erfolgen, was Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein könnte. Weiterhin könnte auch die (De)aktivierung einer Reihe apoptose-relevanter Proteine in WT-3 exprimierenden Cos-7 Zellen getestet werden. So könnte in Anlehnung an die Studie von Maundrell *et al.* (1997) die Phosphorylierung von Bcl-2 untersucht werden oder der Status von Par-4 in diesen Zellen. Eventuelle Unterschiede in der Anzahl toter, WT-3-exprimierender Zellen in Gegenwart von (onkogenem) H-, K- oder N-Ras, wären ein Hinweis auf die Beteiligung der einzelnen Ras-Isoformen bei der Auslösung der Apoptose. Nach dem beschriebenen Szenario sollten N-Ras oder H-Ras die apoptotische Wirkung hochaffiner MSOR viel stärker kompensieren als K-Ras. In diesem Zusammenhang ist es besonders interessant festzustellen, welche Wirkung diese hochaffinen Ras-Blocker auf Ras-transformierte Zellen haben. Im Gegensatz zu den hochaffinen MSOR treten bei der Expression niederaffiner Konstrukte (eGFP-R59A,N64D-1 bzw. -3), die wie die hochaffinen mit der Ras-vermittelten Signaltransduktion interferieren, weder die beschriebenen morphologischen Veränderungen auf (s. Abschnitt 4.1.3.2.), noch ist der Anteil toter Zellen (s. Abschnitt 4.1.3.6.1.) oder der mRNA-Spiegel von Caspasen quantitativ erhöht (nicht gezeigt). Dies ist ein weiteres Indiz für die These, dass hochaffine MSOR zur dauerhaften Blockade des endogenen Ras führen und folglich zum Zelltod der Cos-7 Zellen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: die Expression hochaffiner MSOR führt mutmaßlich zur vollständigen Sequestrierung des endogen verfügbaren Ras in Cos-7 Zellen. Dadurch wird mit Ras ein für das Gleichgewicht von „Überleben“ und „Tod“ der Zellen wichtiger Faktor entkoppelt. Die Stimulation anti-

apoptotischer Signalkaskaden wie ERK oder PI(3)K/Akt bleibt aus, wodurch pro-apoptotische Prozesse, die mitunter ebenso Ras-abhängig unterdrückt werden, dominieren.

5.2.2. Visualisierung der Ras-Aktivierung *in vivo*

- ***Niederaffine MSOR als geeignete Reporter der Ras-Aktivität***

Bondeva *et al.* haben 2002 einen Reporter zur Detektion der Ras-Aktivierung vorgestellt. Dieser umfasst dem natürlichen Vorbild entsprechend den RBD-CRD Abschnitt von Raf-1 (AS 51-200) fusioniert an GFP. In *pull down* Versuchen konnte gezeigt werden, dass GFP-RBD-CRD deutlich effizienter als GFP-RBD (entspricht GFP-WT-1) Ras-GTP bindet. Dies ist wie von Bondeva *et al.* (2002) diskutiert auf die gemeinsame Bindung der RBD und CRD an Ras zurückzuführen. Die stärkere Affinität für Ras-GTP bei Kombination zweier Ras-bindender Domänen (RBD-CRD) korreliert eindrucksvoll mit der Beobachtung, dass auch oligomere RBD effektiver als monomere binden (Abschnitt 4.1.2.2.). Dieser „oligomere Effekt“ zeigt sich besonders anschaulich bei den R59A,N64D-Varianten. Die Einführung der N64D-Mutation in den R59A-Hintergrund der RBD führt im Fall des Monomers (R59A,N64D-1) zum kompletten Verlust der Bindung an aktives Ras *in vitro* und *in vivo* (Abb. 20). Und das obwohl der K_D -Wert für die Interaktion von R59A,N64D-1 mit H-Ras-GTP (3,8 μ M; Nassar *et al.*, 1996) im gleichen Bereich wie der für die Ras-Effektoren RalGDS (3,5 μ M; Vetter *et al.*, 1999) und PI(3)Ky (3,2 μ M; Pacold *et al.*, 2000) liegt. Dies zeigt, dass die Interaktion dieser Effektoren mit Ras *in vivo* durch die RBD und zusätzliche Strukturelemente vermittelt wird. Im Gegensatz zu R59A,N64D-1 ist die Fähigkeit Ras-GTP zu binden bei R59A,N64D-3 komplett wiederhergestellt (Abb. 20 und 21). Die schwächere Bindung dieses Trimers gegenüber WT-1 im Ras/GAP-Assay ist auf die geringere Proteinmenge (1/3 gegenüber WT-1) zurückzuführen. Unter Verwendung gleicher molarer Mengen, was den Bedingungen bei Expression der Konstrukte in Zellen entspricht, besitzt R59A,N64D-3 in etwa die gleiche Affinität wie WT-1 für Ras-GTP *in vitro* (nicht gezeigt). Mit eGFP-WT-1 lässt sich die Aktivierung des endogenen Ras in lebenden Zellen nicht visualisieren; entweder weil nur wenig Ras-GTP nach Stimulation der Zellen entsteht (de Castro *et al.*, 2004) oder die Sensitivität des Reporters nicht ausreicht (Bondeva *et al.*, 2002). Dagegen erweist sich eGFP-R59A,N64D-3 als ein funktioneller Reporter, mit dem sich die Ras-Aktivierung *in vivo* unter verschiedenen Bedingungen und Zelltypen verfolgen lässt (Abschnitt 4.2.). Dies ist auf zwei Eigenschaften dieses Konstruktes zurückzuführen: (1) eGFP-R59A,N64D-3 ist aufgrund der stark abgeschwächten Affinität für Ras-GTP im Gegensatz zu eGFP-WT-3 nicht mehr zytotoxisch (Annexin V-Assay), aber dennoch in der Lage *in vivo* spezifisch mit Ras-GTP zu interagieren (Abb. 19 und 21). (2) eGFP-R59A,N64D-3 verfügt in etwa über die gleiche Affinität wie eGFP-WT-1 für Ras-GTP, wird aber aufgrund einer mutmaßlich anderen Kinetik (Abschnitt 5.1.) an die Stellen des aktiven Ras rekrutiert.

- ***Spezifität des Reporters eGFP-R59A,N64D-3***

Der Reporter eGFP-R59A,N64D-3 bindet spezifisch p21^{Ras}-GTP, kolokalisiert aber auch mit Mitgliedern der R-Ras-Subfamilie wie M-Ras oder TC21 (Abb. 21). Folglich wird mit eGFP-R59A,N64D-3 (zumindest) die Aktivierung der Ras-Isoformen (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B) sowie der R-Ras-Subfamilie detektiert; eine Unterscheidung zwischen diesen Proteinen ist mit diesem Reporter nicht möglich. Darin liegt auch eine Limitation dieses Ansatzes begründet. Durch Anwendung alternativer experimenteller Methoden (z.B. „*pull down*“ Analyse), kann jedoch untersucht werden, welche dieser Ras-Proteine nach Stimulation der Zellen überhaupt aktiviert werden. So führt z.B. die Stimulation von Ba/F3-Fms Zellen mit IL-3 zu einer starken Aktivierung von K-Ras4B und M-Ras, während nur eine sehr schwache GTP-Beladung von H-Ras und N-Ras erfolgt. Demgegenüber reagieren NIH 3T3 Zellen auf EGF-Stimulation mit einer starken Aktivierung von K-Ras4B, N-Ras und M-Ras, während H-Ras (exogen eingebrachte Varianten) dadurch nicht aktiviert wird (Ehrhardt *et al.*, 2004). In Jurkat Zellen führt eine Stimulation des T-Zellrezeptors (TZR) mit 5 μ g/ml anti-CD3/anti-CD28 zur Aktivierung von N-Ras und K-Ras nicht aber von H-Ras

(endogenes Ras analysiert), während durch Stimulation mit 1µg/ml anti-CD3/anti-CD28 lediglich N-Ras aktiviert wird (de Castro *et al.*, 2004). Diese Beispiele zeigen, dass es nach Stimulation von Zellen zu einer sehr differentiellen Aktivierung der einzelnen Mitglieder der Ras-Subfamilie kommt. Das Aktivierungsmuster ist stark abhängig vom Zelltyp, Stimulus und den Stimulationsbedingungen. Daher setzt sich das mit eGFP-R59A,N64D-3 detektierte Signal aus der Aktivierung einzelner aber nicht unbedingt aller Ras-Isoformen und/oder Mitgliedern der R-Ras Subfamilie zusammen.

- ***Detektion der Ras-Aktivierung an der Plasmamembran***

Unter Verwendung von eGFP-R59A,N64D-3 konnte die EGF-induzierte H-Ras-Aktivierung in Gegenwart von überexprimierten (exogenem) DsRed1-H-Ras dokumentiert werden (Abb. 25). Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Varianten bietet den Vorteil, dass sich eine Kolo-kalisation beider Proteine anschaulich darstellen lässt. Infolge der EGF-Stimulation kommt es zu einer raschen GTP-Beladung, d.h. Aktivierung von H-Ras an der Plasmamembran (nach ca. 30s). Dies lässt sich aus (1) der Stimulus-abhängigen Translokation von eGFP-R59A,N64D-3 aus dem Zytosol in die Zelleripherie und (2) der Kolo-kalisation beider Fluoreszenzproteine an der Plasmamembran schlussfolgern (Abb. 25). Die Kolo-kalisation ist ein Indiz für die direkte Interaktion des Reporters mit aktiviertem H-Ras; der tatsächliche Nachweis der molekularen Wechselwirkung beider Proteine konnte durch FRET-Messungen (Bastiaens und Squire, 1999) erbracht werden (nicht gezeigt). Der beobachtete Zeitverlauf der Aktivierung korreliert gut mit bestehenden zellbiologischen und biochemischen Daten („pull-down“ Assay) anderer Arbeiten (Mochizuki *et al.*, 2001; Murakoshi *et al.*, 2004). Im Zusammenhang mit der postulierten mitogenen Aktivierung von Ras an Endomembranen (ER, Golgi-Apparat; siehe auch nachfolgenden Abschnitt „Ras am Golgi-Apparat: Lokalisation ohne Aktivierung *in vivo?*“) sei an dieser Stelle darauf verwiesen, dass DsRed1-H-Ras und eGFP-R59A,N64D-3 in diesem Bereich der Cos-7 Zellen unabhängig vom EGF-Stimulus kolo-kalisieren. Dagegen akkumuliert in DsRed1-H-Ras(N17), eGFP-R59A,N64D-3 exprimierenden Cos-7 Zellen vor und nach Stimulation lediglich dominant-negatives H-Ras am ER/Golgi-Apparat, ohne dass der MSOR-Reporter dorthin transloziert (Abb. 26). Diese Befunde sprechen gegen eine stimulus-abhängige Ras-Aktivierung am Endomembransystem. DsRed1-H-Ras(N17) unterdrückt außerdem die Rekrutierung von eGFP-R59A,N64D-3 an die Plasmamembran nach Stimulation der Zellen mit EGF, was die GTP-spezifische Translokation der oligomeren MSOR belegt. Aus diesen Resultaten folgt, dass eGFP-R59A,N64D-3 ein verlässlicher Reporter zur Visualisierung der Ras-Aktivierung ist. Die Ergebnisse weiterführender Experimente verdeutlichen, dass dies auch für die Aktivierung des *endogenen* Ras zutrifft (s. Abschnitt 4.2.). Die EGF-Stimulation eGFP-R59A,N64D-3 exprimierender Cos-7 Zellen führt zur Ausbildung von Lamellipodien und *ruffles* und zur Ras-Aktivierung in diesen Bereichen (Abb. 23A und B). Ein ähnliches Bild zeigt sich auch nach Stimulation der Cos-7 Zellen mit TPA, wobei Ras-GTP im Verlauf der Stimulation (ab ca. 20min) in fokalen Strukturen der Plasmamembran entsteht (Abb. 24). Dagegen erfolgt die Ras-Aktivierung in HeLa Zellen nach EGF von Beginn an in einer Vielzahl fokaler Strukturen im Bereich der Zelleripherie (Abb. 23C). Wie bereits für exogenes Ras dokumentiert, kommt es auch bei endogenem Ras *nicht* zu einer Stimulus-induzierten Rekrutierung des Reporters an Endomembranen (ER/Golgi-Apparat). Das impliziert das Ausbleiben einer Ras-Aktivierung in diesem Bereich nach Stimulation und steht damit in deutlichem Gegensatz zu den Arbeiten von M. Philips' Gruppe (s. Abschnitt 2.5.).

Verglichen mit der robusten Rekrutierung des Reporters bei Überexpression von DsRed1-H-Ras (Abb. 25), treten die durch endogen aktiviertes Ras generierten Signale in den Abbildungen 23 bzw. 24 mitunter nur schwach hervor. Das überrascht nicht und ist darauf zurückzuführen, dass nach Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren abhängig vom eingesetzten Zelltyp lediglich zwischen 3 bis 12% des verfügbaren (endogenen) Ras aktiviert werden. So assoziieren in Rat-1 Zellen nach Stimulation mit EGF oder TPA nur bis zu ca. 3% des gesamten zellulären Raf-1 mit Ras (Hallberg *et al.*, 1994). In NIH 3T3 Zellen (ca. 20.000 Ras-Moleküle pro Zelle) werden nach EGF-Stimulation nur ca. 10% des zellulären Ras mit GTP beladen. Dessen Anteil erhöht sich auf ca. 30% in NIH 3T3 Zellen, die konstitutiv-aktives Ras (ca. 275.000 Ras-Moleküle pro Zelle) exprimieren (Ehrhardt *et al.*, 2004, Scheele *et al.*, 1995). Bei Überexpression reichert sich Ras auch in Bereichen ausserhalb der physiologischen Mikrodomänen an (Prior *et al.*, 2003), wodurch Ras nach Stimulation in breiten Arealen der Plasmamembran aktiviert wird (vergleiche Abb. 25 und 23),

was die detektierbaren Signale verstärkt. Konsequenterweise sind die zu erwartenden Effekte für aktiviertes endogenes Ras deutlich schwächer als für überexprimiertes Ras. Hinzu kommt, dass sich die Effekte der Ras-Aktivierung in den aufgenommenen „Filmen“ (s. Abschnitt 3.2.9.1.) besser verfolgen lassen, als dies anhand der gezeigten Einzelbilder in den Abbildungen möglich ist.

- ***Ras-Aktivierung oder nicht- das ist hier die Frage***

Das Auftreten einer Stimulus-abhängigen, verstärkten Plasmamembran-assoziierten Fluoreszenz, vorwiegend in Lamellipodien und *ruffles*, in eGFP-R59A,N64D-3-exprimierenden Zellen wurde in dieser Arbeit als (endogene) „Ras Aktivierung“ interpretiert. Das erfolgte unter der Prämisse, dass die verstärkte Fluoreszenz in diesen Bereichen auf einer realen Rekrutierung des Reporters an Ras-GTP beruht und keinen Artefakt durch Akkumulation mehrerer Membranschichten darstellt.

An der Ausbildung von Lamellipodien EGF-stimulierter Cos Zellen sind u.a. verschiedene kleine GTPasen (Rac, Cdc42, RalA) sowie die PI(3)K beteiligt, während *ruffles* aus Lamellipodien ohne Beteiligung von RalA hervorgehen (Takaya *et al.*, 2004). In beiden Strukturen wurde eine Ras-Aktivierung beobachtet (diese Arbeit). Die in Lamellipodien dokumentierte RalA-Aktivierung (Takaya *et al.*, 2004) ist gleichsam ein Indiz für die Ras-Aktivität. Denn letztere bildet durch Stimulation der RalGEF (Ras-Effektoren) eine notwendige, wenn auch nicht hinreichende, Voraussetzung für die Aktivierung von RalA (Takaya *et al.*, 2004).

Die als „Aktivierung von Ras in *ruffles*“ gedeuteten Änderungen könnten auch die Folge eines durch Rac verursachten *membrane ruffling* sein, wodurch mehrere fluoreszierende Membranabschnitte zusammengeschoben werden und so die Fluoreszenz der Membran verstärken. Es gibt jedoch einige Argumente, die gegen diese These und für die tatsächliche (in dieser Arbeit postulierte) Ras-Aktivierung in *ruffles* sprechen: (1) eGFP-R59A,N64D-3 wird infolge der EGF-Stimulation auch in Bereiche mit *membrane ruffling* rekrutiert und kolokalisiert dort mit dsRed1-H-Ras (Abb. 25). (2) Eine ganze Reihe von Studien beschreibt einheitlich die Assoziation von aktiviertem Ras mit *ruffles* und das trotz Verwendung von z.T. sehr unterschiedlich gearteten Reporterkonstrukten (Bondeva *et al.*, 2002; Chiu *et al.*, 2002; Choy *et al.*, 1999; Hibino *et al.*, 2003; Jiang und Sorkin, 2002; Mochizuki *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen gelten u.a. auch für die in dieser Arbeit eingesetzten Cos Zellen sowie für die Aktivierung des endogenen Ras (Bondeva *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2001). (3) Versuche mit LPA-stimulierten Cos-7 Zellen bestärken die Ansicht einer *ruffles*-unabhängigen Translokation des Reporters (I. Rubio, unveröffentlichte Ergebnisse). LPA stimuliert nämlich die Aktivierung von Ras (Rubio *et al.*, 2003), nicht aber die Rac-abhängige Formation von *ruffles* (Ridley und Hall, 1992). Obwohl das *ruffling* in LPA-stimulierten Cos-7 Zellen ausbleibt, kommt es zu einer Stimulus-abhängigen Translokation von eGFP-R59A,N64D-3 an die Plasmamembran, die beinahe als geschlossener Ring durch den Reporter hervorgehoben wird (siehe Abb. 36; mit freundlicher Genehmigung von I. Rubio). (4) Entgegen der Beobachtung in Swiss 3T3 (Ridley *et al.*, 1992) und KB Zellen (Nishiyama *et al.*, 1994) hemmt H-Ras(S17N) offenbar die Ausbildung von *ruffles* in Cos-7 Zellen (Abb. 26). Dennoch lässt sich in H-Ras(S17N)-exprimierenden Cos-7 Zellen die Aktivierung von Ras nach TPA-Stimulation nachweisen (siehe Abb. 27).

Die starke Vernetzung der Signalwege kleiner GTPasen untereinander, insbesondere der Ras- und Rho-Subfamilien, erschwert eine klare Trennung der beobachteten Effekte. Dennoch sprechen die vorhandenen Daten dafür, dass es sich bei der verstärkten Plasmamembran-assoziierten Fluoreszenz um die Anreicherung von eGFP-R59A,N64D-3 handelt, mit dem die Ras-Aktivierung in Lamellipodien und auch in *ruffles* detektiert wird.

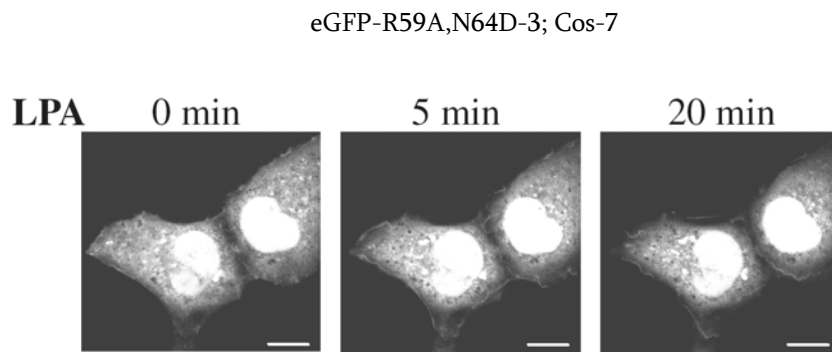


Abb. 36. **Visualisierung des endogenen Ras in Echtzeit nach LPA-Stimulation mit eGFP-R59A,N64D-3.** Cos-7 Zellen wurden mit dem Konstrukt für eGFP-R59A/N64D-3 transfiziert, starviert und mit LPA stimuliert. Die Stimulation führt zur Ras Aktivierung, was sich durch Rekrutierung des eGFP-Reporters nachweisen lässt. Balken 10µm.

- ***Ras am Golgi-Apparat: Lokalisation ohne Aktivierung in vivo?***

Wie eingangs geschildert, wurden neben der Plasmamembran auch andere zelluläre Kompartimente als Orte der Ras-Lokalisation und -Aktivität beschrieben, wie der Golgi-Apparat (Bivona *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2002; de Castro *et al.*, 2004), die Endosomen (Di Fiore und Gill, 1999; Jiang und Sorkin, 2002), Mitochondrien (Denis *et al.*, 2003) oder gar der Zellkern (Wurzer *et al.*, 2001) - zumeist unter Bedingungen einer Überexpression von Ras. Demgegenüber wurde die Ras-Aktivierung *in vivo* mit eGFP-R59A,N64D-3 exklusiv an der Plasmamembran nachgewiesen. Wie lassen sich diese Diskrepanzen zwischen den Daten der verschiedenen Studien interpretieren?

In ihrer ersten Studie beschreibt die Gruppe um M. Philips eine Aktivierung von H-Ras, inklusive des endogenen, neben der Plasmamembran auch am ER und Golgi-Apparat von Cos-7 Zellen (Chiu *et al.*, 2002). In weiteren Arbeiten wurde diese Aktivierung auch für N-Ras, nicht jedoch für K-Ras4B nachgewiesen. Die Befunde wurden auch auf andere Zelltypen wie Jurkat oder HeLa Zellen ausgedehnt und ein Modell der Aktivierung an Endomembranen präsentiert (Bivona *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2002; de Castro *et al.*, 2004). Allerdings beschreiben Arozarena *et al.* (2004) die Plasmamembran und das ER, nicht jedoch den Golgi-Apparat, als Orte der Aktivierung von ektopischem H-Ras. Die postulierte Aktivität von H-Ras und N-Ras am ER/Golgi-Apparat würde neben der Kompartimentierung der Isoformen innerhalb der Plasmamembran eine plausible Erklärung für die Aktivierung Isoform-spezifischer Signalwege liefern (Walsh und Bar-Sagi, 2001; Yan *et al.*, 1998). Die Gültigkeit dieser Resultate konnte allerdings bislang nicht eindeutig für *endogenes* Ras nachgewiesen werden. In Übereinstimmung zu Chiu *et al.* (2002) lässt sich die Aktivierung von überexprimiertem H-Ras oder H-Ras(C181S,C184S) an Endomembranen in Cos-7 Zellen durch Kolo-kalisation mit eGFP-R59A,N64D-3 ebenfalls detektieren. Im Gegensatz zu Chiu *et al.* (2002) wird Ras jedoch nicht infolge der Stimulation mit EGF aktiviert, sondern ist bereits in starvierten, unstimulierten Zellen aktiv (Abb. 25 und Abb. A6). Dieser Befund ist konform zu den Beobachtungen von Jiang und Sorkin (2002), die ebenfalls eine Stimulus-unabhängige Aktivität von ektopischem H-Ras an perinukleären Zellmembranen beschreiben und die Aktivierung als eine Folge der Überexpression von H-Ras betrachten. Demnach eignet sich die Methodik exogenes Ras einzusetzen, um mögliche intrazelluläre Routen aktivierten Ras zu verfolgen, nicht jedoch zur Aufklärung *wo* und *wie* es zur Aktivierung kommt (Walker und Lockyer, 2004). Die von der Gruppe um M. Philips postulierte Ras-Aktivierung an intrazellulären Membranen ist nicht auf die *in vivo* Situation übertragbar. Denn mit keinem der methodisch verschiedenartigen Ansätze, die eine Detektion von Ras-GTP *in vivo* ermöglichen (GFP-RBD-CRD, Raichu-Ras, eGFP-R59A,N64D-3), konnte eine endogene Ras-Aktivität am Golgi-Apparat beobachtet werden- trotz der Verwendung gleicher Zelltypen und Mitogene (Bondeva *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2001 bzw. diese Arbeit, Abb. 23 und 24). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen könnte auf die Art der eingesetzten

Reporterkonstrukte zurückzuführen sein. Eventuell ist die Sensitivität von GFP-RBD-CRD und eGFP-R59A,N64D-3 limitiert und/oder die Affinität der Reporter genügt nicht, um das an Endomembranen befindliche Ras-GTP zu detektieren. Dagegen spricht aber die Beobachtung, dass beide Sonden *in vitro* und *in vivo* mindestens gleichwertig wie die monomere RBD an Ras-GTP binden (Bondeva *et al.*, 2002 und Abb. 10 bzw. 21). Außerdem lässt sich das überexprimierte Ras-GTP im perinukleären Bereich mit GFP-RBD-CRD und eGFP-R59A,N64D-3 nachweisen (Abb. 20 und 21), was für die Funktionalität der Sonden spricht endomembran-ständiges, aktives Ras zu detektieren. Vielleicht ist der mutmaßliche Anteil des endogenen, perinukleären Ras-GTP aber zu gering, um ein Fluoreszenzsignal mit GFP-RBD-CRD bzw. eGFP-R59A,N64D-3 gegenüber dem Hintergrund (im Zytoplasma lokalisierte GFP-Reporter) zu generieren. Die Hintergrund-Fluoreszenz entsteht zum einen durch den fluoreszierenden Kern und zum anderen durch die im Zytoplasma angereicherten GFP-Reporter. Dies wäre auch eine Erklärung für das Unvermögen die Ras-Aktivität mittels eGFP-R59A,N64D-3 an anderen dokumentierten intrazellulären Organellen wie Mitochondrien oder Endosomen zu detektieren.

Auch Mochizuki *et al.* (2001) konnten mit ihrem Raichu-Ras Reporter keine Aktivierung des endogenen Ras im Bereich des ER/Golgi-Apparates beobachten. Möglicherweise verhindert dabei die verwendete CAAX-Box von K-Ras 4B als Membrananker im Raichu-Ras Konstrukt eine Detektion der Golgi-Aktivierung (Walker und Lockyer, 2004). Durch diese Konstruktion wird Raichu-Ras eventuell anders prozessiert als H-Ras und N-Ras. Untersuchungen mit Raichu-RalA Konstrukten haben aber gezeigt, dass sich trotz Verwendung unterschiedlicher Membrananker ein vergleichbares Bild der Ral-Aktivierung ergibt (Takaya *et al.*, 2004). Folglich scheint die Art der Membranverankerung bei den Raichu Probe(n) eine untergeordnete Rolle bei der Detektion der Aktivierung zu spielen. Trifft diese Beobachtung auch auf Raichu-Ras zu, lässt sich das Ausbleiben der Detektion einer Golgi-Aktivierung in Cos Zellen nicht mit der verwendeten CAAX-Box von K-Ras 4B erklären. Zudem sprechen weitere wichtige Argumente gegen eine Aktivierung des endogenen Ras im Bereich des ER/Golgi-Apparates: zum einen postulieren Chiu *et al.* (2002) die perinukleäre Aktivierung des endogenen Ras-GTP unter Verwendung einer einzelnen RBD (CFP-RBD) als Reporter („bystander“ FRET). Anderen Studien zufolge reicht jedoch eine einzelne RBD (entspricht WT-1) nicht aus, um *endogenes* Ras zu detektieren (u.a. im gleichen Zelltyp) (Bondeva *et al.*, 2002; de Castro *et al.*, 2004). Unter Verwendung Ras-spezifischer Antikörper konnte die Lokalisation auch von endogenem H-Ras und N-Ras in der Nähe des Zellkerns dokumentiert werden. Anhand der Koloalokalisation mit spezifischen Markern (z.B. anti-Giantin) wurde diese intrazelluläre Region als Golgi-Apparat identifiziert (Choy *et al.*, 1999; de Castro *et al.*, 2004; Jiang und Sorkin, 2002). Aufgrund der Prozessierung von H-Ras und N-Ras ist der Nachweis der endogenen Proteine am Golgi-Apparat auch nicht überraschend. de Castro *et al.* (2004) stellen diese Beobachtung mit einer N-Ras-spezifischen Aktivierung am Golgi-Apparat in Jurkat Zellen zusammen- die Aktivierung selbst wird allerdings nur unter Bedingungen der N-Ras Überexpression gezeigt. Da die verwendeten Antikörper aber nicht spezifisch aktiviertes Ras detektieren, kann man aus diesen Untersuchungen nicht ableiten, ob es sich um GDP- und/oder GTP-beladenes Ras handelt. Deshalb belegen diese Ergebnisse allein die Lokalisation nicht aber die Aktivität von endogenem Ras am Golgi-Apparat. Die Tatsache, dass endogenes Ras perinukleär lokalisiert ist, und überexprimiertes Ras an Endomembranen aktiv ist, lässt sich nicht unifizieren. Denn die Überexpression von Ras beeinflusst wesentlich die Lokalisation und Funktionalität von Ras und induziert unphysiologische Effekte. So konnten Babia *et al.* (1999) zeigen, dass die exogene Expression von N-Ras die Architektur des Golgi-Komplexes verändert, auf das Aktin-Zytoskelett einwirkt und den konstitutiven Proteintransport vom *trans*-Golgi Netzwerk zur Zelloberfläche steigert. Die freien Bindestellen innerhalb der Plasmamembran, deren Zahl limitiert ist, werden durch exogenes Ras abgesättigt. Infolge der Überexpression und durch den kontinuierlichen Transport reichert sich Ras jedoch auch in unphysiologischen Bereichen der Plasmamembran außerhalb der Mikrodomänen an (Prior *et al.*, 2003). Darüber hinaus übersteigt ein Überschuss von Ras die Kapazität der am Transport zur Plasmamembran beteiligten Faktoren und resultiert in einer massiven Akkumulation von Ras im ER/Golgi-Apparat (Chiu *et al.*, 2002; Abb. 25). Dadurch werden vermutlich ER-assoziierte GEF aktiv (Arozarena *et al.*, 2004), die Ras im perinukleären Areal aktivieren. Im Einklang mit (Jiang und Sorkin, 2002) und den Befunden dieser Arbeit, scheint der postulierte Modus der Ras-Aktivierung am ER/Golgi-Apparat eher die Konsequenz der Überexpression von Ras und weniger ein physiologisches Ereignis zu sein.

- ***Aktiviertes Ras an anderen Zellorganellen?***

Mit eGFP-R59A,N64D-3 als Sonde für aktiviertes, endogenes Ras wurde unter den eingesetzten Versuchsbedingungen eine vorwiegende Aktivierung an der Plasmamembran, nicht aber an anderen Organellen wie Mikrotubuli, Endosomen oder Mitochondrien beobachtet. Der Unterschied ist möglicherweise auf die Verwendung anderer Zelltypen, Stimuli oder auf die Überexpression von Ras in anderen Studien zurückzuführen. Nicht zuletzt hängt die räumlich/zeitliche Aktivierung von Ras vermutlich auch von den äußeren und zeitlichen Konditionen ab. So ist es z.B. denkbar, dass an den Mitochondrien lokalisiertes Ras (Denis *et al.*, 2003) erst im Verlauf der Apoptose dort aktiviert wird (nicht getestet). In der T-Zelllinie TS1 $\alpha\beta$ wird H-Ras erst nach Induktion der Apoptose an die Mitochondrien umverteilt, während N-Ras unabhängig davon mit den Mitochondrien assoziiert ist (Rebollo *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurde auch die Assoziation von K-Ras4B mit Mikrotubuli beschrieben, die als Transportweg für neu-synthetisiertes, farnesyliertes K-Ras zur Plasmamembran diskutiert werden (Chen *et al.*, 2000; Thissen *et al.*, 1997). Die Bedingungen dieser Interaktion sind bislang jedoch nicht aufgeklärt (Silvius, 2002). Bei Expression hochaffiner eGFP-MSOR fluoreszieren auch zytoskelett-ähnliche Strukturen, was eventuell auf die Assoziation von Ras-GTP mit Zytoskelett hindeutet (Abb. 13). Unter welchen Bedingungen es dazu kommt, welcher Natur diese Strukturen sind und warum dies nur in Gegenwart hochaffiner MSOR zu beobachten ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht und bleibt daher unbeantwortet. Möglicherweise induziert die Expression hochaffiner MSOR Bedingungen, unter denen aktives Ras an das Zytoskelett transloziert oder Ras dort aktiviert wird. In diesem Zusammenhang sei noch darauf verwiesen, dass Myosin IXb aufgrund seiner RA-Domänen mutmaßlich als Ras-Effektor fungiert. Myosin IXb assoziiert mit Aktinfilamenten, arbeitet als Motorprotein und besitzt interessanterweise eine GAP-Domäne für Rho (Post *et al.*, 2002).

Eine Reihe von Arbeiten beschreibt die durch den EGFR-vermittelte Initiation von Signalwegen aus Endosomen heraus (Di Fiore und Gill, 1999; Haugh *et al.*, 1999). Jiang und Sorkin (2002) wiesen durch Immunofärbung mit einem Ras-spezifischen Antikörper auch endogenes Ras in Endosomen fixierter A-431 Zellen nach. Dort kolokalisiert es mit Grb2 und Rhodamin-gefärbtem EGF, was die Präsenz des internalisierten EGFR belegt. Obwohl eGFP-R59A,N64D-3 und heterolog exprimiertes dsRed1-H-Ras bzw. H-Ras(C181S,C184S) auch in vesikulären, endosomen-ähnlichen Strukturen in Cos-7 Zellen kolokalisieren (Abb. 21 und A6), konnte mit eGFP-R59A,N64D-3 keine stimulusbedingte Aktivierung des endogenen Ras in Endosomen beobachtet werden. Dies lässt sich möglicherweise wiederum dadurch erklären, dass sich die Fluoreszenz von eGFP-R59A,N64D-3 gebunden an endosomal lokalisiertes Ras-GTP nicht deutlich genug von der Hintergrundfluoreszenz des im Zytoplasma befindlichen eGFP-R59A,N64D-3 abhebt. Außerdem zeigen Jiang und Sorkin (2002) in ihrer Arbeit durch Expression von H-Ras(G12V), H-Ras(S17N) bzw. H-Ras, dass die Assoziation von H-Ras mit Endosomen unabhängig von der GTP/GDP-Beladung oder Stimulation mit EGF erfolgt. Daher könnte das *endogene* Ras in den Endosomen auch vorwiegend GDP beladen sein und würde deshalb den Reporter nicht rekrutieren.

- ***Ras-Aktivität im Zellkern-Aufbruch zu neuen Sphären?***

GFP (~27kD) verteilt sich gleichmäßig im Zytoplasma (inklusive des Zellkerns) transfizierter Zellen und gelangt wahrscheinlich durch ungerichtete Diffusion durch die Kernporen in den Nukleus. Das Bild eGFP-MSOR exprimierender Zellen (u.a. Cos-7, NIH 3T3, HeLa) unterscheidet sich davon im Hinblick auf den Zellkern deutlich. Denn die Konstrukte akkumulieren im Nukleus, der sich klar umrissen vom Zytoplasma abzeichnet (z.B. Abb. 13, 18 oder 21). Dieses Phänomen lässt sich auch bereits bei Expression einer einzelnen GFP-RBD beobachten (Bondeva *et al.*, 2002; Chiu *et al.*, 2002). Sollte diese Auffälligkeit auf eine spezifische/gezielte Translokation der RBD/MSOR in den Zellkern zurückzuführen sein? Obwohl dieser Umstand im Rahmen in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde, lassen sich in der Literatur Anhaltspunkte für eine solche Möglichkeit finden. Nach Schlenstedt (1996) besitzt Raf-1, von dem die verwendete RBD stammt, keine Kernlokalisationssequenz (NLS). Dennoch haben (Wang *et al.*, 1998) auch Raf-1 im Zellkern nachgewiesen. Dieser Studie zufolge gelangt Raf-1 durch Interaktion mit dem Retinoblastomprotein (Rb) in den Nukleus. Die Autoren konnten einen Abschnitt im N-Terminus von Raf-1

(AS-Reste 1-28) identifizieren, der die Bindung an Rb vermittelt. Dieser Abschnitt liegt allerdings außerhalb der RBD, so dass die Kern-Translokation der RBD/MSOR wahrscheinlich nicht durch Rb vermittelt wird. Möglicherweise gibt es aber andere Proteine, welche die RBD binden und in den Kern übergehen. Könnte eines dieser Kern-transmissiblen/-ständigen Protein auch (aktives) Ras selbst sein? Tatsächlich konnten Wurzer *et al.* (2001) aktiviertes Ras im Nukleus von H-Ras(G12V)-transformierten, embryonalen Rattenzellen nachweisen. Guil *et al.* (2003) beschreiben, dass wie bei *K-ras* auch aus dem *H-ras* Gen durch alternatives Spleißen zwei Proteine, H-Ras (p21^{Ras}) und H-RasIDX (p19^{Ras}) hervorgehen. Die p19^{Ras} mRNA ist in einer ganzen Reihe verschiedener Zelllinien und Geweben von Säugern nicht jedoch Vögeln nachweisbar und entsteht ungefähr gleich häufig wie p21^{Ras}. p19^{Ras} fehlt das C-terminale CAAX-Motiv, weshalb das Protein auch nicht farnesyliert wird. Aufgrund dessen gelangt p19^{Ras} (ektopisches oder endogenes) nicht wie p21^{Ras} zum Golgi-Apparat und in die Plasmamembran, sondern ist im Zytoplasma und Nukleus von HeLa und Cos-1 Zellen lokalisiert. Die Verteilung innerhalb des Zellkerns ist fleckenartig (*speckles*), konzentriert sich bei Cos-1 Zellen aber auch in den Nukleoli. Im Einklang mit den Ergebnissen von Guil *et al.* (2003) steht auch die Beobachtung, dass die farnesylierungsdefiziente H-Ras Mutante C186S, nicht aber H-Ras oder H-Ras(C181S,C184S) ebenfalls im Zellkern akkumuliert (Chiu *et al.*, 2002) und dort mit eGFP-MSOR kolokalisiert (Abb. 18 und 21). Die im Zellkern angereicherten eGFP-MSOR lassen sich z.T. auch in den Nukleoli nachweisen (Abb. 22), was auch für Raf-1 gezeigt wurde (Lu *et al.*, 1998). Eine Ras-vermittelte Rekrutierung der MSOR in den Zellkern setzt die GTP-Beladung von Ras voraus. Allerdings verfügt p19^{Ras} kaum über GTP-bindende Aktivität. Dementsprechend interagiert es im Zwei-Hybrid-Assay auch nicht mit bekannten Ras Effektoren wie Raf-1, Rin-1, PI3K oder RalGDS, interessanterweise aber mit sich selbst (Guil *et al.*, 2003).

Eine Präsenz von aktiviertem Ras im Zellkern, wofür die Akkumulation der eGFP-MSOR ein Indiz ist, wäre durchaus denkbar, da es auch eine Vielzahl von Signalproteinen gibt, die über ihre primäre Lokalisation/Funktion hinaus in den Zellkern überwechseln und dort ebenfalls biologisch aktiv sind (Lin *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002; Smolikov und Krauskopf, 2003). Neben Transmembranrezeptoren für Wachstumsfaktoren wie FGF und EGFR (Wells und Marti2002), wurden auch Grb2 (Jiang und Sorkin2002; Romero *et al.*, 1998), Raf-1 (Lu *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998), MEK (Adachi *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2001), *kinase suppressor of Ras* (KSR) (Brennan *et al.*, 2002), PI(3)K C2 α (Didichenko und Thelen, 2001), PKC (Alessenko und Burlakova, 2002) oder auch Akt (Borgatti *et al.*, 2003; Pekarsky *et al.*, 2000) sowie Austauschfaktoren für kleine GTPasen wie Vav (Clevenger *et al.*, 1995), Net1 (Schmidt und Hall, 2002) oder der Ras Effektor Tiam 1 (Otsuki *et al.*, 2003) im Zellkern detektiert. Wie diese Auflistung zeigt, handelt es sich dabei um Proteine, die eng mit der Ras-Signaltransduktion verknüpft sind. Darüber hinaus wurden mit Rap1 (Mitra *et al.*, 2003) und Rac1 (Lanning *et al.*, 2003) auch zwei kleine GTPasen der Ras-Superfamilie im Nukleus gefunden. Interessanterweise erfolgt die Translokation beider Proteine spezifisch in ihrer GTP-gebundenen, d.h. aktivierten Form, während die GDP-gebundenen Varianten im Zytoplasma zurückgehalten werden. Lanning *et al.* (2003) demonstrierten, dass die polybasische Region (PBR) im C-Terminus von Rac1 eine funktionelle NLS darstellt. So stimuliert Rac1-GTP die Akkumulation von SmgGDS und p120 Catenin im Zellkern. SmgGDS besitzt GEF-Aktivität u.a. für Rac1 (s. Abschnitt 2.3.), multiple ARM-Motive und eine NLS-Bindestelle (WXXXN Motiv). Anhand ihrer Daten haben Lanning *et al.* (2003) folgendes Modell der PBR-induzierten Kern-Translokation entworfen: SmgGDS bildet mit Rac1 einen Komplex im Zytoplasma und stimuliert die Beladung von Rac mit GTP. Durch Interaktion der als NLS wirkenden PBR von Rac1 mit den Armadillo-Domänen von SmgGDS translozieren beide Protein gemeinsam in den Zellkern. Im Nukleus dissoziiert dieser Komplex wieder und die NES von SmgGDS vermittelt den Export des Proteins aus dem Kern. Die Interaktion mit Proteinen wie u.a. SmgGDS oder RhoGDI bietet eine Erklärung, wie die kern-transmissiblen kleinen GTPasen, die über Lipidanker in der Plasmamembran residieren, aus dieser herausgelöst (extrahiert) werden (Hoffman *et al.*, 2000; Nakanishi *et al.*, 1994). Doch nicht jede PBR kleiner GTPasen stellt eine funktionelle NLS dar; die PBR von RhoA wirkt nicht als NLS. Folglich akkumuliert weder RhoA selbst im Kern noch ist es in der Lage den Import von SmgGDS (das aber ein GEF für RhoA ist) zu stimulieren (Lanning *et al.*, 2003). Danach konkurrieren kleine GTPasen mit und ohne funktionelle NLS um Kerntransporter wie SmgGDS, das abhängig vom Bindungspartner im Zytoplasma sequestriert wird (ohne funktionelle NLS, z.B. Rho) oder in den Zellkern übergeht (funktionelle NLS, z.B. Rac1). Wie eingangs beschrieben, besitzt SmgGDS auch GEF Aktivität für Cdc42, K-Ras 4B, Rap1B (Yaku *et al.*, 1994), RalA und Rap1A (Rebhun *et al.*, 2000). Für die Interaktion von SmgGDS und Rap1 ist der intakte C-Terminus inklusive der PBR von Rap1 nötig (Kotani *et al.*, 1992). Mitra

et al. (2003) konnten tatsächlich die Akkumulation von Rap1-GTP im Zellkern belegen. Das lässt vermuten, dass diese aktivierten kleinen GTPasen und SmgGDS sowie andere Armadillo-Proteine durch Interaktion miteinander die gegenseitige Akkumulation im Zellkern stimulieren. Des weiteren reichert sich die GFP-markierte Rac-Bindedomäne von PAK1 (GFP-PAK1) und der Cdc42-Effektor N-WASP ähnlich wie die GFP-RBD/MSOR nach Transfektion der Zellen im Nukleus an (Suetsugu und Takenawa, 2003; Zhou *et al.*, 2003). Deshalb scheint es durchaus denkbar, dass auf einem solchen Weg auch spezifisch K-Ras4B mit seiner PBR- jedoch keine der anderen Ras Isoformen- in den Zellkern gelangt. Aufgrund seiner Größe (ca. 21kD) könnte Ras auch passiv durch die Kernporen in den Kern diffundieren. Eine NLS erscheint aber nötig für den Eintritt in den Kern, wenn Ras in Proteinkomplexe eingebunden ist, die zu groß für eine passive Diffusion sind (Williams, 2003).

Um die Existenz von Ras im Zellkern nachzuweisen, könnten *in vitro* und *in vivo* Studien angewandt werden. Zum einen ließe sich mit dem MSOR-Konstrukt (GST-Tag) putativ Kern-lokalisiertes Ras-GTP aus dem Kernextrakt MSOR exprimierender Zellen herauslösen (*pull-down* Assay) und mit einem Ras-spezifischen Antikörper im Immunoblot nachweisen. Zum anderen könnte durch Behandlung von Zellen mit Leptomycin B, einem potenten Inhibitor des Kernexports, eine Akkumulation von fluoreszenzmarkiertem K-Ras4B im Zellkern dokumentiert werden. Unter diesen Bedingungen würde sich Ras im Zellkern anreichern. Bislang allerdings sind der Mechanismus sowie die Konditionen der mutmaßlichen Kern-Translokation von Ras ebenso ungeklärt, wie die Frage welche(s) Ras Protein(e) im Kern akkumuliert.

Dennoch bekräftigen die Beobachtungen und verfügbaren Daten die Vermutung, dass die Akkumulation der eGFP-MSOR im Nukleus nicht auf einem unspezifischen Effekt, sondern vielmehr auf der Interaktion mit Ras-GTP im Kern beruht. Der tatsächliche Nachweis von aktivem Ras im Zellkern, wäre wirklich das zelluläre Pendant zum Leben auf dem Mars und würde eine neue Dimension der Ras-Signaltransduktion eröffnen. Insgesamt wurde mit eGFP-R59A,N64D-3 keine Assoziation des *endogenen* Ras-GTP mit Endomembranen oder Organellen außer dem Zellkern und der Plasmamembran beobachtet. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge kommt es exklusiv an der Plasmamembran zur Aktivierung von endogenem Ras.

5.2.3. Modulation und Inhibition der Ras-Hyperaktivität

- ***Differentielles Verhalten der MSOR-Varianten auf die Ras-stimulierte MAPK-Aktivierung***

Die Ras-gesteuerte Aktivierung der MAPK stellt einen besonders gut untersuchten Signalweg in verschiedenen zellulären Systemen dar. Deshalb wurde in einer Vielzahl von Studien die Beeinflussung der Ras-Aktivität anhand einer veränderten Phosphorylierung/Aktivierung der MAPK „gemessen“ (Bondeva *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde mit der Ras-induzierte ERK2-Phosphorylierung/Aktivierung ein etabliertes Testsystem eingesetzt, um die blockierende Wirkung der verschiedenen eGFP-MSOR Konstrukte (Mono- und Trimere des WT, R59A bzw. R59A,N64D) *in vivo* zu testen. Hierbei wurde die Phosphorylierung des heterolog exprimierten HA-ERK2-Konstruktes (nachfolgend als ERK2 bezeichnet) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten quantitativ erfasst und dargestellt (Abb. 30). Bereits die *in vitro* Analysen hatten gezeigt, dass die vorhandenen MSOR-Konstrukte ein Spektrum von Nichtbindern (z.B. R59A,N64D-1) bis hin zu hochaffinen Ras-GTP-bindenden Molekülen (u.a. WT-1; WT-3; R59A-3) bieten (Abschnitt 4.1.3.6.2. und 4.1.2.2.). Dies spiegelte sich auch in Kollaborationsstudien der eGFP-MSOR mit DsRed1-Ras Varianten in Cos-7 Zellen wieder (Abb. 18 und 21). Überraschenderweise zeigte sich auf Ebene der Signaltransduktion ein differentielles Bild (Abb. 30). Dabei treten die hier zu beobachtenden Variationen abhängig vom eingesetzten Zelltyp auf. In NIH 3T3 Zellen verhalten sich die eGFP-MSOR entsprechend ihrer Affinität für Ras-GTP: die verwendeten Trimere senken einheitlich die ERK2-Phosphorylierung deutlich stärker (ca. 60%) als die entsprechenden Monomere (ca. 40% oder weniger). Die inhibierende Wirkung selbst schwach Ras-bindender MSOR-Monomere in diesen Zellen ist vermutlich auf die starke Überexpression der Konstrukte zurückzuführen. In ähnlicher Weise wie für die Trimere finden auch Bondeva *et al.* (2002) eine Inhibition der ERK2-Aktivität

von etwa 60% mit dem stark Ras-GTP bindenden GFP-RBD-CRD Reporter in Ras-transformierten NIH 3T3 Fibroblasten. Auch in Cos-7 Zellen senkt dieses Konstrukt die H-Ras(G12V)-induzierte ERK2 Antwort um ca. 70% (Bondeva *et al.*, 2002). In dieser Arbeit zeigte einzig eGFP-R59A,N64D-3 einen inhibierenden Effekt (ca. 50%) in Cos-7 Zellen (Abb. 30B). Demgegenüber interferieren weder die Monomere noch die hochaffinen Ras-Binder eGFP-WT-3 bzw. -R59A-3 mit der onkogenen H-/K-Ras-stimulierten ERK2-Phosphorylierung in diesem Zelltyp. Während R59A-1 und R59A,N64D-1 weder *in vitro* noch *in vivo* aktiviertes Ras binden, überrascht das Verhalten von eGFP-WT-1 bzw. -3 und eGFP-R59A-3. Denn diese MSOR interagieren im GAP-Assay und koloalisieren in Cos-7 Zellen mit Ras-GTP (Abb. 10, 16 und A4). Darüber hinaus erweisen sich diese hochaffinen MSOR als effiziente Blocker der H-/K-Ras(G12V)-induzierten MAPK-Phosphorylierung in NIH 3T3 Fibroblasten (Abb. 30A). Die offenbar fehlende Inhibition der ERK2-Phosphorylierung in Cos-7 Zellen in Gegenwart der hochaffinen MSOR sowohl im H-Ras als auch K-Ras Ansatz spricht für eine physiologische Relevanz dieser Beobachtung. Eventuell lassen sich diese zwischen Cos-7 und NIH 3T3 Zellen abweichenden Reaktionen auf eine Interspezies- oder Zelltyp-spezifische Regulation zurückführen (siehe Abschnitt 2.6.). In diesem Zusammenhang besteht aber der wesentlichere Unterschied zwischen beiden Zelltypen möglicherweise darin, dass es sich bei Cos-7 um eine transformierte Zelllinie handelt. Wie eingangs beschrieben spielt die Aktivierung des MAPK-Signalweges- und dabei insbesondere die permanente Aktivierung- eine zentrale Rolle bei der Initiation und Aufrechterhaltung eines transformierten Phänotyps (Balmanno und Cook, 1999; Fisher *et al.*, 2001). Vermutlich wird Ras-GTP in Zellen durch hochaffine MSOR-Konstrukte wie z.B. eGFP-WT-3 permanent gebunden und sequestriert. Dadurch würde Ras von der ERK2-Aktivierung entkoppelt, die durch Ras-alternative Signalwege (nicht durch MSOR geblockt) in den Cos-7 Zellen restituiert werden könnte. Die „konstitutive“ Bindung der hochaffinen MSOR-Konstrukte *in vivo* wurde zwar nicht direkt nachgewiesen, aber einige der Resultate deuten darauf hin. Zum einen wird im GAP-Assay in Gegenwart von WT-3, wie auch bei anderen hochaffinen MSOR, selbst nach 20min deutlich weniger Ras-GTP als im Kontrollansatz umgesetzt (Abb. 10). Das ließe sich mit einer permanenten Interaktion von Ras/WT-3 erklären, wodurch Ras-GTP effektiv gegen NF-1 abgeschirmt wird. Zum anderen induziert eGFP-WT-3 in Cos-7 Zellen ohne Ras-Überexpression Apoptose (Abb. 15). Dies erfolgt wiederum vermutlich dadurch, dass Ras und damit ein essentieller Faktor für das Überleben von Fibroblasten sequestriert wird (Abschnitt 5.2.1.). Gegenüber eGFP-WT-3 weist eGFP-R59A,N64D-3 eine deutlich geringere Affinität für Ras-GTP auf und interagiert mutmaßlich „transient“ damit. D.h. aktives Ras wird, wie die *in vitro* und *in vivo* Daten zeigen, effizient gebunden (Abb. 20 und 21), aber nicht vollständig sequestriert. Dementsprechend induziert eGFP-R59A,N64D-3 im Gegensatz zu eGFP-WT-3 auch keine Apoptose (Abb. 19) und ist trotzdem in der Lage die H-/K-Ras(G12V)-induzierte ERK2-Phosphorylierung in Cos-7 Zellen zu senken (Abb. 30). Die Reduktion der ERK2-Antwort um ca. 50% ist deutlich, aber keineswegs vollständig. Die Expression niederaffiner MSOR in transformierten Zellen kann also die ERK2-Aktivierung effektiv hemmen, ohne die oben postulierte Gegenregulation einzuleiten. eGFP-R59A,N64D-3 ist das einzige der untersuchten MSOR-Konstrukte, das (1) die H-/K-Ras(G12V)-initiierte ERK2-Antwort in Cos-7 und NIH 3T3 Zellen effizient inhibiert (Abb. 30) und bei dem sich (2) der Effekt zwischen den Ras-Isoformen unterscheidet. Denn eGFP-R59A,N64D-3 hemmt deutlich stärker die K-Ras- als die H-Ras-stimulierte ERK2-Antwort (ca. 60% bzw. 20%) in NIH 3T3 Fibroblasten. Das spiegelt sich qualitativ auch in den Ergebnissen der *MMP-1*-Genexpression in diesem Zelltyp wieder (Abb. 31). Dieser Befund überrascht nicht, stellen doch ERK1/2 und *MMP-1* bekannte Ziele Ras-induzierter Signalwege dar (Futamura *et al.*, 2001; White *et al.*, 1997). Die Konsistenz der Beobachtung in zwei methodisch verschiedenen Ansätzen verdeutlicht vielmehr die Relevanz eines Ras Isoform-spezifischen Effektes. Allerdings fällt es schwer diese Beobachtung zu erklären. Denn Untersuchungen mit rekombinant aufgereinigten Proteinen haben gezeigt, dass sich die Affinität der (einzelnen) RBD für K-Ras, H-Ras bzw. N-Ras kaum unterscheidet (Herrmann *et al.*, 1995). Zudem aktiviert K-Ras4B die Raf-1 > MAPK-Kaskade in Cos-1 Zellen viel stärker als H-Ras (Voice *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1998). Diesen Zusammenhang haben auch Li *et al.* (2004) nach Transfektion geringer *ras*-DNA-Mengen (1-10ng) in NIH 3T3 Zellen beobachtet. Bei Verwendung höherer DNA-Mengen (50ng/200ng) hebt sich der Unterschied zwischen der K-Ras4B- und H-Ras-stimulierten MAPK-Aktivierung allerdings auf. Bei den eigenen Untersuchungen wurde 1µg *ras*-DNA eingesetzt und K-Ras4B und H-Ras stimulieren in Übereinstimmung zu Li *et al.* (2004) nahezu gleich stark die ERK2-Phosphorylierung in NIH 3T3 und Cos-7 Zellen (nicht gezeigt). Demzufolge sollte eGFP-R59A,N64D-3 die ERK2-Antwort unabhängig von der eingesetzten Ras-Isoform hemmen, wie dies zwar in Cos-7 nicht aber NIH 3T3 Zellen zu beobachten ist. Die

unterschiedliche Wirkung von eGFP-R59A,N64D-3 in NIH 3T3 muss also auf einer Spezifität dieses Zelltyps beruhen. Eventuell sind aber auch die Modalitäten der Ras/RBD-Interaktion *in vivo* generell andere als *in vitro* (siehe Abschnitt 5.1.) und/oder eGFP-R59A,N64D-3 bindet K-Ras *in vivo* mit einer anderen Kinetik als H-Ras, was durch Elemente in der unmittelbaren, intrazellulären Umgebung (Mikrodomänen) der Isoformen determiniert werden könnte.

- ***MSOR und die Ras-stimulierte Genexpression transformations-relevanter Faktoren***

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die MSOR in Ras-initiierte Signalwege eingreifen und die Aktivierung der MAPK effektiv hemmen, wurde untersucht, ob sich dieser Einfluss auch im Transkriptionsprofil zeigt. Zunächst wurden die Auswirkungen der eGFP-MSOR auf die Ras-induzierte Transkription von *MMP-1* untersucht, das im Bereich seines Promotors ein Ras-responsives Element (RRE) trägt und durch Ras reguliert wird (Chinenov und Kerppola, 2001). Die Relevanz dieser Untersuchung im Hinblick auf eine mutmaßlich transformationshemmende Wirkung der MSOR ergibt sich zum einen daraus, dass sich Änderungen im mRNA-Spiegel von *MMP-1* oder *MMP-9* direkt auf die entsprechenden Proteinspiegel auswirken (Futamura *et al.*, 2001). Zum anderen belegen verschiedene Arbeiten die wichtige Rolle der MMP in Transformationsmodellen wie dem Matrigel-Invasions-Assay oder Soft-Agar-Assay (Moon *et al.*, 2000), sowie bei der Tumordinvasion und Metastasierung, indem sie zum Abbau der ECM, dem Tumorwachstum (Curran und Murray, 1999 und 2000) und der Neo-Vaskularisation (Ribatti *et al.*, 1999) beitragen. Die Reporteragen-Analyse ergab (Abb. 31), dass eGFP-WT-3 die H-/K-Ras(G12V)-stimulierte Transkription von *MMP-1* in NIH 3T3 Zellen deutlich inhibiert (ca. 60%). Überraschenderweise zeigte eGFP-WT-1 unter diesen Bedingungen keinen inhibierenden Effekt und eGFP-R59A,N64D-3 senkte selektiv nur die K-Ras(G12V)-stimulierte Genexpression (ca. 30%). Da insbesondere eGFP-WT-3 einen deutlichen Einfluss auf die Expression von *MMP-1* zeigte, wurde dessen Wirkung auf die K-Ras4B(G12V)-vermittelte Transkription weiterer Gene mit einem cDNA-Array untersucht (Abb. 32). Auf diesem Array befinden sich Genabschnitte von Proteasen (MMP, Cathepsine Caspasen), deren Regulatoren, Integrinen oder auch Transkriptionsfaktoren (siehe Abschnitt 3.2.11.).

Interessanterweise zeigen die Ergebnisse des cDNA-Array, dass konstitutiv-aktives K-Ras4B die Transkription bekannter Ras-Zielgene gegenüber der Kontrolle in Cos-7 Zellen sehr differentiell reguliert. Während K-Ras4B(G12V) die mRNA-Spiegel u.a. von *uPA* oder *cathepsin L* deutlich erhöht, bleibt dies für andere Gene aus. Letzteres überrascht insbesondere für die *MMP*, tragen doch eine ganze Reihe der MMP-Gene wie *MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-9* im Promotor ein *Ras-responsive element* (RRE) oder besitzen ein RRE-ähnliches Enhancer-Motiv (Chinenov und Kerppola, 2001). Außerdem konnte im Reporteragen-Assay allerdings in NIH 3T3 Zellen- gezeigt werden, dass *MMP-1* positiv durch onkogenes Ras reguliert wird (Abb. 31). Das dies in Cos-7 Zellen nicht so ist, liegt wahrscheinlich an einer Zelltyp- oder Ras-Isoform-spezifischen Regulation, wie sie bereits beschrieben wurde. So induziert H-Ras die Expression von *MMP-2*, während N-Ras die von *MMP-9* in MCF-10A Zellen anregt (Moon *et al.*, 2000). Zudem wird die Genexpression von *MMP-9* zwar in Ras-transformierten NIH 3T3 Fibroblasten stimuliert, nicht jedoch in Ras-transformierten ROSE Zellen (Futamura *et al.*, 2001; Ulku *et al.*, 2003). Möglicherweise lässt sich in ähnlicher Weise die K-Ras4B(G12V)-stimulierte Induktion der Transkription von *MMP-1* in NIH 3T3 Zellen aber deren Ausbleiben in Cos-7 Zellen erklären. Darüber hinaus spielt wohl auch der Zeitpunkt der Probenanalyse eine wichtige Rolle. So beobachteten (Schulze *et al.*, 2001) zwar einen Raf-1-stimulierten Anstieg in der Genexpression von *integrin $\alpha 5$* (Fibronectin-Rezeptor), *LIF* oder *MMP-1* in MCF-10A Zellen- aber erst 72h nach Induktion der Raf-1-Aktivität.

Unter den K-Ras4B(G12V)-induzierten Genen sind mit z.B. *Cathepsin L* oder *uPA* (*Urokinase-type Plasminogen activator*) auch solche, deren Genprodukte bekanntermaßen an der Steuerung der zellulären Transformation, oder Tumorigenese beteiligt sind. So korreliert z.B. eine starke Urokinase-Expression mit einer schlechten Prognose für Patienten mit Brust- oder Lungenkrebs (Choong *et al.*, 1996). *uPA*, das wie die *MMP* ebenfalls über ein RRE-ähnliches Enhancer-Motiv verfügt, stellt ein bekanntes Zielgen von Ras dar (Ried *et al.*, 1999). Dabei wird die Expression der Urokinase auf Transkriptionsebene reguliert (Lengyel *et al.*, 1996; Nerlov *et al.*, 1991). Durch Bindung an den Urokinase-Rezeptor (uPAR) aktiviert uPA

membranständig die zell-assoziierte Serinprotease Plasmin aus Plasminogen, die wie HGF über eine Kringle-Domäne verfügt. Plasmin selbst kann direkt ECM-Komponenten wie Fibronectin, Vitronectin oder Laminin degradieren aber auch ECM-abbauende Metalloproteasen aktivieren (Blasi und Carmeliet, 2002; Liotta *et al.*, 1981; Wilhelm *et al.*, 1990). Dadurch wird eine proteolytisch aktive Zelloberfläche geschaffen, die z.B. Tumorzellen die Migration durch die ECM ermöglicht (Blasi, 1993). Auch Cathepsine vermitteln die Migration von Zellen, indem sie die ECM abbauen. Dies kann einmal intrazellulär nach Makropinozytose der Matrix oder extrazellulär durch Sekretion der Proteasen erfolgen (Premzl *et al.*, 2003). Eine erhöhte Cathepsin L Expression korreliert mit dem metastasierenden Potential Ras-transformierter Mausfibroblasten (Chambers *et al.*, 1992), wohingegen die Blockade von Cathepsin L die Tumorigenizität maligner Zelllinien reduziert (Kirschke *et al.*, 2000). Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass Ras die Transkription und Proteinexpression von Cathepsin L stimuliert, während die Expressionslevel von Cathepsin B und D unverändert bleiben (Collette *et al.*, 2004; Zhang und Schultz, 1992). Gleichermäßen zeigen die Untersuchungen mit dem cDNA-Array, dass K-Ras4B(G12V) den mRNA-Spiegel von *cathepsin L* (Abb. 32) nicht jedoch von *cathepsin B* und *D* (nicht gezeigt) anhebt. Die K-Ras4B(G12V)-vermittelte Stimulation von *cathepsin L* oder *uPA*, deren Expression transkriptionell reguliert wird, korreliert mit einem verstärkt transformierten Phänotyp der Zellen. Denn K-Ras4B(G12V)-exprimierende Cos-7 Zellen zeigen ein stärker invasives Wachstum als Kontrollzellen (Abb. 34). Die Stimulation derartiger Gene trägt möglicherweise auch zur Fähigkeit der Met-exprimierenden NIH 3T3 Fibroblasten bei ohne Matrix Anbindung im Soft-Agar zu expandieren. Denn wie Ried *et al.* (1999) zeigen konnten, induziert der c-Met-Rezeptor unter Aktivierung der Ras MAPK-Kaskade den Urokinase-Promotor. An beiden Vorgängen, Invasion (Matrigel-Assay) und klonale Expansion von Zellen im Soft-Agar, sind Matrix-degradierende Prozesse beteiligt, die u.a. durch Expression entsprechender Faktoren gesteuert werden.

Bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung eines transformierten Phänotyps spielt neben dem Abbau der ECM aber auch die Unterdrückung der Apoptose eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang war die Beobachtung interessant, dass K-Ras4B(G12V) in Cos-7 Zellen auch die Genexpression von *ADAM10*, *15* und *TACE/ADAM17* induziert. Diese Gene kodieren für Metalloproteinasen, die u.a. durch GPCR aktiviert werden und bei der Transaktivierung von RTK durch GPCR eine wichtige Rolle spielen (Wetzker und Böhmer, 2003). Beispielsweise stellt in MCF-10A Zellen die autokrine Stimulation des EGFR durch Mitglieder der EGF-Familie (HB-EGF, Amphiregulin, TGF α) einen elementaren Mechanismus dar, über den wirksam die Anoikis unterdrückt wird (Schulze *et al.*, 2001). Unter anderem über derartige Signalwege wird transformierten Zellen wohl auch das substratunabhängige Wachstum im Soft-Agar ermöglicht. Die autokrine Stimulation des EGFR wird u.a. durch Raf-1 bewirkt, das die Expression von proHB-EGF (*heparin binding EGF like growth factor*), Pro-Amphiregulin oder Pro-TGF α anregt (Schulze *et al.*, 2001). Die Freisetzung des HB-EGF kann dabei u.a. durch ADAM10 erfolgen, welches über diesen Mechanismus (Aktivierung des HB-EGF) auch die Transaktivierung des EGFR durch GPCR vermittelt (Yan *et al.*, 2002). TACE seinerseits kommt durch Spaltung von Pro-Amphiregulin offenbar eine Schlüsselrolle bei der GPCR-induzierten Aktivierung des EGFR, Proliferation und Motilität von Krebszellen zu (Gschwind *et al.*, 2003). Diese Beispiele verdeutlichen den initialen Beitrag dieser Metalloproteinasen zum Transformationsgeschehen. An dieser Stelle soll betont werden, dass Cos-7 Zellen auf die Expression von K-Ras4B(G12V) vor allem mit der Induktion von Genen reagieren, deren Genprodukte als Regulatoren/Aktivatoren für eine Vielzahl von Proteasen und Signalmoleküle wirken. Daher ist man geneigt über den Hintergrund dessen zu spekulieren. Cos-7 Zellen sind transformiert, was sich an ihrem invasiven Wachstum zeigt (Abb. 34). Deswegen exprimieren diese Zellen wahrscheinlich „konstitutiv“ u.a. eine ganze Reihe von Matrix-degradierenden Enzymen wie z.B. MMP. Dies könnte erklären, warum es infolge der K-Ras Expression nicht zu einer weiteren Induktion der *MMP*-Gene kommt. Andere nicht-transformierte Zellen wie NIH 3T3 hingegen exprimieren diese Faktoren nicht. In Gegenwart von Ras werden sie dann aber doch induziert, wie der Reportagen-Assay für *MMP-1* belegt (Abb. 31). Die Expression von K-Ras4B(G12V) in den Cos-7 Zellen erweitert putativ das vorhandene Spektrum transformierender Faktoren um einen Ras-spezifischen Anteil. Dieser umfasst übersgeschaltete Regulatoren, die ihrerseits ein noch breiteres Arsenal als das vorhandene oder alternative Signalwege aktivieren, welche dem vorhandenen transformierten Phänotyp neue Eigenschaften verleihen.

Die Proteine der K-Ras4B(G12V)-induzierten Gene (*Cathepsin L*; *uPA*; *ADAM 10*; *ADAM 15*; *TACE*) sind direkt an der Ausbildung eines transformierten Phänotyps beteiligt. eGFP-WT-3 ist in der Lage den K-Ras4B(G12V)-vermittelten Effekt nahezu vollständig aufzuheben. Allerdings steht die Bestätigung der

Ergebnisse durch alternative Untersuchungsmethoden wie *real-time* PCR oder Northern-Blot noch aus. Darüber hinaus konnten die Daten bislang nicht auf die Expressionsspiegel der entsprechenden Proteine übertragen werden. Mit diesen fehlenden Informationen ist es nur bedingt möglich auf zelluläre Konsequenzen zu schließen. Außerdem darf in diesem Zusammenhang nicht außer Acht gelassen werden, dass die Aktivität von Ras wohl primär auf die Translation und nicht auf die Transkription abzielt (Prendergast, 2003; Rajasekhar *et al.*, 2003). Dennoch repräsentieren die anhand des cDNA-Array identifizierten, differentiell regulierten Gene bzw. deren kodierte Proteine mögliche Kandidaten, die einerseits an der Ras-vermittelten Transformation beteiligt sind und gleichzeitig Ziele der MSOR darstellen. Einige der durch K-Ras4B(G12V) positiv-regulierten Gene wie z.B. *cathepsin L* wurden auch schon in früheren Arbeiten beschrieben (Heinrich *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2001). Dies ist bedeutsam, da in diesen Studien das transkriptionelle Programm anderer Ras-Isoformen oder von Raf-1 untersucht wurde und auch mit anderen Zellen gearbeitet wurde. Demzufolge sind diese Gene, respektive deren Produkte, offenbar für die Ras-induzierte Transformation besonders wichtig. Da die MSOR die Expression derartiger Faktoren supprimieren und eine hohe Spezifität für Ras-GTP aufweisen, könnten sie gleichermaßen wirksame und spezifische Moleküle darstellen, um insbesondere solche malignen Prozesse zu hemmen, die aus einer Hyperaktivität von Ras resultieren.

- ***Das inhibitorische Potential der MSOR gegenüber transformierten Zellen***

Die deutliche Interferenz der MSOR-Konstrukte mit der von konstitutiv-aktivem Ras ausgelösten MAPK-Aktivierung (Abschnitt 4.3.1.) und die Induktion der Apoptose in Cos-7 Zellen (Abschnitt 4.1.3.3.) gaben einen ersten Eindruck der blockierenden Wirkung der MSOR. Zudem ließ sich mit eGFP-WT-3 zeigen, dass die Ras-vermittelte Expression transformations-relevanter Gene (*Cathepsin L*; *uPA*) unterdrückt werden kann. Um das inhibitorische Potential dieser Konstrukte auf die zelluläre Transformation direkt zu testen, wurden sie in etablierten Transformations-Assays, die unterschiedliche Aspekte der Transformation nachbilden, eingesetzt. Zunächst wurde der Einfluss der MSOR auf die Met-stimulierte Koloniebildung muriner Fibroblasten (NIH-TM) im Soft-Agar untersucht (Abschnitt 4.3.3.). Bei diesem Prozess spielen mehrere Elemente der c-Met-Signaltransduktion eine Rolle. Zum einen stimuliert c-Met die Proliferation (Rong *et al.*, 1992) und die Expression von uPA und anderen Proteasen, die den Abbau der umgebenden Matrix ermöglichen (Ried *et al.*, 1999). Zudem induziert c-Met die autokrine Aktivierung, indem es seine eigene Expression (Gambarotta *et al.*, 1996) und die Aktivierung von HGF aus der inaktiven Vorstufe (pro-HGF) durch uPA-Spaltung (Naldini *et al.*, 1992) fördert. Auf diesem Mechanismus und einer wahrscheinlich hohen trk/Met-Rezeptordichte in den NIH-TM Zellen beruht wohl die bereits ohne Stimulation (-NGF) zu beobachtende Koloniebildung (Abb. 33). Denn eine hohe Rezeptordichte führt zu einer NGF-unabhängigen, autonomen Dimerisierung, Autophosphorylierung und Aktivierung des Met-Rezeptors (Tulasne *et al.*, 1999). Gleichermäßen konnte in den verwendeten NIH-TM Zellen eine deutliche Tyrosinphosphorylierung des trk/Met-Rezeptors in Abwesenheit von NGF nachgewiesen werden (Cramer *et al.*, 2005). Die Stimulation der NIH-TM Zellen mit NGF fördert jedoch das substratunabhängige Wachstum um ca. 40% (Abb. 33). In vergleichbarer Weise (ca. 45%) wird auch das invasive Verhalten (Penetration durch Matrigel) dieser Fibroblasten durch NGF verstärkt (Cramer *et al.*, 2005). Das durch NGF-Stimulation vermittelte Auswachsen der NIH-TM Zellen im Soft-Agar wird durch eGFP-WT-1 und eGFP-WT-3 fast vollständig aufgehoben (Abb. 33). Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant, was wahrscheinlich auf die Versuchsbedingungen zurückzuführen ist. Denn während alle trk/met-transformierten Fibroblasten sensitiv auf die Stimulation mit NGF reagieren, wirken eGFP-WT-1 bzw. -3 lediglich auf die Koloniebildung der transfizierten NIH-TM Zellen (ca. 30-40%). Das die MSOR das Met-vermittelte Wachstum im Soft-Agar hemmen, verdeutlicht die dokumentierte, wichtige Rolle von Ras bei der Met-vermittelten Transformation (Ridley *et al.*, 1995; Tulasne *et al.*, 1999). Die Inhibition der Met-vermittelten Ras- und PI(3)K-Aktivierung resultiert im G1-Arrest und Apoptose (Sattler *et al.*, 2003). Da der Soft-Agar-Assay als eines der besten Modelle für die Tumorigenizität *in vivo* gilt (Lackie und Dow, 1995), sollte das Potential der MSOR in diesem Assay unter besseren Bedingungen mit einer deutlich höheren Transfektionseffizienz oder mit anderen zellulären Systemen wiederholt untersucht werden.

Darüber hinaus inhibieren eGFP-WT-1 bzw. -3 auch deutlich die K-Ras(G12V)-stimulierte Invasivität von Cos-7 Zellen im Matrigel-Assay, mit dem sich der invasive Charakter maligner Zellen nachbilden lässt (Abb. 34). In diesen Versuchen unterdrückt eGFP-R59A,N64D-3 ebenso effizient wie die anderen MSOR-Konstrukte die Migration der Cos-7 Zellen. Interessanterweise heben die MSOR aber nur die K-Ras4B(G12V)-induzierte Invasivität auf. Die „intrinsische“ Fähigkeit der Cos-7 Zellen das Matrigel zu durchwandern, was auch von Voice *et al.* (1999) beschrieben wurde, wird durch die MSOR nicht gehemmt. Demzufolge wird die Invasivität dieses Zelltyps auch durch Ras-unabhängige Prozesse vermittelt. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die MSOR verschiedene Aspekte der zellulären Transformation, Migration und Matrix-unabhängiges Wachstum, unterdrücken können. Die Inhibition dieser Prozesse durch MSOR steht wahrscheinlich in engem Zusammenhang mit der Fähigkeit der MSOR (eGFP-WT-3) die Ras-induzierte Genexpression von Matrix-degradierenden Faktoren wie *uPA* oder *cathepsin L* zu hemmen (Abb. 32). Die Resultate der Transformationsassays sind in guter Übereinstimmung zu der beschriebenen inhibitorischen Wirkung der monomeren Ras-Bindedomäne (Boldt *et al.*, 2003; Brtva *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2002). Dabei soll herausgestellt werden, dass die blockierende Wirkung der MSOR für Ras-vermittelte Prozesse gilt, aber wie der Soft-Agar-Assay zeigt, möglicherweise auch darüber hinausgeht. Denn obwohl das hierbei verwendete Testsystem mit *trk/met*-exprimierenden Fibroblasten sehr artifiziell ist, zeigen die Daten, dass die MSOR potentiell auch die Ras-übergeordnet gesteuerte Transformation (die mitunter zu einer Hyperaktivierung von Ras führt) supprimieren können.

Verschiedene Studien dokumentieren den individuellen Beitrag der einzelnen Ras-Isoformen zu verschiedenen Aspekten der Transformation (Li *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2000; Voice *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang stellt das Unvermögen der MSOR zwischen den Ras-Isoformen zu diskriminieren gewissermaßen einen Vorteil dar, da es die Wirksamkeit der Konstrukte in den Transformationsassays (Soft-Agar, Matrigel-Invasion) erhöht. Einen weiteren derartigen Assay stellt die Fokusbildung dar, welche die Aufhebung des Kontakt-inhibierten Wachstums transformierter Zellen dokumentiert. An diesem Prozess sind alle vier Ras-Isoformen beteiligt (Li *et al.*, 2004; Voice *et al.*, 1999). Nach Chiu *et al.* (2002) trägt zur Fokus-Formation von NIH 3T3 Fibroblasten auch Golgi-Apparat/ER-ständiges, aktives Ras wie KDELR-H-Ras(Q61L) oder H-Ras(Q61L/C181S,C184S) signifikant bei. Für den selben Zelltyp haben Hart und Donoghue (1997) hingegen gezeigt, dass aktive, Golgi-lokalisierte Ras-Fusionen in diesen Transformationsassays gänzlich inaktiv sind. Obwohl die Fokusbildung im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert wurde ist anzunehmen, dass die MSOR aufgrund der initialen Beteiligung von Ras auch mit diesem Part der Transformation interferieren.

Zusammenfassend begründet sich die blockierende Wirkung der MSOR mutmaßlich auf der Fähigkeit Ras, abhängig von der Affinität der MSOR, partiell oder vollständig von seiner physiologischen Funktion zu entkoppeln. Das hat putativ zumindest zwei Konsequenzen für transformierte Zellen: zum einen wird die Expression transformations-fördernder Faktoren bzw. ihrer Regulatoren unterdrückt und zum anderen wird durch Induktion pro-apoptotischer Faktoren die Apoptose in Gang gesetzt.

5.3. Betrachtungen zu möglichen Anwendungen der MSOR

Obwohl die blockierende Wirkung der MSOR in den Transformationsassays gezeigt wurde, muss deren inhibitorisches Potential auf Ras-transformierte Zellen oder gar die Tumorigenese, die durch onkogenes Ras selbst oder unter Beteiligung von Ras initiiert wird, erst noch demonstriert werden. Denn die Transformationsassays stellen nur Modelle für die Tumorentwicklung *in vivo* dar und haben deshalb nur bedingte Aussagekraft. Dies verdeutlichen die Versuche von Khosravi-Far *et al.* (1996): trotz einer stark abgeschwächten transformierenden Aktivität (Soft-Agar-Assay, Foci-Bildung) in NIH 3T3 Zellen sind die Ras-Effektorloop-Mutanten H-Ras(G12V,G37E) und H-Ras(G12V,C40Y) in der Lage die Ausbildung von Tumoren in Nacktmäusen zu induzieren.

In weiterführenden Untersuchungen sollte die Funktionsweise der MSOR weiter untersucht werden. So ist der genaue Wirkungsmechanismus der MSOR bislang nicht experimentell nachgewiesen. Zum anderen wurde die blockierende Wirkung der Konstrukte lediglich unter Bedingungen der Überexpression untersucht. Daher bleibt die Frage in dieser Arbeit unbeantwortet, in wie weit die beobachteten Effekte von der intrazellulären Konzentration der MSOR abhängen. Zur Klärung dieses Sachverhaltes könnten die

MSOR unter Kontrolle eines regulierbaren Promotors (z.B. des *tet-on/tet-off*-System) differentiell in Zellen exprimiert und die Auswirkungen der MSOR auf zelluläre Prozesse konzentrationsabhängig dargestellt werden. Erste Untersuchungen in dieser Richtung, die in unserem Labor durchgeführt wurden, deuten auf eine konzentrationsabhängige Wirkung der MSOR hin. Diese Untersuchungen sind besonders im Hinblick auf eine Anwendung der MSOR als Inhibitoren wichtig, denn offenbar hängt die Wirksamkeit der MSOR von einer „kritischen Masse“ ab. Außerdem müssen Untersuchungen beispielsweise in anderen (Ras)-transformierten Zellen zeigen, ob etwa die für Cos-7 Zellen beobachtete Restauration der ERK2-Phosphorylierung in eGFP-WT-3 exprimierenden Zellen tatsächlich einen Kompensationsmechanismus transformierter/ maligner Zellen auf eine starke Ras-Blockade darstellt. Sollte sich dies bestätigen lassen, haben derartige Mechanismen Konsequenzen im Hinblick auf den Einsatz derartiger Konstrukte als Inhibitoren der Ras-induzierten Tumorigenese. Denn durch die Kompensation ist es diesen Zellen eventuell möglich den transformierten oder malignen Phänotyp aufrechtzuerhalten, was die therapeutische Wirkung der Konstrukte vermindert. Vor diesem Hintergrund erweist sich eGFP-R59A,N64D-3 vielleicht als ein geeigneterer „Inhibitor“. Denn obwohl es gegenüber eGFP-WT-3 in seiner Affinität für Ras-GTP stark abgeschwächt ist, erweist es sich als gleichwertiger Blocker der Ras-induzierten Transformation (Migration) und inhibiert effizient Ras-stimulierte Signalwege.

Eine Besonderheit der MSOR gegenüber anderen Ansätzen stellt deren variable Affinität dar, denn dadurch können Ras-vermittelte Prozesse nicht nur unterdrückt, sondern wie gezeigt auch gezielt moduliert werden. Genau darin liegt vermutlich ein entscheidender Vorteil gegenüber anderen Chemotherapeutika und Ras-Inhibitoren. Denn diese sind nicht unbedingt spezifisch für Ras und/oder gleichermaßen toxisch für normale wie entartete Zellen. Die MSOR hingegen sind spezifisch für Ras und ihre Affinität lässt sich justieren. Auf diese Weise wird, wie z.B. für eGFP-R59A,N64D-3 demonstriert, die Ras-Signaltransduktion in normalen Zellen nur transient geblockt. In transformierten Zellen blockieren diese MSOR ebenfalls. Hierbei wirken sie aber weniger als Inhibitoren der Ras-Aktivität, sondern unterdrücken bzw. kompensieren nur dessen Hyperaktivität und fungieren daher eher als Modulatoren. Neben der Funktion als Blocker lässt sich eGFP-R59A,N64D-3 simultan als Reporter der Ras-Aktivität einsetzen. Das bietet die Möglichkeit unter *in vivo* Konditionen direkt die Beteiligung von Ras an zellulären Effekten zu verfolgen. Auf diesem Wege finden sich möglicherweise auch Antworten darauf, ob und wenn ja, unter welchen Bedingungen endogenes Ras an anderen intrazellulären Kompartimenten wie Mikrotubuli, Mitochondrien oder eventuell dem Zellkern aktiviert wird. Die Spezifität der vorhandenen MSOR reicht aber für die Analyse/Visualisierung der individuellen Ras-Isoformen nicht aus. Wahrscheinlich lässt sich dies auch mit diesem Ansatz nicht realisieren, da die RBD- zumindest *in vitro*- gleichermaßen GTP-beladenes H-Ras, K-Ras bzw. N-Ras binden. Die Verwirklichung Isoform-spezifischer Sonden stellt ein Ziel zukünftiger Entwicklungen dar. Im Hinblick auf einen putativen Einsatz der MSOR als Inhibitoren/Modulatoren der Ras-vermittelten Transformation/Tumorigenizität, ist die fehlende Selektivität gegenüber den einzelnen Ras-Isoformen womöglich gar ein Vorteil. Denn eine Reihe von experimentellen Befunden in verschiedenen Zelllinien belegt, dass die einzelnen Ras-Isoformen nicht uniform zur Transformation beitragen, sondern vielmehr spezifische Aspekte fördern (Li *et al.*, 2004; Voice *et al.*, 1999). Durch ihre effektive Interaktion mit den Isoformen wirken die MSOR auch auf multiple Elemente der Transformation, was sich in den verschiedenen Transformationsmodellen auch gezeigt hat.

In Anbetracht der vielen offenen Fragen hinsichtlich der blockierende Wirkung der MSOR erscheint es wenig sinnvoll, über das Potential der Konstrukte als Tumor-hemmende Moleküle zu spekulieren. Dennoch lässt sich folgendes Fazit aus dieser Arbeit ziehen: Die MSOR sind wirksame Instrumente, mit denen bislang ungeklärte Fragen beantwortet werden können und die- insbesondere in Kombination mit anderen Methoden- einen Beitrag zu einem tieferen Verständnis der Ras-Biologie leisten.

Referenzen

- Adachi, M.; Fukuda, M.; Nishida, E. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biol.* **148**: 849-856 (2000)
- Adari, H.; Lowy, D. R.; Willumsen, B. M.; Der, C. J.; McCormick, F. Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain. *Science* **240**: 518-521 (1998)
- Adler, V.; Pincus, M. R.; Brandtrauf, P. W.; Ronai, Z. Complexes of p21(ras) with jun N-terminal kinase and jun proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10585-10589 (1995)
- Ahmadian, M. R.; Stege, P.; Scheffzek, K.; Wittinghofer, A. Confirmation of the arginine-finger hypothesis for GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol.* **4**: 686-690 (1997)
- Ahuja, H. G.; Foti, A.; Bar-Eli, M.; Cline, M. J. The pattern of mutational involvement of RAS genes in human hematologic malignancies determined by DNA amplification and direct sequencing. *Blood* **75**: 1684-1690 (1990)
- Alessenko, A. V.; Burlakova, E. B. Functional role of phospholipids in the nuclear events. *Bioelectrochemistry* **58**: 13-21 (2002)
- Alessi, D. R.; Saito, Y.; Campbell, D. G.; Cohen, P.; Sithanandam, G. *et al.* Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74^{raf-1}. *EMBO J.* **13**: 1610-1619 (1994)
- Allan, L. A.; Morrice, N.; Brady, S.; Magee, G.; Pathak, S.; Clarke, P. R. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat Cell Biol.* **5**: 647-654 (2003)
- Allin, C.; Ahmadian, M. R.; Wittinghofer, A.; Gerwert, K. Monitoring the GAP catalyzed H-Ras GTPase reaction at atomic resolution in real time. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 7754-7759 (2001)
- Apolloni, A.; Prior, I. A.; Lindsay, M.; Parton, R. G.; Hancock, J. F. H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol.* **20**: 2475-2487 (2000)
- Arozarena, I.; Matallanas, D.; Berciano, M. T.; Sanz-Moreno, V.; Calvo, F. *et al.* Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors. *Mol Cell Biol.* **24**: 1516-1530 (2004)
- Ashkenazi, A.; Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**: 1305-1308 (1998)
- Babia, T.; Ayala, I.; Valderrama, F.; Mato, E.; Bosch, M. *et al.* N-Ras induces alterations in Golgi complex architecture and in constitutive protein transport. *J Cell Sci.* **112** (Pt 4): 477-489 (1999)
- Baker, T. L.; Zheng, H.; Walker, J.; Coloff, J. L.; Buss, J. E. Distinct rates of palmitate turnover on membrane-bound cellular and oncogenic H-Ras. *J. Biol. Chem.* **278**: 19292-19300 (2003)
- Balmano, K.; Cook, S. J. Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21^{Cip1} and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene* **18**: 3085-3097 (1999)
- Banecki, B.; Zylicz, M. Real time kinetics of the DnaK/DnaJ/GrpE molecular chaperone machine action. *J Biol Chem.* **271**: 6137-6143 (1996)
- Bar-Sagi, D.; Feramisco, J. R. Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science* **233**: 1061-1068 (1986)
- Barbacid, M. ras genes. *Annu Rev Biochem.* **56**: 779-827 (1987)
- Barradas, M.; Monjas, A.; Diaz-Meco, M. T.; Serrano, M.; Moscat, J. The downregulation of the pro-apoptotic protein Par-4 is critical for Ras-induced survival and tumor progression. *EMBO J.* **18**: 6362-6369 (1999)
- Bastiaens, P. I.; Squire, A. Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends Cell Biol.* **9**: 48-52 (1999)

Referenzen

- Bellicosa, A.; de Feo, D.; Godwin, A. K.; Bell, D. W.; Cheng, J. Q. *et al.* Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* **64**: 280-285 (1995)
- Bergo, M. O.; Ambroziak, P.; Gregory, C.; George, A.; Otto, J. C. *et al.* Absence of the CAAX endoprotease Rce1: effects on cell growth and transformation. *Mol Cell Biol.* **22**: 171-181 (2002)
- Bergo, M. O.; Gavino, B. J.; Hong, C.; Beigneux, A. P.; McMahon, M.; Casey, P. J.; Young, S. G. Inactivation of Icm1 inhibits transformation by oncogenic K-Ras and B-Raf. *J Clin Invest.* **113**: 539-550 (2004)
- Bergo, M. O.; Leung, G. K.; Ambroziak, P.; Otto, J. C.; Casey, P. J. *et al.* Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase deficiency in mice. *J Biol Chem.* **276**: 5841-5845 (2001)
- Bergo, M. O.; Leung, G. K.; Ambroziak, P.; Otto, J. C.; Casey, P. J.; Young, S. G. Targeted inactivation of the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase gene causes mislocalization of K-Ras in mammalian cells. *J Biol Chem.* **275**: 17605-17610 (2000)
- Berra, E.; Municio, M. M.; Sanz, L.; Frutos, S.; Diaz-Meco, M. T.; Moscat, J. Positioning atypical protein kinase C isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. *Mol Cell Biol.* **17**: 4354-1997
- Binetruy, B.; Smeal, T.; Karin, M. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* **351**: 122-127 (1991)
- Birchmeier, C.; Birchmeier, W.; Gherardi, E.; Vande Woude, G. F. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**: 915-925 (2003)
- Birnboim, H. C.; Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1518 (1979)
- Bivona, T. G.; Perez De Castro I.; Ahearn, I. M.; Grana, T. M.; Chiu, V. K. *et al.* Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* **424**: 694-698 (2003)
- Bivona, T. G.; Philips, M. R. Ras pathway signaling on endomembranes. *Curr Opin Cell Biol.* **15**: 136-142 (2003)
- Blasi, F. Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Ann NY Acad Sci.* **667**: 13-31 (1993)
- Blasi, F.; Carmeliet, P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**: 932-943 (2002)
- Block, C.; Janknecht, R.; Herrmann, C.; Nassar, N.; Wittinghofer, A. Quantitative structure-activity analysis correlating Ras/Raf interaction *in vitro* to Raf activation *in vivo*. *Nat Struct Biol.* **3**: 244-251 (1996)
- Blume-Jensen, P.; Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**: 355-365 (2001)
- Blume-Jensen, P.; Janknecht, R.; Hunter, T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol.* **8**: 779-782 (1998)
- Boldt, S.; Weidle, U. H.; Kolch, W. The kinase domain of MEKK1 induces apoptosis by dysregulation of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res.* **283**: 80-90 (2003)
- Bondeva, T.; Balla, A.; Várnai, P.; Balla, T. Structural determinants of Ras-Raf interaction analyzed in live cells. *Mol Biol Cell.* **13**: 2323-2333 (2002)
- Bondeva, T.; Pirola, L.; Bulgarelli-Leva, G.; Rubio, I.; Wetzker, R.; Wymann, M. P. Bifurcation of Lipid and Protein Kinase Signals of PI3K γ to the Protein Kinases PKB and MAPK. *Science* **282**: 293-296 (1998)
- Bonni, A.; Brunet, A.; West, A. E.; Datta, S. R.; Takusa, M. A.; Greenberg, M. E. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signalling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**: 1358-1362 (1999)

Referenzen

- Borgatti, P.; Martelli, A. M.; Tabelloni, G.; Bellicosa, A.; Capitani, S.; Neri, L. M. Threonine 308 phosphorylated form of Akt translocates to the nucleus of PC12 cells under nerve growth factor stimulation and associates with the nuclear matrix protein nucleolin. *J Cell Physiol.* **196**: 79-88 (2003)
- Boriack-Sjodin, P. A.; Margarit, S. M.; Bar-Sagi, D.; Kuryian, J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* **394**: 337-343 (1998)
- Bos, J. L. The ras gene family and human Carcinogenesis. *Mutat Res.* **195**: 255-271 (1988)
- Bos, J. L. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**: 4682-4689 (1989)
- Boulven, I.; Palmier, B.; Robin, P.; Vacher, M.; Harbon, S.; Leiber, D. Platelet-derived growth factor stimulates phospholipase C-gamma 1, extracellular signal-regulated kinase, and arachidonic acid release in rat myometrial cells: contribution to cyclic 3',5'-adenosine monophosphate production and effect on cell proliferation. *Biol Reprod.* **65**: 506-(2001)
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254 (1976).
- Brennan, J. A.; Volle, D. J.; Chaika, O. V.; Lewis, R. E. Phosphorylation regulates the nucleocytoplasmic distribution of kinase suppressor of Ras. *J Biol Chem.* **277**: 5369-5377 (2002)
- Brtva, T. R.; Drugan, J. K.; Ghosh, S.; Terrell, R. S.; Campbell-Burk, S.; Bell, R. M.; Der, C. J. Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *J Biol Chem.* **270**: 9809-9812 (1995)
- Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmond, M. J.; Lin, M. Z.; Juo, P. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868 (1999)
- Burrige, K.; Wennerberg, K. Rho and Rac take center stage. *Cell* **116**: 167-179 (2004)
- Cardone, M. H.; Roy, N.; Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S.; Franke, T. F. *et al.* Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**: 1318-1321 (1998)
- Cardone, M. H.; Salvesen, G. S. W. C.; Johnson, G. F. S. M. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* **90**: 315-323 (1997)
- Chambers, A. F.; Colella, R.; Denhardt, D. T.; Wilson, S. M. Increased expression of cathepsins L and B and decreased activity of their inhibitors in metastatic *ras*-transformed NIH 3T3 cells. *Mol Carcinog.* **5**: 238-245 (1992)
- Chambers, A. F.; Groom, A. C.; MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**: 563-572 (2002)
- Chang, L.; Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37-40 (2001)
- Chellani, M. Isothermal titration calorimetry: Biological applications. *Amer Biotechnol Lab.* **17**: 14-18 (1999)
- Chen, C. Y.; Faller, D. V. Phosphorylation of Bcl-2 protein and association with p21Ras in Ras-induced apoptosis. *J Biol Chem.* **271**: 2376-2379 (1996)
- Chen, C. Y.; Liou, J.; Forman, L. W.; Faller, D. V. Differential regulation of discrete apoptotic pathways by Ras. *J Biol Chem.* **273**: 16700-16709 (1998)
- Chen, X.; Resh, M. D. Activation of mitogen-activated protein kinase by membrane-targeted Raf chimeras is independent of raft localization. *J Biol Chem.* **276**: 34617-34623 (2001)
- Chen, Y. F.; Chiu, H. H.; Wu, C. H.; Wang, J. Y.; Chen, F. M. *et al.* Retinoblastoma protein (pRB) was significantly phosphorylated through a Ras-to-MAPK pathway in mutant K-ras stably transfected human adrenocortical cells. *DNA Cell Biol.* **22**: 657-664 (2003)

Referenzen

- Chen, Z.; Otto, J. C.; Bergo, M. O.; Young, S. G.; Casey, P. J. 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 (2000)
- Cheng, T. L.; Symons, M.; Jou, T. S. Regulation of anoikis by Cdc42 and Rac1. *Exp Cell Res.* **295**: 497-511 (2004)
- Chin, L.; Tam, A.; Pomerantz, J.; Wong, M.; Holash, J. *et al.* Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* **400**: 468-472 (1999)
- Chinenov, Y.; Kerppola, T. K. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* **20**: 2438-2452 (2001)
- Chipuk, J. E.; Kuwana, T.; Bouchier-Hayes, L.; Droin, N. M.; Newmeyer, D. D.; Schuler, M.; Green, D. R. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**: 1010-1014 (2004)
- Chiu, V. K.; Bivona, T.; Hach, A.; Sajous, J. B.; Silletti, J. *et al.* Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol.* **4**: 343-350 (2002)
- Choong, P. F.; Ferno, M.; Akerman, M.; Willen, H.; Langstrom, E. *et al.* Urokinase-plasminogen-activator levels and prognosis in 69 soft-tissue sarcomas. *Int J Cancer.* **69**: 268-272 (1996)
- Choy, E.; Chiu, V. K.; Silletti, J.; Feoktistov, M.; Morimoto, T. *et al.* Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* **98**: 69-80 (1999)
- Choy, E.; Philips, M. Green fluorescent protein-tagged Ras proteins for intracellular localization. *Methods Enzymol.* **332**: 50-64 (2001)
- Ciardello, F.; McGeady, M. L.; Kim, N.; Basolo, F.; Hynes, N. *et al.* Transforming growth factor- α expression is enhanced in human mammary epithelial cells transformed by an activated c-Ha-ras protooncogene but not by the c-neu protooncogene, and overexpression of the transforming growth factor- α complementary DNA leads to transformation. *Cell Growth Differ.* **1**: 407-420 (1990)
- Clark, G. J.; Drugan, J. K.; Terrell, R. S.; Bradham, C.; Der, C. J.; Bell, R. M.; Campbell, S. Peptides containing a consensus Ras binding sequence from Raf-1 and the GTPase activating protein NF1 inhibit Ras function. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 1577-1581 (1996)
- Clevenger, C. V.; Ngo, W.; Sokol, D. L.; Luger, S. M.; Gewirtz, A. M. Vav is necessary for prolactin-stimulated proliferation and is translocated into the nucleus of a T-cell line. *J Biol Chem.* **270**: 13246-13253 (1995)
- Cochet, O.; Kenigsberg, M.; Delumeau, I.; Virone-Oddos, A.; Multon, M. C. *et al.* Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. *Cancer Res.* **58**: 1170-1176 (1998)
- Coleman, M. L.; Marshall, C. J.; Olson, M. F. Ras and Rho GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**: 355-366 (2004)
- Collette, J.; Ulku, A. S.; Der, C. J.; Jones, A.; Erickson, A. H. Enhanced cathepsin L expression is mediated by different Ras effector pathways in fibroblasts and epithelial cells. *Int J Cancer* **112**: 190-199 (2004)
- Cooper, C. S.; Tempest, P. R.; Beckman, M. P.; Heldin, C. H.; Brookes, P. Amplification and overexpression of the met gene in spontaneously transformed NIH/3T3 mouse fibroblasts. *EMBO J.* **5**: 2623-2628 (1986)
- Cormier, P.; Pyronnet, S.; Salaun, P.; Mulner-Lorillon, O.; Sonenberg, N. Cap-dependent translation and control of the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res.* **5**: 469-475 (2003)
- Cortes, J.; Albitar, M.; Thomas, D.; Giles, F.; Kurzrock, R. *et al.* Efficacy of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in chronic myeloid leukemia and other hematologic malignancies. *Blood* **101**: 1692-1697 (2003)
- Cowley, S.; Paterson, H.; Kemp, P.; Marshall, C. J. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**: 841-852 (1994)

Referenzen

- Cox, A. D.; Brtva, T. R.; Lowe, D. G.; Der, C. J. R-Ras induces malignant, but not morphologic, transformation of NIH3T3 cells. *Oncogene* **9**: 3281-3288 (1994)
- Cox, A. D.; Der, C. J. Farnesyltransferase inhibitors: promises and realities. *Curr Opin Pharmacol.* **2**: 388-393 (2002)
- Cox, A. D.; Der, C. J. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* **22**: 8999-9006 (2003)
- Cramer, A.; Kleiner, S.; Westermann, M.; Meissner, A.; Lange, A.; Friedrich, K. Activation of the c-Met receptor complex in fibroblasts drives invasive cell behavior by signaling through transcription factor STAT3. *J Cell Biochem.* **9999**: 1-13 (2005)
- Cullen, P. J. Ras effectors: buying shares in Ras plc. *Curr Biol.* **11**: R342-R344 (2001)
- Curran, S.; Murray, G. I. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol.* **189**: 300-308 (1999)
- Curran, S.; Murray, G. I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer.* **36**(13 Spec No): 1621-1630 (2000)
- Datta, S. R.; Brunet, A.; Greenberg, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Dev.* **13**: 2905-2927 (1999)
- Datta, S. R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y.; Greenberg, M. E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**: 231-241 (1997)
- Daumke, O.; Weyand, M.; Chakrabarti, P. P.; Vetter, I. R.; Wittinghofer, A. The GTPase-activating protein Rap1GAP uses catalytic asparagines. *Nature* **429**: 197-201 (2004)
- Davies, H.; Bignell, G. R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**: 949-954 (2002)
- de Castro, I. P.; Bivona, T. G.; Philips, M. R.; Pellicer, A. Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. *Mol Cell Biol.* **24**: 3485-3496 (2004)
- de Castro, I. P.; Diaz, R.; Malumbres, M.; Hernandez, M. I.; Jagirdar, J. *et al.* Mice deficient for N-ras: impaired antiviral immune response and T-cell function. *Cancer Res.* **63**: 1615-1622 (2003)
- Denis, G. V.; Yu, Q.; Ma, P.; Deeds, L.; Faller, D. V.; Chen, C. Y. Bcl-2, via Its BH4 Domain, Blocks Apoptotic Signaling Mediated by Mitochondrial Ras. *J Biol Chem.* **278**: 5775-5785 (2003)
- Dent, P.; Haser, W.; Haystead, T. A.; Vincent, L. A.; Roberts, T. M.; Sturgill, T. W. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and *in vitro*. *Science* **257**: 1404-1407 (1992)
- Di Fiore, P. P. Life on Mars, cellularly speaking. *Nature* **424**: 624-625 (2003)
- Di Fiore, P. P.; Gill, G. N. Endocytosis and mitogenic signalling. *Curr Opin Cell Biol.* **11**: 483-488 (1999)
- Diaz-Meco, M. T.; Lallena, M. J.; Monjas, A.; Frutos, S.; Moscat, J. The inactivation of IKK/NF- κ B pathway by Par-4 expression potentiates TNF α -induced apoptosis. *J Biol Chem.* **274**: 19606-19612 (1999)
- Diaz-Meco, M. T.; Lozano, J.; Municio, M. M.; Berra, E.; Frutos, S.; Sanz, L.; Moscat, J. Evidence for the *in vitro* and *in vivo* interaction of ras with protein kinase C zeta. *J Biol Chem.* **269**: 31706-31710 (1994)
- Diaz-Meco, M. T.; Municio, M. M.; Frutos, S.; Sanchez, P.; Lozano, J.; Sanz, L.; Moscat, J. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* **86**: 777-786 (1996)
- Didichenko, S. A.; Thelen, M. Phosphatidylinositol 3-kinase C2a contains a nuclear localization sequence and associates with nuclear speckles. *J Biol Chem.* **276**: 48135-48142 (2001)
- Diehl, J. A.; Cheng, M.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **12**: 3499-3511 (1998)

Referenzen

- Donovan, S.; Shannon, K. M.; Bollag, G. GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. *Biochim Biophys Acta*. **1602**: 23-45 (2002)
- Downward, J. Cell cycle: Routine role for Ras. *Curr Biol*. **7**: R258-R260 (1997)
- Downward, J. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*. **8**: 49-54 (1998)
- Downward, J. Targeting Ras signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. **3**: 22-(2003)
- Downward, J.; Graves, J. D.; Warne, P. H.; Rayter, S.; Cantrell, D. A. Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* **346**: 719-723 (1990)
- Drugan, J. K.; Khosravi-Far, R.; White, M. A.; Der, C. J.; Sung, Y. J.; Hwang, Y. W.; Campbell, S. L. Ras interaction with two distinct binding domains in Raf-1 may be required for Ras transformation. *J Biol Chem*. **271**: 233-237 (1996)
- Ehrhardt, A.; David, M. D.; Ehrhardt, G. R.; Schrader, J. W. Distinct mechanisms determine the patterns of differential activation of H-Ras, N-Ras, K-Ras 4B, and M-Ras by receptors for growth factors or antigen. *Mol Cell Biol*. **24**: 6311-6323 (2004)
- Ehrhardt, A.; Ehrhardt, G. R.; Guo, X.; Schrader, J. W. Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together. *Exp Hematol*. **30**: 1089-1106 (2002)
- Elad-Sfadia, G.; Haklai, R.; Ballan, E.; Gabius, H. J.; Kloog, Y. Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*. **277**: 37169-37175 (2002)
- Esteban, L. M.; Vicario-Abejon, C.; Fernandez-Salguero, P.; Fernandez-Medarde, A.; Swaminathan, N. *et al.* Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol Cell Biol*. **21**: 1444-1452 (2001)
- Fan, M.; Goodwin, M.; Vu, T.; Brantley-Finley, C.; Gaarde, W. A.; Chambers, T. C. Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade. *J Biol Chem*. **275**: 29980-29985 (2000)
- Fang, X.; Yu, S.; Eder, A.; Mao, M.; Bast, R. C. J.; Boyd, D.; Mills, G. B. Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* **18**: 6635-6640 (1999)
- Feldkamp, M. M.; Angelov, L.; Guha, A. Neurofibromatosis type 1 peripheral nerve tumors: aberrant activation of the Ras pathway. *Surg Neurol*. **51**: 211-218 (1999)
- Fiordalisi, J. J.; Johnson, R. L. 2.; Weinbaum, C. A.; Sakabe, K.; Chen, Z.; Casey, P. J.; Cox, A. D. High affinity for farnesyltransferase and alternative prenylation contribute individually to K-Ras4B resistance to farnesyltransferase inhibitors. *J Biol Chem*. **278**: 41718-41727 (2003)
- Fiorucci, G.; Hall, A. All three human ras genes are expressed in a wide range of tissues. *Biochim Biophys Acta* **950**: 81-83 (1988)
- Fischbach, M. A.; Settleman, J. Specific biochemical inactivation of oncogenic Ras proteins by nucleoside diphosphate kinase. *Cancer Res*. **63**: 4089-4094 (2003)
- Fisher, G. H.; Wellen, S. L.; Klimstra, D.; Lenczowski, J. M.; Tichelaar, J. W.; Lizak, M. J.; Whitsett, J. A. Koretsky, A.; Varmus, H. E. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev*. **15**: 3249-3262 (2001)
- Frisch, S. M.; Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*. **124**: 619-626 (1994)
- Fukasawa, K.; Vande Woude, G. F. Synergy between the mos/Mitogen-activated protein kinase pathway and loss of p53 function in transformation and chromosome instability. *Mol Cell Biol*. **17**: 506-518 (1997)

Referenzen

- Fukuda, S.; Pelus, L. M. Activated H-Ras regulates hematopoietic cell survival by modulating Survivin. *Biochem Biophys Res Commun.* **323**: 636-644 (2004)
- Furge, K. A.; Kiewlich, D.; Le, P.; Vo, M. N.; Faure, M. *et al.* Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 10722-10727 (2001)
- Futamura, M.; Kamiya, S.; Tsukamoto, M.; Hirano, A.; Monden, Y.; Arakawa, H.; Nishimura, S. Malolactomycin D, a potent inhibitor of transcription controlled by the Ras responsive element, inhibits Ras-mediated transformation activity with suppression of MMP-1 and MMP-9 in NIH 3T3. *Oncogene* **20**: 6724-6730 (2001)
- Galaktionov, K.; Jessus, C.; Beach, D. Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev.* **9**: 1046-1058 (1995)
- Gambarotta, G.; Boccaccio, C.; Giordano, S.; Ando, M.; Stella, M. C.; Comoglio, P. M. Ets up-regulates MET transcription. *Oncogene* **13**: 1911-1917 (1996)
- Garcia-Guzman, M.; Dolfi, F.; Zeh, K.; Vuori, K. Met-induced JNK activation is mediated by the adapter protein Crk and correlates with the Gab1-Crk signaling complex formation. *Oncogene.* **18**: 7775-7786 (1999)
- Gardner, A. M.; Johnson, G. L. Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor α -mediated apoptosis requires Ras and the activation of Mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* **271**: 14560-14566 (1996)
- Gibbs, J. B. Determination of guanine nucleotides bound to Ras in mammalian cells. *Methods Enzymol.* **255**: 118-125 (1995)
- Gideon, P.; John, J.; Frech, M.; Lautwein, A.; Clark, R.; Scheffler, J. E.; Wittinghofer, A. Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol.* **12**: 2050-2056 (1992)
- Gillooly, D. J.; Morrow, I. C.; Lindsay, M.; Gould, R.; Bryant, N. J. *et al.* Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* **19**: 4577-4588 (2000)
- Goetz, C. A.; O'Neil, J. J.; Farrar, M. A. Membrane localization, oligomerization, and phosphorylation are required for optimal Raf activation. *J Biol Chem.* **278**: 51184-51189 (2003)
- Gorman, C.; Skinner, R. H.; Skelly, J. V.; Neidle, S.; Lowe, P. N. Equilibrium and kinetic measurements reveal rapidly reversible binding of Ras to Raf. *J Biol Chem.* **271**: 6713-6719 (1996)
- Gotoh, T.; Tian, X.; Feig, L. A. Prenylation of target GTPases contributes to signaling specificity of Ras-guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem.* **276**: 38029-38035 (2001)
- Graff, J. R.; Zimmer, S. G. Translational control and metastatic progression: enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs. *Clin Exp Metastasis.* **20**: 265-273 (2003)
- Graham, D. L.; Lowe, P. N.; Chalk, P. A. A method to measure the interaction of Rac/Cdc42 with their binding partners using fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Anal Biochem.* **296**: 208-217 (2001)
- Graham, S. M.; Cox, A. D.; Drivas, G.; Rush, M. G.; D'Eustachio, P.; Der, C. J. Aberrant function of the Ras-related protein TC21/R-Ras2 triggers malignant transformation. *Mol Cell Biol.* **14**: 4108-4115 (1994)
- Graña, X.; Reddy, E. P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene.* **11**: 211-219 (1995)
- Graves, J. D.; Gotoh, Y.; Draves, K. E.; Ambrose, D.; Han, D. K. *et al.* Caspase-mediated activation an induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1. *EMBO J.* **17**: 2224-2234 (1998)
- Graves, L. M.; Guy, H. I.; Kozlowski, P.; Huang, M.; Lazarowski, E. *et al.* Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* **403**: 328-332 (2000)

Referenzen

- Green, D. R.; Reed, J. C. Mitochondria and Apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312 (1998)
- Gregory, P. E.; Gutmann, D. H.; Mitchell, A.; Park, S.; Boguski, M. *et al.* Neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associates with microtubules. *Somat Cell Mol Genet.* **19**: 265-274 (1993)
- Grünert, S.; Jechlinger, M.; Beug, H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**: 657-665 (2003)
- Gschwind, A.; Hart, S.; Fischer, O.M.; Ullrich, A. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J.* **22**: 2411-2421 (2003)
- Guil, S.; de La Iglesia, N.; Fernandez-Larrea, J.; Cifuentes, D.; Ferrer, J. C.; Guinovart, J. J.; Bach-Elias, M. Alternative splicing of the human proto-oncogene c-H-ras renders a new Ras family protein that trafficks to cytoplasm and nucleus. *Cancer Res.* **63**: 5178-5187 (2003)
- Gupta, A. K.; Bernhard, E. J.; Bakanauskas, V. J.; Cerniglia, G. J.; Muschel, R. J.; McKenna, G. C-raf-1 protein kinase is not essential for ras transformation of mouse embryo fibroblasts. *Cancer Biol Ther* **2**: 73-75 (2003)
- Gutkind, J. S. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE* **2000**(40):(2000)
- Gutmann, D. H. The neurofibromatoses: when less is more. *Hum Mol Genet.* **10**: 747-755 (2001)
- Häcker, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* **301**: 5-17 (2000)
- Haffner, R.; Oren, M. Biochemical und biological effects of p53. *Curr Opin Genet Dev.* **5**: 84-90 (1995)
- Hahn, W. C.; Counter, C. M.; Lundberg, A. S.; Beijersbergen, R. L.; Brooks, M. W.; Weinberg, R. A. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**: 464-468 (1999)
- Hahn, W. C.; Weinberg, R. A. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med.* **347**: 1593-1603 (2002)
- Hallberg, B.; Rayter, S. I.; Downward, J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem.* **269**: 3913-3916 (1994)
- Hamasuna, R.; Kataoka, H.; Moriyama, T.; Itoh, H.; Seiki, M.; Koono, M. Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) in human glioma cells: HGF/SF enhances MMP-2 expression and activation accompanying up-regulation of membrane type-1 MMP. *Int J Cancer* **82**: 274-281 (1999)
- Hamilton, M.; Liao, J.; Cathcart, M. K.; Wolfman, A. Constitutive association of c-N-Ras with c-Raf-1 and protein kinase C epsilon in latent signaling modules. *J Biol Chem.* **276**: 29079-29090 (2001)
- Hamilton, M.; Wolfman, A. Ha-ras und N-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms *in vivo*. *Oncogene* **16**: 1417-1428 (1998)
- Han, L.; Colicelli, J. A human protein selected for interference with Ras function interacts directly with Ras and competes with Raf1. *Mol Cell Biol.* **15**: 1318-1323 (1995)
- Hanahan, D.; Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-364 (1996)
- Hancock, J. F. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**: 373-384 (2003)
- Hancock, J. F.; Patterson, H.; Marshall, C. J. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**: 133-139 (1990)
- Harris, T. E.; Lawrence, J. C. Jr. TOR signaling. *Sci STKE.* **2003**(212): re15-(2003)
- Hart, K. C.; Donoghue, D. J. Derivatives of activated H-ras lacking C-terminal lipid modifications retain transforming ability if targeted to the correct subcellular location. *Oncogene* **14**: 945-953 (1997)

Referenzen

- Hartmann, G.; Weidner, K. M.; Schwarz, H.; Birchmeier, W. The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the receptor tyrosine kinase met requires intracellular action of Ras. *J Biol Chem.* **269**: 21936-21939 (1994)
- Harvey, P.; Clark, I. M.; Jaurand, M. C.; Warn, R. M.; Edwards, D. R. Hepatocyte growth factor/scatter factor enhances the invasion of mesothelioma cell lines and the expression of matrix metalloproteinases. *Br J Cancer.* **83**: 1147-1153 (2000)
- Haug, J. M. A unified model for signal transduction reactions in cellular membranes. *Biophys J.* **82**: 591-604 (2002)
- Haug, J. M.; Huang, A. C.; Wiley, H. S.; Wells, A.; Lauffenburger, D. A. Internalized epidermal growth factor receptors participate in the activation of p21^{ras} in fibroblasts. *J.Biol.Chem.* **274**: 34350-34360 (1999)
- Heinrich, J.; Bosse, M.; Eickhoff, H.; Nietfeld, W.; Reinhardt, R.; Lehrach, H.; Moelling, K. Induction of putative tumor-suppressing genes in Rat-1 fibroblasts by oncogenic Raf-1 as evidenced by robot-assisted complex hybridization. *J Mol Med.* **78**: 380-388 (2000)
- Herrmann, C.; Horn, G.; Spaargaren, M.; Wittinghofer, A. Differential interaction of the Ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A and R-Ras with the putative effector molecules Raf-kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. *J.Biol.Chem.* **271**: 6794-6800 (1996)
- Herrmann, C.; Martin, G. A.; Wittinghofer, A. Quantitative analysis of the complex between p21^{ras} and the Ras-binding domain of the human Raf-1 Protein. *J.Biol.Chem.* **270**: 2901-2905 (1995)
- Hibino, K.; Watanabe, T. M.; Kozuka, J.; Iwane, A. H.; Okada, T. *et al.* Single- and multiple-molecule dynamics of the signaling from H-Ras to cRaf-1 visualized on the plasma membrane of living cells. *Chemphyschem.* **4**: 748-753 (2003)
- Hiddinga, H. J.; Eberhardt, N. L. Intracellular amyloidogenesis by human islet amyloid polypeptide induces apoptosis in Cos-1 cells. *Am.J.Pathol.* **154**: 1077-1088 (1999)
- Hill, C. S.; Treisman, R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**: 199-211 (1995)
- Hinds, P. W.; Dowdy, S. F.; Eaton, E. N.; Arnold, A.; Weinberg, R. A. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 709-713 (1994)
- Hodge, C.; Liao, J.; Stofega, M.; Guan, K.; Carter-Su, C.; Schwartz, J. Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Biol Chem.* **273**: 31327-31336 (1998)
- Hoffman, G. R.; Nassar, N.; Cerione, R. A. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* **100**: 345-356 (2000)
- Holdgate, G. A. Making cool drugs hot: Isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. *BioTechniques* **31**: 164-184 (2001)
- Holmgren, L.; O'Reilly, M. S.; Folkman, J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* **1**: 149-153 (1995)
- Horn, U.; Strittmatter, W.; Krebber, A.; Knupfer, U.; Kujau, M. *et al.* High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in Escherichia coli, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.* **46**: 524-532 (1996)
- Hruban, R. H.; Goggins, M.; Parsons, J.; Kern, S. E. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* **6**: 2969-2972 (2000)
- Hu, C. D.; Kariya, K.; Tamada, M.; Akasaka, K.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S.; Kataoka, T. Cysteine-rich region of Raf-1 interacts with activator domain of post-translationally modified Ha-Ras. *J Biol Chem.* **270**: 30274-30277 (1995)

Referenzen

- Huang, Y.; Saez, R.; Chao, L.; Santos, E.; Aaronson, S. A.; Chan, A. M. A novel insertional mutation in the TC21 gene activates its transforming activity in a human leiomyosarcoma cell line. *Oncogene*. **11**: 1255-1260 (1995)
- Hunger, R. E.; Brand, C. U.; Streit, M.; Eriksen, J. A.; Gjertsen, M. K. *et al.* Successful induction of immune responses against mutant ras in melanoma patients using intradermal injection of peptides and GM-CSF as adjuvant. *Exp Dermatol*. **10**: 161-167 (2001)
- Hunter, T.; Pines, J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell***79**: 573-582 (1994)
- Imler, J. L.; Schatz, C.; Wasylyk, C.; Chatton, B.; Wasylyk, B. A Harvey-ras responsive transcription element is also responsive to a tumour-promoter and to serum. *Nature* **332**: 275-278 (1988)
- Inouye, K.; Mizutani, S.; Koide, H.; Kaziro, Y. Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation. *J Biol Chem*. **275**: 3737-3740 (2000)
- Itoh, R. E.; Kurokawa, K.; Ohba, Y.; Yoshizaki, H.; Mochizuki, N.; Matsuda, M. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol*. **22**: 6582-6591 (2002)
- Ivan, M.; Bond, J. A.; Prat, M.; Comoglio, P. M.; Wynford-Thomas, D. Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene*. **14**: 2417-2423 (1997)
- Jacobsen, K.; Groth, A.; Willumsen, B. M. Ras-inducible immortalized fibroblasts: focus formation without cell cycle deregulation. *Oncogene* **21**: 3058-3067 (2002)
- Janda, E.; Lehmann, K.; Killisch, I.; Jechlinger, M.; Herzig, M. *et al.* Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol*. **156**: 299-313 (2002)
- Jiang, X.; Sorkin, A. Coordinated traffic of Grb2 and Ras during Epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cells. *Mol. Biol. Cell* **13**: 1522-1535 (2002)
- Jiang, Y.; Ma, W.; Wan, Y.; Kozasa, T.; Hattori, S.; Huang, X. Y. The G protein G alpha12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain. *Nature*. **395**: 808-813 (1998)
- Jin, T. G.; Satoh, T.; Liao, Y.; Song, C.; Gao, X. *et al.* Role of the CDC25 homology domain of phospholipase Cepsilon in amplification of Rap1-dependent signaling. *J Biol Chem*. **276**: 30301-30307 (2001)
- John, J.; Frech, M.; Wittinghofer, A. Biochemical properties of Ha-ras encoded p21 mutants and mechanism of the autophosphorylation reaction. *J. Biol. Chem*. **263**: 11792-11799 (1988)
- Jones, M. K.; Jackson, J. H. RasGRF activates H-Ras, but not N-Ras or K-Ras 4B, protein in vivo. *J. Biol. Chem*. **273**: 1782-1787 (1998)
- Joneson, T.; Bar-Sagi, D. Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase. *Mol Cell Biol*. **19**: 5892-5901 (1999)
- Kaibuchi, K.; Mizuno, T.; Fujioka, H.; Yamamoto, T.; Kishi, K. *et al.* Molecular cloning of the cDNA for stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21s (ras p21-like small GTP-binding proteins) and characterization of stimulatory GDP/GTP exchange protein. *Mol Cell Biol*. **11**: 2873-2880 (1991)
- Kauffmann-Zeh, A.; Rodriguez-Viciana, P.; Ulrich, E.; Gilbert, C.; Coffey, P.; Downward, J.; Evan, G. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* **385**: 544-548 (1997)
- Kawasaki, H.; Springett, G. M.; Mochizuki, N.; Toki, S.; Nakaya, M. *et al.* A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**: 2275-2279 (1998)
- Kazanietz, M. G. Novel „nonkinase“ phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol*. **61**: 759-767 (2002)

Referenzen

- Kelley, G. G.; Reks, S. E.; Ondrako, J. M.; Smrcka, A. V. Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector. *EMBO J.* **20**: 743-754 (2001)
- Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* **26**: 239-257 (1972)
- Kharbanda, S.; Saxena, S.; Yoshida, K.; Pandey, P.; Kaneki, M. *et al.* Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem.* **275**: 322-327 (2000)
- Khokhlatchev, A.; Rabizadeh, S.; Xavier, R.; Nedwitek, M.; Chen, T. *et al.* Identification of a novel ras-regulated proapoptotic pathway. *Curr Biol.* **12**: 253-265 (2002)
- Khosravi-Far, R.; Solski, P. A.; Clark, G. J.; Kinch, M. S.; Der, C. J. Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol Cell Biol.* **15**: 6443-6453 (1995)
- Khosravi-Far, R.; White, M. A.; Westwick, J. K.; Solski, P. A.; Chrzanowska-Wodnicka, M. *et al.* Oncogenic Ras activation of Raf/mitogen-activated protein kinase-independent pathways is sufficient to cause tumorigenic transformation. *Mol Cell Biol.* **16**: 3923-3933 (1996)
- Kim, E.; Ambroziak, P.; Otto, J. C.; Taylor, B.; Ashby, M.; Shannon, K.; Casey, P. J.; Young, S. G. Disruption of the mouse Rce1 gene results in defective Ras processing and mislocalization of Ras within cells. *J Biol Chem.* **274**: 8383-8390 (1999)
- Kim, J.-S.; Lee, C.; Foxworth, A.; Waldman, T. B-Raf is dispensable for K-Ras-mediated oncogenesis in human cancer cells. *Cancer Res.* **64**: 1932-1937 (2004)
- Kimmelman, A. C.; Nunez Rodriguez, N.; Chan, A. M. R-Ras3/M-Ras induces neuronal differentiation of PC12 cells through cell-type-specific activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol.* **22**: 5946-5961 (2002)
- Kirchner, J.; Kam, Z.; Tzur, G.; Bershadsky, A. D.; Geiger, B. Live-cell monitoring of tyrosine phosphorylation in focal adhesions following microtubule disruption. *J.Cell Sci.* **116**: 975-986 (2003)
- Kirschke, H.; Eerola, R.; Hopsu-Havu, V. K.; Bromme, D.; Vuorio, E. Antisense RNA inhibition of cathepsin L expression reduces tumorigenicity of malignant cells. *Eur J Cancer* **36**: 787-795 (2000)
- Koera, K.; Nakamura, K.; Nakao, K.; Miyoshi, J.; Toyoshima, K. *et al.* K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene.* **15**: 1151-1159 (1997)
- Kohl, N. E.; Omer, C. A.; Conner, M. W.; Anthony, N. J.; Davide, J. P. *et al.* Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nat Med.* **1**: 792-797 (1995)
- Kolch, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* **351** Pt 2: 289-305 (2000)
- Kolch, W.; Heidecker, G.; Lloyd, P.; Rapp, U. R. Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature* **349**: 426-428 (1991)
- Koop, S.; Schmidt, E. E.; MacDonald, I. C.; Morris, V. L.; Khokha, R. *et al.* Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 11080-11084 (1996)
- Kotani, K.; Kikuchi, A.; Doi, K.; Kishida, S.; Sakoda, T.; Kishi, K.; Takai, Y. The functional domain of the stimulatory GDP/GTP exchange protein (smg GDS) which interacts with the C-terminal geranylgeranylated region of rap1/Krev-1/smg p21. *Oncogene.* **7**: 1699-1704 (1992)
- Krengel, U.; Schlichting, I.; Scherer, A.; Schumann, R.; Frech, M. *et al.* Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell* **62**: 539-548 (1990)

Referenzen

- Kusumi, A.; Sako, Y.; Yamamoto, M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J.* **65**: 2021-2040 (1993)
- Lackie, J. M.; Dow, J. A. The dictionary of Cell Biology. *Academic press, second edition, London* (1995)
- Ladbury, J. E.; Chowdhry, B. Z. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chem.Biol.* **3**: 791-801 (1996)
- Lambert, J. M.; Lambert, Q. T.; Reuther, G. W.; Malliri, A.; Siderovski, D. P. *et al.* Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol.* **4**: 621-625 (2002)
- Lanning, C. C.; Ruiz-Velasco, R.; Williams, C. L. Novel mechanism of the co-regulation of nuclear transport of SmgGDS and Rac1. *J Biol Chem.* **278**: 12495-12506 (2003)
- Latinis, K. M.; Carr, L. L.; Peterson, E. J.; Norian, L. A.; Eliason, S. L. K. G. A. Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *J Immunol.* **158**: 4602-4611 (1997)
- Le Gall, M.; Chambard, J. C.; Breittmayer, J. P.; Grall, D.; Pouyssegur, J.; Van Obberghen-Schilling, E. The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal. *Mol Biol Cell.* **11**: 1103-1112 (2000)
- Lee, A. C.; Fenster, B. E.; Ito, H.; Takeda, K.; Bae, N. S. *et al.* Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* **274**: 7936-7940 (1999)
- Leever, S. J.; Paterson, H. F.; Marshall C.J. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**: 411-414 (1994)
- Lehmann, K.; Janda, E.; Pierreux, C. E.; Rytomaa, M.; Schulze, A. *et al.* Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev.* **14**: 2610-2622 (2000)
- Lengyel, E.; Gum, R.; Stepp, E.; Juarez, J.; Wang, H.; Boyd, D. Regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by an ERK1-dependent signaling pathway in a squamous cell carcinoma cell line. *J Cell Biochem.* **61**: 430-443 (1996)
- Lerner, E. C.; Zhang, T. T.; Knowles, D. B.; Qian, Y.; Hamilton, A. D.; Sebt, S. M. Inhibition of the prenylation of K-Ras, but not H- or N-Ras, is highly resistant to CAAX peptidomimetics and requires both a farnesyltransferase and a geranylgeranyltransferase I inhibitor in human tumor cell lines. *Oncogene* **15**: 1283-1288 (1997)
- Li, S.; Sonenberg, N.; Gingras, A. C.; Peterson, M.; Avdulov, S.; Polunovsky, V. A.; Bitterman, P. B. Translational control of cell fate: availability of phosphorylation sites on translational repressor 4E-BP1 governs its proapoptotic potency. *Mol Cell Biol.* **22**: 2853-2861 (2002)
- Li, W.; Zhu, T.; Guan, K. L. Transformation potential of Ras isoforms correlates with activation of phosphatidylinositol 3-kinase but not ERK. *J Biol Chem.* **279**: 37398-37406 (2004)
- Liberek, K.; Marszalek, J.; Ang, D.; Georgopoulos, C.; Zylicz, M. *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **88**: 2874-2878 (1991)
- Liebmann, C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal.* **13**: 777-785 (2001)
- Lin, S.-Y.; Makino, K.; Xia, W.; Matin, A.; Wen, Y. *et al.* Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature Cell.Biol.* **3**: 802-808 (2001)
- Liotta, L. A.; Goldfarb, R. H.; Brundage, R.; Siegal, G. P.; Terranova, V.; Garbisa, S. Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res.* **41**: 4629-4636 (1981)

Referenzen

- Liou, J. S.; Chen, C. Y.; Chen, J. S.; Faller, D. V. Oncogenic ras mediates apoptosis in response to protein kinase C inhibition through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* **275**: 39001-39011 (2000)
- Liou, J. S.; Chen, J. S.; Faller, D. V. Characterization of p21Ras-mediated apoptosis induced by protein kinase C inhibition and application to human tumor cell lines. *J Cell Physiol.* **198**: 277-294 (2004)
- Lloyd, A. C.; Obermuller, F.; Staddon, S.; Barth, C.; McMahon, M.; Land, H. Cooperating oncogenes target cyclin/cdk activity. *Genes Dev* **11**: 663-677 (1997)
- Lockyer, P. J.; Wennstrom, S.; Kupzig, S.; Venkateswarlu, K.; Downward, J.; Cullen, P. J. Identification of the ras GTPase-activating protein GAP1(m) as a phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-binding protein in vivo. *Curr Biol.* **9**: 265-268 (1999)
- Lowenstein, E. J.; Daly, R. J.; Batzer, A. G.; Li, W.; Margolis, B. *et al.* The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**: 431-442 (1992)
- Lu, D.; Hong, Y.; Raizada, M. K. AT₁ receptor-mediated nuclear translocation of Raf-1 in brain neurons. *J Neurochem.* **70**: 424-427 (1998)
- Luo, Z.; Tzivion, G.; Belshaw, P. J.; Vavvas, D.; Marshall, M.; Avruch, J. Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* **383**: 181-185 (1996)
- Ma, P.; Magut, M.; Chen, X.; Chen, C. Y. P53 is necessary for the apoptotic response mediated by a transient increase of Ras activity. *Mol Cell Biol.* **22**: 2928-2938 (2002)
- Maher, J.; Baker, D. A.; Manning, M.; Dibb, N. J.; Roberts, I. A. Evidence for cell-specific differences in transformation by N-, H- and K-ras. *Oncogene.* **11**: 1639-1647 (1995)
- Majewski, M.; Nieborowska-Skorska, M.; Salomoni, P.; Slupianek, A.; Reiss, K. *et al.* Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt. *Cancer Res* **59**: 2815-2819 (1999)
- Malliri, A.; van der Kammen, R. A.; Clark, K.; van der Valk, M.; Michiels, F.; Collard, J. G. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* **417**: 867-871 (2002)
- Malumbres, M.; Barbacid, M. *RAS* oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* **3**: 7-13 (2003)
- Malumbres, M.; Pellicer, A. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci.* **3**: d887-d912 (1998)
- Mamane, Y.; Petroulakis, E.; Rong, L.; Yoshida, K.; Ler, L. W.; Sonenberg, N. eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene.* **23**: 3172-3179 (2004)
- Mansour, S. J.; Matten, W. T.; Hermann, A. S.; Candia, J. M.; Rong, S. *et al.* Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**: 966-970 (1994)
- Marais, R.; Light, Y.; Mason, C.; Paterson, H.; Olson, M. F.; Marshall, C. J. Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science* **280**: 109-112 (1998)
- Marais, R.; Light, Y.; Paterson, H. F.; Marshall, C. J. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* **14**: 3136-3145 (1995)
- Marshall, C. J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-185 (1995)
- Marshall, C. J. How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol.* **11**: 732-736 (1999)
- Marte, B. M.; Rodriguez-Viciana, P.; Wennstrom, S.; Warne, P. H.; Downward, J. R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Curr Biol.* **7**: 63-70 (1997)

Referenzen

- Martin, G. S. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 467-475 (2001)
- Mason, C. S.; Springer, C. J.; Cooper, R. G.; Superti-Furga, G.; Marshall, C. J.; Marais, R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J.* 2137-2148 (1999)
- Matallanas, D.; Arozarena, I.; Berciano, M. T.; Aaronson, D. S.; Pellicer, A.; Lafarga, M.; Crespo, P. Differences on the inhibitory specificities of H-Ras, K-Ras, and N-Ras (N17) dominant negative mutants are related to their membrane microlocalization. *J Biol Chem.* **278**: 4572-4581 (2003)
- Maundrell, K.; Antonsson, B.; Magnenat, E.; Camps, M.; Muda, M. *et al.* Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J Biol Chem.* **272**: 25238-25242 (1997)
- Mayo, M. W.; Baldwin, A. S. The transcription factor NF- κ B control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* **1470**: M55-M62 (2000)
- Mayo, M. W.; Wang, C.-Y.; Cogswell, P. C.; Rogers-Graham, K. S.; Lowe, S. W.; Der, J. C.; Baldwin, A. S. Jr. Requirement of NF- κ B activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science* **278**: 1812-1815 (1997)
- McFall, A.; Ulku, A.; Lambert, Q. T.; Kusa, A.; Rogers-Graham, K.; Der C.J. Oncogenic ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol.* **21**: 5488-5499 (2001)
- McGill, G.; Shimamura, A.; Bates, R. C.; Savage, R. E.; Fisher, D. E. Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts. *J Cell Biol.* **138**: 901-911 (1997)
- McPherson, R. A.; Harding, A.; Roy, S.; Lane, A.; Hancock, J. F. Interactions of c-Raf-1 with phosphatidylserine and 14-3-3. *Oncogene* **18**: 3862-3869 (1999)
- Mirza, A. M.; Gysin, S.; Malek, N.; Nakayama, K.; Roberts, J. M.; McMahon, M. Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT. *Mol Cell Biol.* **24**: 10868-10881 (2004)
- Mitra, R. S.; Zhang, Z.; Henson, B. S.; Kurnit, D. M.; Carey, T. E.; D'Silva, N. J. Rap1A and rap1B ras-family proteins are prominently expressed in the nucleus of squamous carcinomas: nuclear translocation of GTP-bound active form. *Oncogene* **22**: 6243-6256 (2003)
- Mittnacht, S.; Paterson, H.; Olson, M. F.; Marshall, C. J. Ras signalling is required for inactivation of the tumour suppressor pRb cell-cycle control protein. *Curr Biol.* **7**: 219-221 (1997)
- Mochizuki, N.; Yamashita, S.; Kurokawa, K.; Ohba, Y.; Nagai, T.; Miyawaki, A.; Matsuda, M. Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* **411**: 1065-1068 (2001)
- Molton, S. A.; Todd, D. E.; Cook, S. J. Selective activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway fails to elicit Bax activation or apoptosis unless the phosphoinositide 3'-kinase (PI3K) pathway is inhibited. *Oncogene* **22**: 4690-4701 (2003)
- Moon, A.; Kim, M. S.; Kim, T. G.; Kim, S. H.; Kim, H. E.; Chen, Y. Q.; Kim, H. R. H-ras, but not N-ras, induces an invasive phenotype in human breast epithelial cells: a role for MMP-2 in the H-ras-induced invasive phenotype. *Int J Cancer.* **85**: 176-181 (2000)
- Moskalenko, S.; Tong, C.; Rosse, C.; Camonis, J.; White, M. A. Ral GTPases regulate exocyst assembly through dual subunit Interactions. *J Biol Chem.* **278**: 51743-51748 (2003)
- Mukhopadhyay, T.; Tainsky, M.; Cavender, A. C.; Roth, J. A. Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. *Cancer Res.* **51**: 1744-1748 (1991)
- Murakoshi, H.; Iino, R.; Kobayashi, T.; Fujiwara, T.; Ohshima, C.; Yoshimura, A.; Kusumi, A. Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 7317-7322 (2004)

Referenzen

- Murphy, G. A.; Graham, S. M.; Morita, S.; Reks, S. E.; Rogers-Graham, K. *et al.* Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase, but not RalGDS, in TC21/R-Ras2-mediated transformation. *J Biol Chem.* **277**: 9966-9975 (2002)
- Murray, D.; Arbuzova, A.; Hangyas-Mihalyne, G.; Gambhir, A.; Ben-Tal, N.; Honig, B.; McLaughlin, S. Electrostatic properties of membranes containing acidic lipids and adsorbed basic peptides: theory and experiment. *Biophys J.* **77**: 3176-3188 (1999)
- Muzio, M.; Stockwell, B. R.; Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S.; Dixit, V. M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem.* **273**: 2926-2930 (1998)
- Nakanishi, H.; Kaibuchi, K.; Orita, S.; Ueno, N.; Takai, Y. Different functions of Smg GDP dissociation stimulator and mammalian counterpart of yeast Cdc25. *J Biol Chem.* **269**: 15085-15091 (1994)
- Naldini, L.; Tamagnone, L.; Vigna, E.; Sachs, M.; Hartmann, G. *et al.* Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* **11**: 4825-4833 (1992)
- Nassar, N.; Horn, G.; Herrmann, C.; Block, C.; Janknecht, R.; Wittinghofer, A. Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal. *Nature Struct Biol.* **3**: 723-729 (1996)
- Nassar, N.; Horn, G.; Herrmann, C.; Scherer, A.; McCormick, F.; Wittinghofer, A. The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature* **375**: 554-560 (1995)
- Neal, S. E.; Eccleston, J. F.; Hall, A.; Webb, M. R. Kinetic analysis of the hydrolysis of GTP by p21N-ras: the basal GTPase mechanism. *J Biol Chem.* **263**: 19718-19722 (1988)
- Nerlov, C.; Rorth, P.; Blasi, F.; Johnsen, M. Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene* **6**: 1583-1592 (1991)
- Nielsen, K. H.; Gredsted, L.; Broach, J. R.; Willumsen, B. M. Sensitivity of wild type and mutant ras alleles to Ras specific exchange factors: Identification of factor specific requirements. *Oncogene* **20**: 2091-2100 (2001)
- Ninomiya, Y.; Kato, K.; Takahashi, A.; Ueoka, Y.; Kamikihara, T. *et al.* K-Ras and H-Ras activation promote distinct consequences on endometrial cell survival. *Cancer Res.* **64**: 2759-2765 (2004)
- Nishiyama, T.; Sasaki, T.; Takaishi, K.; Kato, M.; Yaku, H. *et al.* Rac p21 is involved in insulin-induced membrane ruffling and rho p21 is involved in hepatocyte growth factor- and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced membrane ruffling in KB cells. *Mol Cell Biol.* **14**: 2447-2456 (1994)
- Normanno, N.; Bianco, C.; De Luca, A.; Salomon, D. S. The role of EGF-related peptides in tumor growth. *Front Biosci.* **6**: D685-D707 (2001)
- Oft, M.; Peli, J.; Rudaz, C.; Schwarz, H.; Beug, H.; Reichmann E. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev.* **10**: 2462-2477 (1996)
- Ohba, Y.; Mochizuki, N.; Yamashita, S.; Chan, A. M.; Schrader, J. W. *et al.* Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem.* **275**: 20020-20026 (2000)
- Ohkanda, J.; Knowles, D. B.; Blaskovich, M. A.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. Inhibitors of protein farnesyltransferase as novel anticancer agents. *Curr Top Med Chem.* **2**: 303-323 (2002)
- Oldham, S. M.; Clark, G. J.; Gangarosa, L. M.; Coffey, R. J. J.; Der, C. J. Activation of the Raf-1/MAP kinase cascade is not sufficient for Ras transformation of RIE-1 epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6924-6928 (1996)
- Onida, F.; Kantarjian, H. M.; Smith, T. L.; Ball, G.; Keating, M. J. *et al.* Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood.* **99**: 840-849 (2002)
- Otsuka, T.; Takayama, H.; Sharp, R.; Celli, G.; LaRochelle, W. J. *et al.* c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype. *Cancer Res.* **58**: 5157-5167 (1998)

Referenzen

- Otsuki, Y.; Tanaka, M.; Kamo, T.; Kitanaka, C.; Kuchino, Y.; Sugimura, H. Guanine nucleotide exchange factor, Tiam1, directly binds to c-Myc and interferes with c-Myc-mediated apoptosis in rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem.* **278**: 5132-5140 (2003)
- Pacold, M. E.; Suire, S.; Perisic, O.; Lara-Gonzalez, S.; Davis, C. T. *et al.* Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector Phosphoinositide 3-Kinase γ . *Cell* **103**: 931-938 (2000)
- Pai, E. F.; Kregel, U.; Petsko, G. A.; Goody, R. S.; Kabsch, W.; Wittinghofer, A. Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* **9**: 2351-2359 (1990)
- Park, M. J.; Jang, Y. K.; Choi, E. S.; Kim, H. S.; Park, S. D. Fission yeast Rap1 homolog is a telomere-specific silencing factor and interacts with Taz1p. *Mol Cells* **13**: 327-333 (2002)
- Pawson, T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**: 191-203 (2004)
- Payne, D. M.; Rossomando, A. J.; Martino, P.; Erickson, A. K.; Her, J. H. *et al.* Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* **10**: 885-892 (1991)
- Paz, A.; Haklai, R.; Elad-Sfadia, G.; Ballan, E.; Kloog, Y. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* **20**: 7486-7493 (2001)
- Pekarsky, Y.; Koval, A.; Hallas, C.; Bichi, R.; Tresini, M. *et al.* Tc11 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 3028-3033 (2000)
- Pells, S.; Divjak, M.; Romanowski, P.; Impey, H.; Hawkins, N. J. *et al.* Developmentally regulated expression of murine K-ras isoforms. *Oncogene* **15**: 1781-1786 (1997)
- Peruzzi, F.; Prisco, M.; Morrione, A.; Valentini, B.; Baserga, R. Anti-apoptotic signaling of the insulin-like growth factor-I receptor through mitochondrial translocation of c-Raf and Nedd4. *J Biol Chem.* **276**: 25990-25996 (2001)
- Pfarr, C. M.; Mechta, F.; Spyrou, G.; Lallemand, D.; Carillo, S.; Yaniv, M. Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell* **76**: 747-760 (1994)
- Phillips, R. A.; Hunter, J. L.; Hunter, J.; Eccleston, J. F.; Webb, M. R. The mechanism of Ras GTPase activation by Neurofibromin. *Biochemistry* **42**: 3956-3965 (2003)
- Polunovsky, V. A.; Gingras, A. C.; Sonenberg, N.; Peterson, M.; Tan, A. *et al.* Translational control of the antiapoptotic function of Ras. *J Biol Chem.* **275**: 24776-24780 (2000)
- Ponting, C. P.; Benjamin, D. R. A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci.* **21**: 422-425 (1996)
- Post, P. L.; Tyska, M. J.; O'Connell, C. B.; Johung, K.; Hayward, A.; Mooseker, M. S. Myosin-IXb is a single-headed and processive motor. *J Biol Chem.* **277**: 11679-11683 (2002)
- Potempa, S.; Ridley, A. J. Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell* **9**: 2185-2200 (1998)
- Premzl, A.; Zavasnik-Bergant, V.; Turk, V.; Kos, J. Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix *in vitro*. *Exp. Cell. Res.* **238**: 206-214 (2003)
- Prendergast, G. C. Signal transduction: putting translation before transcription. *Cancer Cell* **4**: 244-245 (2003)
- Prendergast, G. C.; Khosravi-Far, R.; Solski, P. A.; Kurzawa, H.; Lebowitz, P. F.; Der, C. J. Critical role of RhoB in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* **10**: 2289-2296 (1995)
- Prior, I. A.; Hancock, J. F. Compartmentalization of Ras proteins. *J Cell Sci.* **114**(Pt 9): 1603-1608 (2001)

Referenzen

- Prior, I. A.; Harding, A.; Yan, J.; Sluimer, J.; Parton, R. G.; Hancock, J. F. GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol.* **3**: 368-375 (2001)
- Prior, I. A.; Muncke, C.; Parton, R. G.; Hancock, J. F. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol.* **160**: 165-170 (2003)
- Putchu, G. V.; Le, S.; Frank, S.; Besirli, C. G.; Clark, K. *et al.* JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron.* **38**: 899-914 (2003)
- Qiu, R.-G.; McCormick, F.; Symons, M. The GTPase Rac1 controls cell proliferation and cooperates with the MAP kinase pathway in fibroblast transformation. *Nature (London)* **347**: 457-459 (1995)
- Quilliam, L. A.; Hisaka, M. M.; Zhong, S.; Lowry, A.; Mosteller, R. D. *et al.* Involvement of the switch 2 domain of Ras in its interaction with guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem.* **271**: 11076-11082 (1996)
- Rajasekhar, V. K.; Viale, A.; Socci, N. D.; Wiedmann, M.; Hu, X.; Holland, E. C. Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. *Mol Cell* **12**: 889-901 (2003)
- Rak, J.; Mitsushashi, Y.; Bayko, L.; Filmus, J.; Shirasawa, S.; Sasazuki, T.; Kerbel, R. S. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* **55**: 4575-4580 (1995)
- Rak, J.; Mitsushashi, Y.; Sheehan, C.; Tamir, A.; Vitoria-Petit, A. *et al.* Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res.* **60**: 490-498 (2000)
- Rangarajan, A.; Hong, S. J.; Gifford, A.; Weinberg, R. A. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* **6**: 171-182 (2004)
- Rebhun, J. F.; Castro, A. F.; Quilliam, L. A. Identification of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for the Rap1 GTPase. Regulation of MR-GEF by M-Ras-GTP interaction. *J Biol Chem.* **275**: 34901-34908 (2000)
- Rebollo, A.; Perez-Sala, D.; Martinez-A., C. Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: implications in prevention of apoptosis. *Oncogene* **18**: 4930-4939 (1999)
- Reuther, G. W.; Lambert, Q. T.; Rebhun, J. F.; Caligiuri, M. A.; Quilliam, L. A.; Der, C. J. RasGRP4 is a novel Ras activator isolated from acute myeloid leukemia. *J Biol Chem.* **277**: 30508-30514 (2002)
- Ribatti, D.; Leali, D.; Vacca, A.; Giuliani, R.; Gualandris, A. *et al.* In vivo angiogenic activity of urokinase: role of endogenous fibroblast growth factor-2. *J Cell Sci.* **112**: 4213-4221 (1999)
- Ridley, A. J.; Comoglio, P. M.; Hall, A. Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol Cell Biol.* **15**: 1110-1122 (1995)
- Ridley, A. J.; Hall, A. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**: 389-399 (1992)
- Ridley, A. J.; Paterson, H. F.; Johnston, C. L.; Diekmann, D.; Hall, A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**: 401-410 (1992)
- Ried, S.; Jäger, C.; Jeffers, M.; Vande Woude G.F.; Graeff, H.; Schmitt, M.; Lengyel, E. Activation mechanisms of the urokinase-type plasminogen activator by hepatocyte growth factor/scatter factor. *J.Biol.Chem.* **274**: 16377-16386 (1999)
- Riedl, S.; Shi, Y. Molecular mechanisms of Caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**: 897-907 (2004)
- Ries, S.; Biederer, C. W. D.; Shifman, O.; Shirasawa, S.; Sasazuki, T. *et al.* Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell* **103**: 321-330 (2000)

Referenzen

- Rocks, O.; Peyker, A.; Kahms, M.; Verveer, P. J.; Koerner, C.; Lumbierres, M.; Kuhlmann, J.; Waldmann, H.; Wittinghofer, A.; Bastiaens, P. I. H. An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* **307**: 1746-1752 (2005)
- Rodriguez-Puebla, M. L.; Robles, A. I.; Conti, C. J. Ras activity and cyclin D1 expression: an essential mechanism of mouse skin tumor development. *Mol. Carcinog.* **24**: 1-6 (1999)
- Rodriguez-Viciano, P.; Sabatier, C.; McCormick, F. Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol.* **24**: 4943-4954 (2004)
- Rodriguez-Viciano, P.; Warne, P. H.; Dhand, R.; Vanhaesebroeck, B.; Gout, I. *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature.* **370**: 527-532 (1994)
- Rodriguez-Viciano, P.; Warne, P. H.; Khwaja, A.; Marte, B. M.; Pappin, D. *et al.* Role of Phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* **89**: 457-467 (1997)
- Romashkova, J. A.; Makarov, S. S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**: 86-90 (1999)
- Romero, F.; Ramos-Morales, F.; Dominguez, A.; Rios, R. M.; Schweighoffer, F. *et al.* Grb2 and its *apoptotic* isoform Grb3-3 associate with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C, and these interactions are modulated by poly(U) RNA. *J Biol Chem* **273**: 7776-7781 (1998)
- Rommel, C.; Radziwill, G.; Lovric, J.; Noeldeke, J.; Heinicke, T. *et al.* Activated Ras displaces 14-3-3 protein from the amino terminus of c-Raf-1. *Oncogene.* **12**: 609-619 (1996)
- Rong, S.; Bodescot, M.; Blair, D.; Dunn, J.; Nakamura, T. *et al.* Tumorigenicity of the *met* proto-oncogene and the gene for Hepatocyte growth factor. *Mol Cell Biol.* **12**: 5152-5158 (1992)
- Rosario, M.; Paterson, H. F.; Marshall, C. J. Activation of the Raf/MAP kinase cascade by the Ras-related protein TC21 is required for the TC21-mediated transformation of NIH 3T3 cells. *EMBO J.* **18**: 1270-1279 (1999)
- Rosario, M.; Paterson, H. F.; Marshall, C. J. Activation of the Ral and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways by the ras-related protein TC21. *Mol Cell Biol.* **21**: 3750-3762 (2001)
- Rosen, K.; Rak, J.; Jin, J.; Kerbel, R. S.; Newman, M. J.; Filmus, J. Downregulation of the pro-apoptotic protein Bak is required for the ras-induced transformation of intestinal epithelial cells. *Curr Biol* **8**: 1331-1334 (1998)
- Rosen, K.; Rak, J.; Leung, T.; Dean, N. M.; Kerbel, R. S.; Filmus, J. Activated Ras prevents downregulation of Bcl-X(L) triggered by detachment from the extracellular matrix. A mechanism of Ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *J Cell Biol.* **149**: 447-456 (2000)
- Rotblat, B.; Prior, I. A.; Muncke, C.; Parton, R. G.; Kloog, Y.; Henis, Y. I.; Hancock, J. F. Three separable domains regulate GTP-dependent association of H-ras with the plasma membrane. *Mol Cell Biol.* **24**: 6799-6810 (2004)
- Roudebush, M.; Slabe, T.; Sundaram, V.; Hoppel, C. L.; Golubic, M.; Stacey, D. W. Neurofibromin colocalizes with mitochondria in cultured cells. *Exp Cell Res.* **236**: 161-172 (1997)
- Roux, P. P.; Richards, S. A.; Blenis, J. Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. *Mol Cell Biol.* **23**: 4796-4804 (2003)
- Roy, M. O.; Leventis, R.; Silviu, J. R. Mutational and biochemical analysis of plasma membrane targeting mediated by the farnesylated, polybasic carboxy terminus of K-ras4B. *Biochemistry* **39**: 8298-8307 (2000)
- Rubio, I.; Pusch, R.; Wetzker, R. Quantification of absolute Ras-GDP/GTP levels by HPLC separation of Ras-bound [(32)P]-labelled nucleotides. *J Biochem Biophys Methods* **58**: 111-117 (2004)
- Rubio, I.; Rennert, K.; Wittig, U.; Wetzker, R. Ras activation in response to lysophosphatidic acid requires a permissive input from the epidermal growth factor receptor. *Biochem J.* **376**(Pt 3): 571-576 (2003)

Referenzen

- Rubio, I.; Rodriguez-Viciana, P.; Downward, J.; Wetzker, R. Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Biochem J.* **326**: 891-895 (1997)
- Rubio, I.; Wittig, U.; Meyer, C.; Heinze, R.; Kadereit, D. *et al.* Farnesylation of Ras is important for the interaction with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Eur J Biochem.* **266**: 70-82 (1999)
- Rudel, T.; Bokoch, G. M. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* **276**: 1571-1574 (1997)
- Rudolph, M. G.; Linnemann, T.; Grünewald, P.; Wittinghofer, A.; Vetter, I. R.; Herrmann, C. Thermodynamics of Ras/effector and Cdc42/effector interactions probed by isothermal calorimetry. *J Biol Chem.* **276**: 23914-23921 (2001)
- Rul, W.; Zugasti, O.; Roux, P.; Peyssonnaud, C.; Eychene, A. *et al.* Activation of ERK, controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt, is required for anoikis. *Ann N Y Acad Sci.* **973**: 145-148 (2002)
- Rusciano, D.; Lorenzoni, P.; Burger, M. M. Expression of constitutively activated hepatocyte growth factor/scatter factor receptor (c-met) in B16 melanoma cells selected for enhanced liver colonization. *Oncogene* **11**: 1979-1987 (1995)
- Russell, M.; Lange-Carter, C.; Johnson, G. L. Direct interaction between Ras and the kinase domain of Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (Mek1). *J Biol Chem.* **270**: 11757-11760 (1995)
- Rusyn, E. V.; Reynolds, E. R.; Shao, H.; Grana, T. M.; Chan, T. O.; Andres, D. A.; Cox, A. D. Rit, a non-lipid-modified Ras-related protein, transforms NIH3T3 cells without activating the ERK, JNK, p38 MAPK or PI3K/Akt pathways. *Oncogene* **19**: 4685-4694 (2000)
- Rutter, J. L.; Mitchell, T. I.; Buttice, G.; Meyers, J.; Gusella, J. F.; Ozelius, L. J.; Brinckerhoff, C. E. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res.* **58**: 5321-5325 (1998)
- Ryo, A.; Liou, Y.-C.; Wulf, G.; Nakamura, M.; Lee, S. W.; Lu, P. L. *PIN1* is an E2F target gene essential for *Neu/Ras*-induced transformation of mammary epithelial cells. *Mol.Cell.Biol.* **22**: 5281-5295 (2002)
- Rytömaa, M.; Lehmann, K.; Downward, J. Matrix detachment induces caspase-dependent cytochrome c release from mitochondria: inhibition by PKB/Akt but not Raf signalling. *Oncogene* **19**: 4461-4468 (2000)
- Sa, G.; Murugesan, G.; Jaye, M.; Ivashchenko, Y.; Fox, P. L. Activation of cytosolic phospholipase A2 by basic fibroblast growth factor via p42 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation pathway in endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **270**: 2360-2366 (1995)
- Sabbagh, L.; Kaech, S. M.; Bourbonniere, M.; Woo, M.; Cohen, L. Y. *et al.* The selective increase in caspase-3 expression in effector but not memory T cells allows susceptibility to apoptosis. *J Immunol.* **173**: 5425-5433 (2004)
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467 (1977)
- Santana, C.; Ortega, E.; Garcia-Carranca, A. Oncogenic H-ras induces cyclin B1 expression in a p53-independent manner. *Mutat Res.* **508**: 49-(2002)
- Sattler, M.; Pride, Y. B.; Ma, P.; Gramlich, J. L.; Chu, S. C. *et al.* A novel small molecule met inhibitor induces apoptosis in cells transformed by the oncogenic TPR-MET tyrosine kinase. *Cancer Res.* **63**: 5462-5469 (2003)
- Schaeffer, H. J.; Catling, A. D.; Eblen, S. T.; Collier, L. S.; Krauss, A.; Weber, M. J. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* **281**: 1668-1671 (1998)
- Scheele, J. S.; Rhee, J. M.; Boss, G. R. Determination of absolute amounts of GDP and GTP bound to Ras in mammalian cells: comparison of parental and Ras-overproducing NIH 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1097-1100 (1995)

Referenzen

- Scheffzek, K.; Ahmadian, M. R.; Kabsch, W.; Wiesmüller, L.; Lautwein, A.; Schmitz, F.; Wittinghofer, A. The ras-rasGAP complex: structural basis for the GTPase activation and its loss in oncogenic ras mutants. *Science* **277**: 333-338 (1997)
- Schlenstedt, G. Protein import into the nucleus. *FEBS Lett.* **389**: 75-79 (1996)
- Schmidt, A.; Hall, A. The Rho exchange factor Net1 is regulated by nuclear sequestration. *J Biol Chem.* **277**: 14581-14588 (2002)
- Schulze, A.; Lehmann, K.; Jeffries, H. B.; McMahon, M.; Downward, J. Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes & Dev.* **15**: 981-994 (2001)
- Schwarz, C. S.; Seyfried, J.; Evert, B. O.; Klockgether, T.; Wullner, U. Bcl-2 up-regulates *ha-ras* mRNA expression and induces c-Jun phosphorylation at Ser73 via an ERK-dependent pathway in PC 12 cells. *Neuroreport* **13**: 2439-2442 (2002)
- Serrano, M.; Lee, H.-W.; Chin, L.; Cordon-Cardo, C.; Beach, D. Role of INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**: 27-37 (1997)
- Shao, J.; Sheng, H.; DuBois, R. N.; Beauchamp, R. D. Oncogenic Ras-mediated cell growth arrest and apoptosis are associated with increased ubiquitin-dependent cyclin D1 degradation. *J Biol Chem.* **275**: 22916-22924 (2000)
- Shields, J. M.; Pruitt, K.; McFall, A.; Shaub, A.; Der, C. J. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol.* **10**: 147-154 (2000)
- Silvius, J. R. Mechanisms of Ras protein targeting in mammalian cells. *J Membrane Biol.* **190**: 83-92 (2002)
- Simons, K.; Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572 (1997)
- Sionov, R. V.; Haupt, Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**: 6145-6157 (1999)
- Smolikov, S.; Krauskopf, A. The Rap1p-telomere complex does not determine the replicative capacity of telomerase-deficient yeast. *Mol Cell Biol.* **23**: 8729-8739 (2003)
- Sommer, K. W.; Schamberger, C. J.; Schmidt, G. E.; Sasgary, S.; Cerni, C. Inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin is upregulated by oncogenic c-H-Ras. *Oncogene.* **22**: 4266-4280 (2003)
- Song, P.; Wie, J.; Plummer, H. 3.; Wang, H. C. Potentiated caspase-3 in Ras-transformed 10T1/2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **322**: 557-564 (2004)
- Stanton, V. P. Jr.; Nichols, D. W.; Laudano, A. P.; Cooper, G. M. Definition of the human *raf* amino-terminal regulatory region by deletion mutagenesis. *Mol Cell Biol.* **9**: 639-647 (1989)
- Stokoe, D.; Macdonald, S. G.; Cadwallader, K.; Symons, M.; Hancock, J. F. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* **264**: 1463-1467 (1994)
- Suetsugu, S.; Takenawa, T. Translocation of N-WASP by nuclear localization and export signals into the nucleus modulates expression of HSP90. *J Biol Chem.* **278**: 42515-42523 (2003)
- Suzuki, J.; Kaziro, Y.; Koide, H. Positive regulation of skeletal myogenesis by R-Ras. *Oncogene* **19**: 1138-1146 (2000)
- Sydor, J. R.; Engelhard, M.; Wittinghofer, A.; Goody, R. S.; Herrmann, C. Transient kinetic studies on the interaction of Ras and the Ras-binding domain of c-Raf-1 revealed rapid equilibration of the complex. *Biochemistry* **37**: 14292-14299 (1998)
- Takai, Y.; Kaibuchi, K.; Kikuchi, A.; Sasaki, T.; Shirataki, H. Regulators of small GTPases. *Ciba Found Symp.* **176**: 128-138; discussion 138-146 (1993)
- Takai, Y.; Sasaki, T.; Matozaki, T. Small GTP-binding proteins. *Physiol.Rev.* **81**: 153-208 (2001)

Referenzen

- Takaya, A.; Ohba, Y.; Kurokawa, K.; Matsuda, M. RalA activation at nascent lamellipodia of epidermal growth factor-stimulated Cos7 cells and migrating Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*. **15**: 2549-2557 (2004)
- Tall, G. G.; Barbieri, M. A.; Stahl, P. D.; Horazdovsky, B. F. Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Dev Cell*. **1**: 73-82 (2001)
- Tan, Y.; Ruan, H.; Demeter, M. R.; Comb, M. J. p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem*. **274**: 34859-34867 (1999)
- Thissen, J. A.; Gross, J. M.; Subramanian, K.; Meyer, T.; Casey, P. J. Prenylation-dependent association of Ki-Ras with microtubules. Evidence for a role in subcellular trafficking. *J Biol Chem*. **272**: 30362-30370 (1997)
- Tocque, B.; Delumeau, I.; Parker, F.; Maurier, F.; Multon, M. C.; Schweighoffer, F. Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras. *Cell Signal* **9**: 153-158 (1997)
- Tournier, C.; Hess, P.; Yang, D. D.; Xu, J.; Turner, T. K. *et al*. Requirement of JNK for stress-induced activation of cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**: 870-874 (2000)
- Treisman, R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*. **8**: 205-215 (1996)
- Trent, J. C. M. D. J.; Loughlin, S. M.; Harbison, M. T.; Fernandez, A.; Ananthaswamy, H. N. Ras signaling in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *EMBO J* **15**: 4497-4505 (1996)
- Tsuruta, F.; Sunayama, J.; Mori, Y.; Hattori, S.; Shimizu, S. *et al*. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J*. **23**: 1889-1899 (2004)
- Tulasne, D.; Paumelle, R.; Widner, K. M.; Vandenbunder, B.; Fafeur, V. The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling and cell scattering. *Mol Cell Biol*. **10**: 551-565 (1999)
- Ueda, Y.; Hirai, S.; Osada, S.; Suzuki, A.; Mizuno, K.; Ohno, S. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem*. **271**: 23512-23519 (1996)
- Ulku, A. S.; Schafer, R.; Der, C. J. Essential role of Raf in Ras transformation and deregulation of matrix metalloproteinase expression in ovarian epithelial cells. *Mol Cancer Res*. **1**: 1077-1088 (2003)
- Umanoff, H.; Edelmann, W.; Pellicer, A.; Kucherlapati, R. The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 1709-1713 (1995)
- Ura, S.; Masuyama, N.; Graves, J. D.; Gotoh, Y. Mst1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and independent pathways. *Genes to Cells* **6**: 519-530 (2001)
- Urano, T.; Emkey, R.; Feig, L. A. Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J*. **15**: 810-816 (1996)
- Varghese, H. J.; Davidson, M. T.; MacDonald, I. C.; Wilson, S. M.; Nadkarni, K. V.; Groom, A. C.; Chambers, A. F. Activated ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases. *Cancer Res*. **62**: 887-891 (2002)
- Vetter, I. R.; Linnemann, T.; Wohlgemuth, S.; Geyer, M.; Kalbitzer, H. R.; Herrmann, C.; Wittinghofer, A. Structural and biochemical analysis of Ras-effector signaling via RalGDS. *FEBS Lett*. **451**: 175-180 (1999)
- Vetter, I. R.; Wittinghofer, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**: 1299-1304 (2001)
- Villalonga, P.; Lopez-Alcala, C.; Bosch, M.; Chiloeches, A.; Rocamora, N. *et al*. Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras, and modulates its downstream signaling. *Mol Cell Biol*. **21**: 7345-7354 (2001)
- Villalonga, P.; Lopez-Alcala, C.; Chiloeches, A.; Gil, J.; Marais, R.; Bachs, O.; Agell, N. Calmodulin prevents activation of Ras by PKC in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*. **277**: 37929-37935 (2002)

Referenzen

- Voice, J. K.; Klemke, R. L.; Le, A.; Jackson, J. H. Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J Biol Chem.* **274**: 17164-17170 (1999)
- Vojtek, A. B.; Hollenberg, S. M.; Cooper, J. A. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**: 205-214 (1993)
- von Gise, A.; Lorenz, P.; Wellbrock, C.; Hemmings, B.; Berberich-Siebelt, F.; Rapp, U. R.; Troppmair, J. Apoptosis suppression by Raf-1 and MEK1 requires MEK- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signals. *Mol Cell Biol* **21**: 2324-2336 (2001)
- Walker, S. A.; Lockyer, P. J. Visualizing Ras signalling in real-time. *J Cell Sci.* **117**: 2879-2886 (2004)
- Walsh, A. B.; Bar-Sagi, D. Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras. *J Biol Chem.* **276**: 15609-15615 (2001)
- Wang, H. G.; Rapp, U. R.; Reed, J. C. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* **87**: 629-638 (1996)
- Wang, H. G.; Reed, J. C. Bcl-2, Raf-1 and mitochondrial regulation of apoptosis. *Biofactors* **8**: 13-16 (1998)
- Wang, S.; Ghosh, R. N.; Chellappan, S. P. Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Mol Cell Biol.* **18**: 7487-7498 (1998)
- Wang, Y.; Waldron, R. T.; Dhaka, A.; Patel, A.; Riley, M. M.; Rozengurt, E.; Colicelli, J. The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins. *Mol Cell Biol.* **22**: 916-926 (2002)
- Ward, R. L.; Todd, A. V.; Santiago, F.; O'Connor, T.; Hawkins, N. J. Activation of K-ras Oncogene in colorectal neoplasms is associated with decreased apoptosis. *Cancer* **79**: 1106-1113 (1997)
- Watabe, T.; Yoshida, K.; Shindoh, M.; Kaya, M.; Fujikawa, K. *et al.* The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int J Cancer.* **77**: 128-137 (1998)
- Watnick, R. S.; Cheng, Y.-N.; Rangarajan, A.; Ince, T. A.; Weinberg, R. A. Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* **3**: 219-231 (2003)
- Weidner, K. M.; Sachs, M.; Birchmeier, W. The Met receptor tyrosine kinase transduces mobility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/Hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J. Cell Biol.* **121**: 145-154 (1993)
- Weiner, M. P.; Costa, G. L.; Schoettlin, W.; Cline, J.; Mathur, E.; Bauer, J. C. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151**: 119-123 (1994)
- Weiss, B.; Shannon, K.; Bollag, G. Hyperactive Ras as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet.* **89**: 14-22 (1999)
- Wells, A.; Marti, U. Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**: 1-6 (2002)
- Wetzker, R.; Böhmer, F. D. Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**: 651-657 (2003)
- White, L. A.; Maute, C.; Brinckerhoff, C. E. ETS sites in the promoters of the matrix metalloproteinases collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) are auxiliary elements that regulate basal and phorbol-induced transcription. *Connect Tissue Res.* **36**: 321-335 (1997)
- Wilhelm, O.; Hafter, R.; Henschen, A.; Schmitt, M.; Graeff, H. Role of plasmin in the degradation of the stroma-derived fibrin in human ovarian carcinoma. *Blood* **75**: 1673-1678 (1990)
- Williams, C. L. The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell Signal.* **15**: 1071-1080 (2003)

Referenzen

- Williams, J. G.; Drugan, J. K.; Yi, G. S.; Clark, G. J.; Der, C. J.; Campbell, S. L. Elucidation of binding determinants and functional consequences of Ras/Raf-cysteine-rich domain interactions. *J Biol Chem.* **275**: 22172-22179 (2000)
- Willingham, M. C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem.* **47**: 1101-1109 (1999)
- Willingham, M. C.; Pastan, I.; Shih, T. Y.; Scolnick, E. M. Localization of the src gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell.* **19**: 1005-1014 (1980)
- Willis, A. E. Translational control of growth factor and proto-oncogene expression. *Int J Biochem Cell Biol.* **31**: 73-86 (1999)
- Wolfman, A. Ras isoform-specific signaling: location, location, location. *Sci STKE.* **2001**(96): PE2-(2001)
- Wolfman, J. C.; Palmby, T.; Der, C. J.; Wolfman, A. Cellular N-Ras promotes cell survival by downregulation of Jun N-terminal protein kinase and p38. *Mol Cell Biol.* **22**: 1589-1606 (2002)
- Wolfman, J. C.; Wolfman, A. Endogenous c-N-Ras provides a steady-state anti-apoptotic signal. *J Biol Chem.* **275**: 19315-19323 (2000)
- Wulf, G. M.; Ryo, A.; Wulf, G. G.; Lee, S. W.; Niu, T. *et al.* Pin 1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J.* **20**: 3459-3472 (2001)
- Wurzer, G.; Mosgoeller, W.; Chabicovsky, M.; Cerni, C.; Wesierska-Gadek, J. Nuclear Ras: Unexpected subcellular distribution of oncogenic forms. *J Cell Biochem* **81**(S36): 1-11 (2001)
- Xia, Y.; Makris, C.; Su, B.; Li, E.; Yang, J.; Nemerow, G. R.; Karin, M. MEK Kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **97**: 5243-5248 (2000)
- Xia, Z.; Dickens, M.; Raingeaud, J.; Davis, J. R.; Greenberg, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**: 1326-1331 (1995)
- Xue, L.; Murray, J. H.; Tolkovsky, A. M. The Ras/phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/ERK pathways function as independent survival modules each of which inhibits a distinct apoptotic signaling pathway in sympathetic neurons. *J Biol Chem* **275**: 8817-8824 (2000)
- Yaku, H.; Sasaki, T.; Takai, Y. The Dbl oncogene product as a GDP/GTP exchange protein for the Rho family: its properties in comparison with those of Smg GDS. *Biochem Biophys Res Commun.* **198**: 811-817 (1994)
- Yamashita, S.; Mochizuki, N.; Ohba, Y.; Tobiume, M.; Okada, Y. *et al.* CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-ras, and Rap1. *J Biol Chem.* **275**: 25488-25493 (2000)
- Yan, J.; Roy, S.; Apolloni, A.; Lane, A.; Hancock, J. F. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and Phosphoinositide 3-Kinase. *J Biol Chem* **273**: 24052-24056 (1998)
- Yan, Y.; Shirakabe, K.; Werb, Z. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J Cell Biol.* **158**: 221-226 (2002)
- Yang, X.; Chang, H. Y.; Baltimore, D. Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell* **1**: 319-325 (1998)
- Yao, Z.; Flash, I.; Raviv, Z.; Yung, Y.; Asscher, Y.; Pleban, S.; Seger, R. Non-regulated and stimulated mechanisms cooperate in the nuclear accumulation of MEK1. *Oncogene* **20**: 7588-7596 (2001)
- Yin, J. Q.; Gao, J.; Shao, R.; Tian, W. N.; Wang, J.; Wan, Y. siRNA agents inhibit oncogene expression and attenuate human tumor cell growth. *J Exp Ther Oncol.* **3**: 194-204 (2003)
- Yoshizaki, H.; Ohba, Y.; Kurokawa, K.; Itoh, R. E.; Nakamura, T. *et al.* Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J Cell Biol.* **162**: 223-232 (2003)

Referenzen

- Yujiri, T.; Sather, S.; Fanger, C. R.; Johnson, G. L. Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* **282**: 1911-1914 (1998)
- Zerial, M.; McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 107-117 (2001)
- Zha, J.; Harada, H.; Yang, E.; Jockel, J. K. S. J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X. *Cell* **87**: 619-628 (1996)
- Zhadanov, A. B.; Provance, D. W. Jr.; Speer, C. A.; Coffin, J. D.; Goss, D. *et al.* Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development. *Curr Biol.* **9**: 888-(1999)
- Zhang, J.; Schultz, R. M. Fibroblasts transformed by different *ras* oncogenes show similar patterns of protease gene expression and regulation. *Cancer Res.* **52**: 6682-6689 (1992)
- Zhang, Z.; Vuori, K.; Wang, H.; Reed, J. C.; Ruoslahti, E. Integrin activation by R-ras. *Cell* **85**: 61-69 (1996)
- Zhong, J.; Troppmair, J.; Rapp U.R. Independent control of cell survival by Raf-1 and Bcl-2 at the mitochondria. *Oncogene* **20**: 4807-4816 (2001)
- Zhou, G. L.; Zhuo, Y.; King, C. C.; Fryer, B. H.; Bokoch, G. M.; Field, J. Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration. *Mol Cell Biol.* **23**: 8058-8069 (2003)
- Zimmermann, T.; Rietdorf, J.; Girod, A.; Georget, V.; Pepperkok, R. Spectral imaging and linear un-mixing enables improved FRET efficiency with a novel GFP2-YFP FRET pair. *FEBS Lett.* **531**: 245-249 (2002)

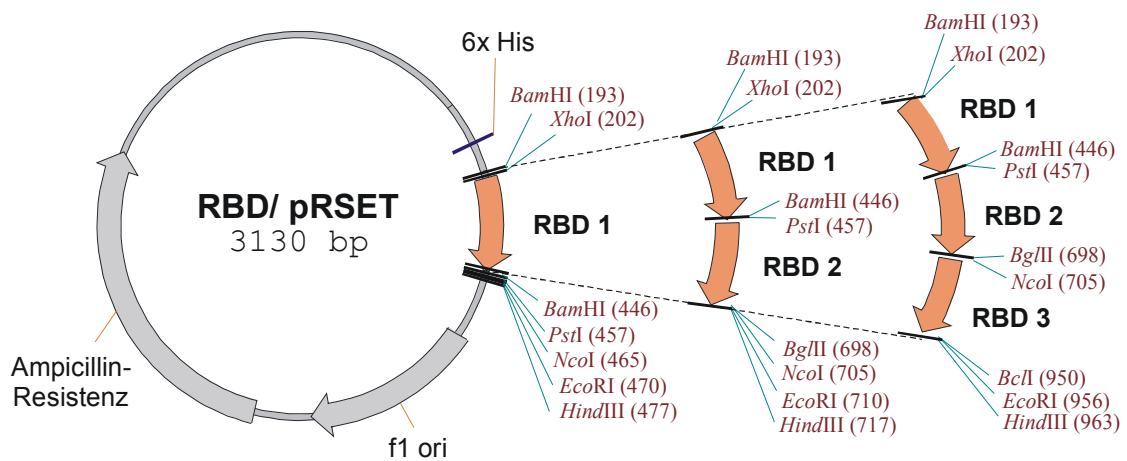
Anhang

Entwicklung von multivalenten Sonden zur gezielten Analyse und Beeinflussung Ras-abhängiger Signalwege

Martin Augsten

Material und Methoden

A



B

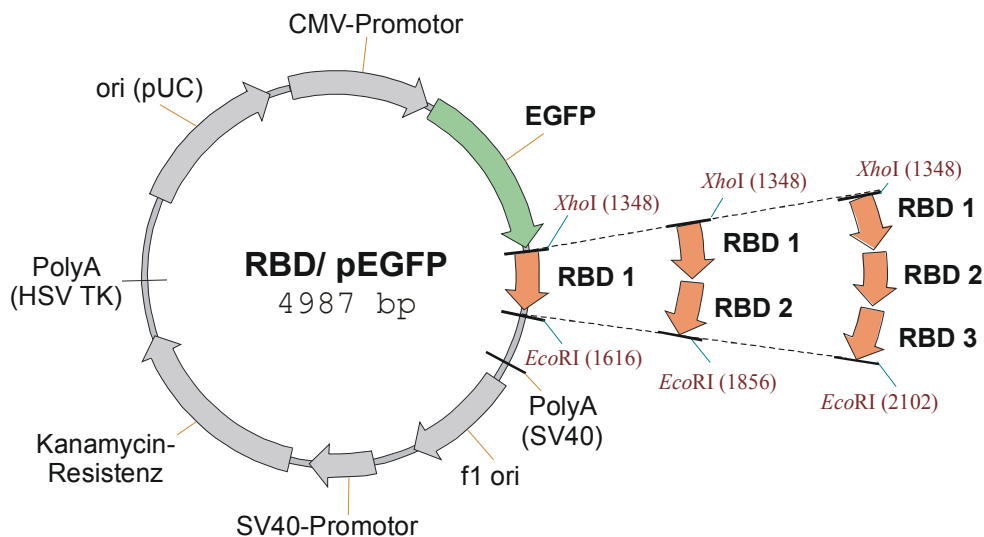


Abb. A1. Schematische Darstellung der mono-, di- und trimeren MSOR-Konstrukte in pRSET B und pEGFP-C2. Zunächst wurde eine einzelne RBD der Varianten von *WT*; *R59A*; *T68A*; *R59A,N64D*; *R59A,R67A*; *R59A,T68A* über *XhoI/PstI* in pRSET B eingebracht (Monomer). Anschließend wurden daran über *PstI/NcoI* eine zweite RBD (Dimer) und über *NcoI/EcoRI* eine dritte RBD (Trimer) angefügt. Diese mono-, di- bzw. trimeren Varianten werden zusammenfassend als MOSR bezeichnet (A). Für die Arbeit mit fluoreszenzmarkierten MSOR wurden die vorhandenen Konstrukte über *XhoI/EcoRI* in pEGFP-C2 umklontiert (B).

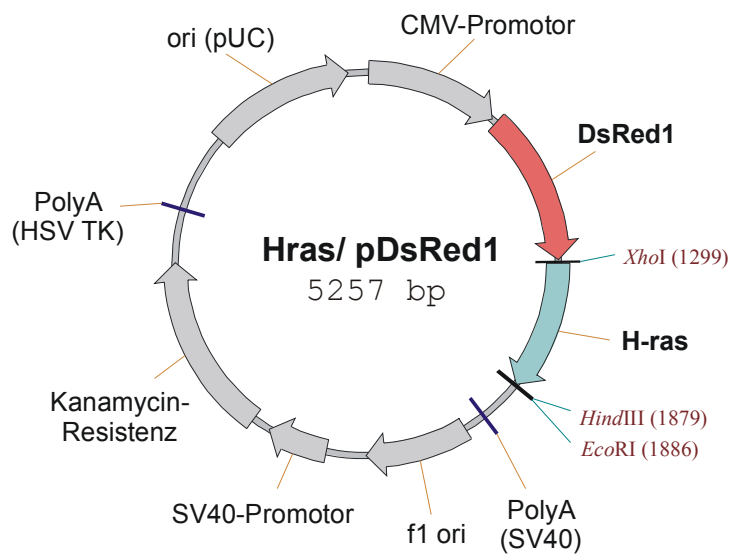


Abb. A2. **Schematische Darstellung von *H-ras* in pDsRed1-C1.** Um die intrazelluläre Verteilung verschiedener Ras/Rap-Konstrukte (siehe Abschnitt Ergebnisse) verfolgen zu können, wurden fluoreszenzmarkierte Varianten konstruiert. Dafür wurden die *ras/rap*-Konstrukte mit Ausnahme von *TC21* über *XhoI/HindIII* in pDsRed1-C1 eingeführt.

Ergebnisse

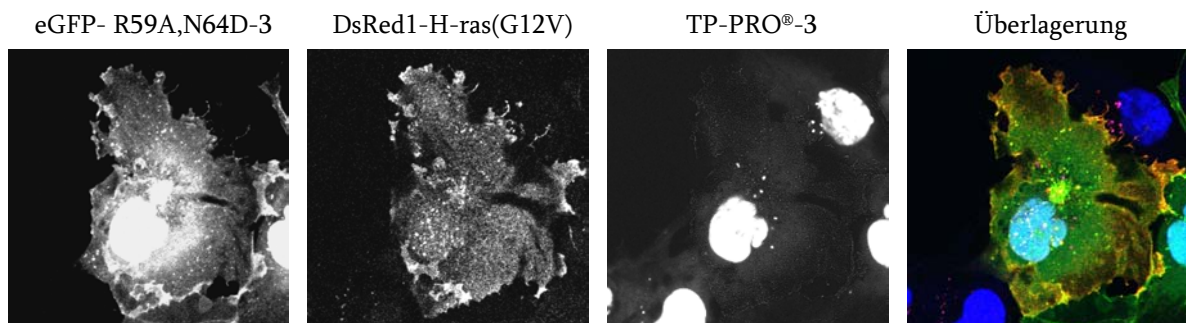


Abb. A3. **Nachweis des Zellkerns.** eGFP-R59A-3, dsRed1-H-Ras(G12V) exprimierende Cos-7 Zellen wurden fixiert, anschließend mit TP-PRO[®]-3, einem DNA-bindenden Farbstoff gefärbt und konfokal analysiert.

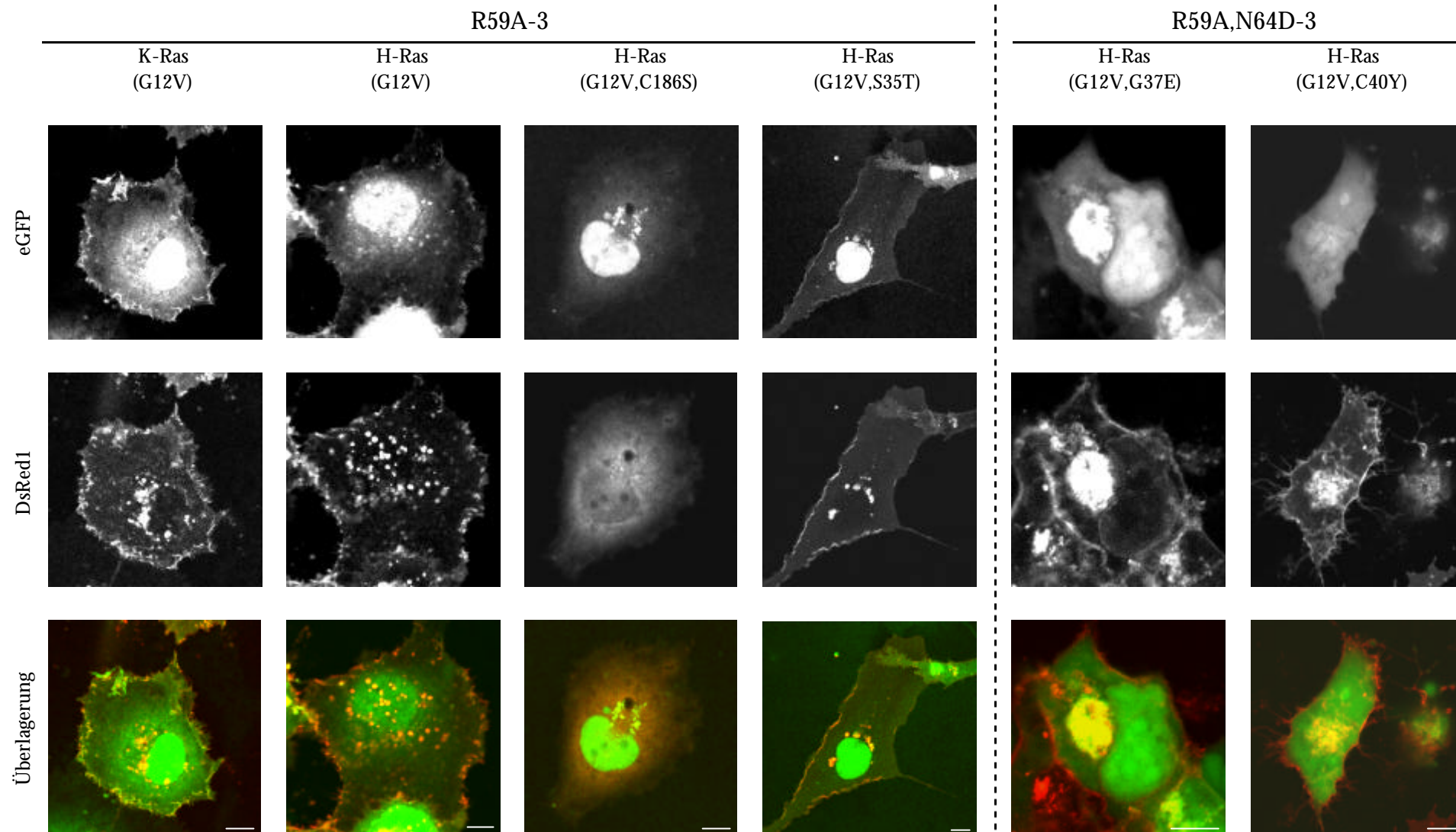


Abb. A4. **Interaktion von eGFP-R59A-3 bzw. eGFP-R59A,N64D-3 mit DsRed1-Ras Konstrukten.** Diese Studien zur Kolokalisation wurden wie in Abschnitt 4.1.3.4. beschrieben durchgeführt. Eine Kolokalisation der eGFP-MSOR und DsRed1-Ras Konstrukte ergibt in der Überlagerung eine orange-gelbe Färbung. Balken 10µm.

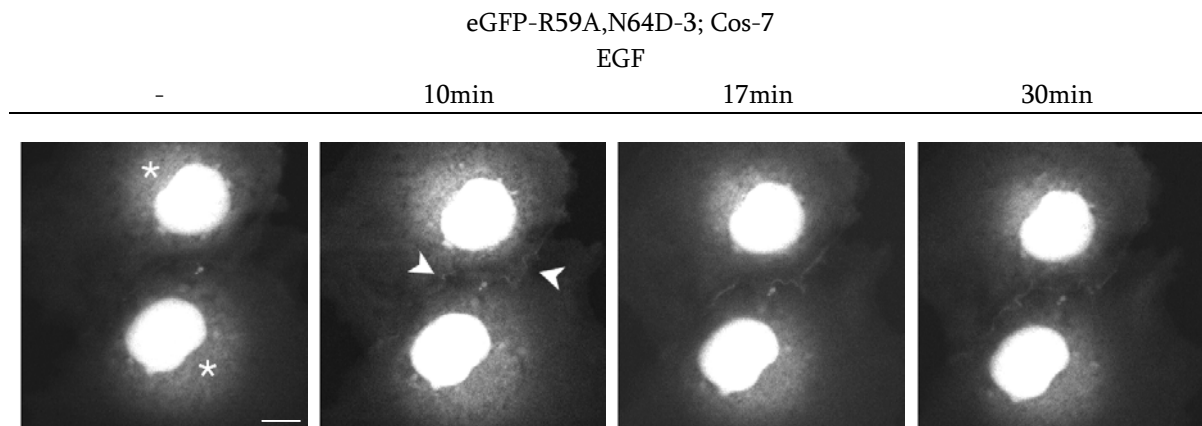


Abb. A5. **Analyse der endogenen Ras-Aktivierung EGF-stimulierter Cos-7 Zellen im Bereich der Endomembranen.** Die Zellen wurden mit dem Konstrukt für eGFP-R59A/N64D-3 transfiziert und 48h später mit 50ng/ml EGF stimuliert und konfokal mikroskopiert. Die Darstellung zeigt repräsentative Einzelbilder des eGFP-Kanals einer aufgenommenen Zeitserie. Die Pfeile zeigen Positionen der Translokation des eGFP-Reporters und die Sterne markieren den Bereich des Golgi-Apparates. Balken 10 μ m.

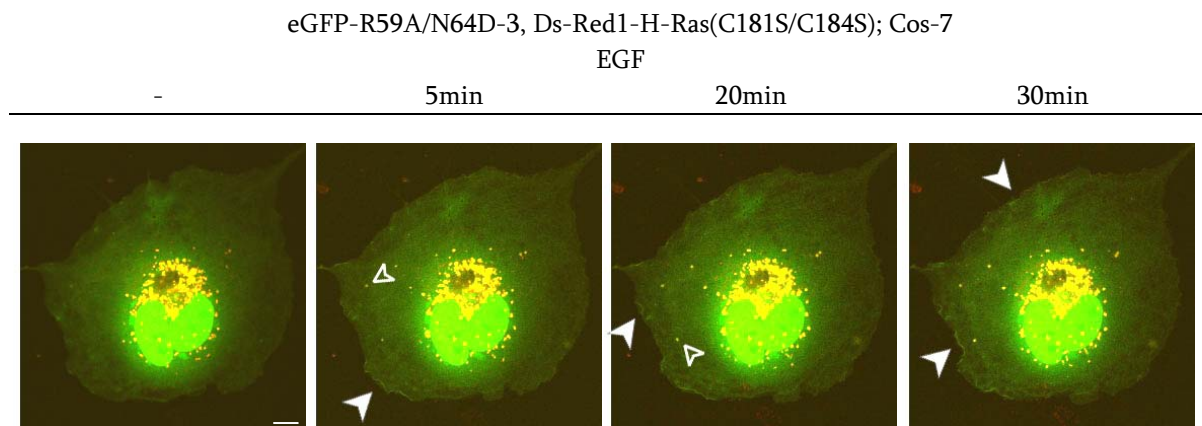


Abb. A6. **Analyse der Ras Aktivierung mit eGFP-R59A/N64D-3 in EGF-stimulierten Cos-7 Zellen.** Die Zellen wurden wie mit den Konstrukten für eGFP-R59A/N64D-3 und Ds-Red1-H-Ras(C181S/C184S) transfiziert und 48h später mit 50ng/ml EGF stimuliert und konfokal mikroskopiert. In den Abbildungen ist die Überlagerung der eGFP und dsRed1 Signale von Einzelbildern einer aufgenommenen Zeitserie vor bzw. nach Stimulation der Zellen dargestellt. Nach Stimulation wird eGFP-R59A/N64D-3 zu Stellen aktivierten, endogenen Ras in Abschnitten der Plasmamembran rekrutiert (Pfeil). Unabhängig vom Stimulus kolokalisieren eGFP-R59A/N64D-3 und ds-Red1-H-Ras(C181S/C184S) im perinukleären Bereich und vesikulären, endosomen-ähnlichen Strukturen (offener Pfeil), wie die gelb/orange Mischfarbe belegt. Balken 10 μ m.

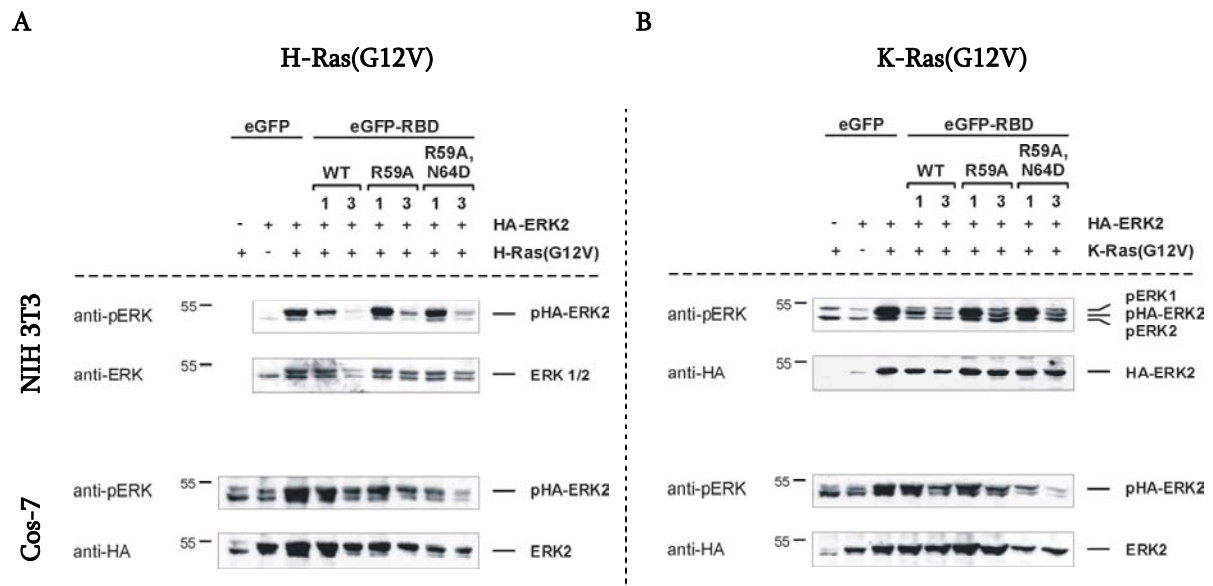


Abb. A7. **MSOR wirken differentiell auf die Ras(G12V)-vermittelte ERK2-Phosphorylierung in NIH 3T3 bzw. Cos-7 Zellen.** Beide Zelllinien wurden mit den Konstrukten für HA-ERK2, mono- und trimeren eGFP-MSOR (WT; R59A; R59A,N64D) und H-Ras(G12V) (A) oder K-Ras(G12V) (B), gleichermaßen transient transfiziert. 48h nach Transfektion inklusive Starvation ü.N. wurden die Zellen lysiert und die pHA-ERK2 und Gesamt-HA-ERK2 Spiegel durch Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Tabellen

Tabelle A1
Einfluss der Ras Isoformen auf die Transformation

Assay	Zelltyp	H-Ras (G12V)	K-Ras 4A (G12V)	K-Ras 4B (G12V)	N-Ras (G12V)	Ref.
- Koloniebildung (Fokusbildung)	NIH 3T3	++++	++++	++	++	1)
		++++	n.d.	++	+	2)
	Rat-1	++++	++++	++	++	1)
	RIE-1	++++	+++	+	+	1)
		++++	n.d.	++	+	2)
- Wachstum in Soft-Agar	NIH 3T3	++++	n.d.	-	-	2)
	RIE-1	-	++++	-	++++	1)
- Migration*	Cos-7	+	-	++++	-	1)

¹⁾ Voice *et al.*, 1999, *GFP-Ras (G12V) Fusionen; ²⁾ Li *et al.*, 2004; n.d., *nicht determiniert*

Tabelle A2
Aktivierung von Ras Effektoren durch die Ras-Isoformen

Aktivierung	Zelltyp	H-Ras (G12V)	K-Ras 4A (G12V)	K-Ras 4B (G12V)	N-Ras (G12V)	Ref.	
- Raf-1	Cos	+	n.d.	++++	n.d.	1)	
	Cos-1	+	++	++++	+	2)	
	293T	++++	n.d.	++++	++++	3)	
	C3H10T1/2	-	n.d.	n.d.	++++	5)	
- A-Raf	293T	++++	n.d.	+++	++++	3)	
- B-Raf	293T	++++	n.d.	+++	++++	3)	
- ERK	NIH 3T3	+	n.d.	++	++++	4)	
	HEK293	+	n.d.	+++	++++	4)	
	293T		n.d.			3)	
- Elk	NIH 3T3	-	n.d.	+++	++++	4)	
- <i>c-fos</i> Promotor	NIH 3T3	+	n.d.	++	++++	4)	
- PI(3)K	Cos	++++	n.d.	+	n.d.	1)	
	NIH 3T3	++++	n.d.	++	++	4)	
	HEK293	++++	n.d.	++	++	4)	
	PI(3)K α	293T	++++	n.d.	++++	++++	3)
	PI(3)K β	293T	-	n.d.	-	-	3)
	PI(3)K γ	293T	++++	n.d.	++++	++++	3)
	PI(3)K δ	293T	+	n.d.	+	+	3)
	- Akt	NIH 3T3	++++	n.d.	+	+	4)
- RalGDS	293T	++++	n.d.	++++	++++	3)	
	RGL	293T	++++	n.d.	+++	++++	3)
	RGL2	293T	++++	n.d.	+++	++++	3)
- AF-6	293T	n.d.	n.d.	++++	++++	3)	
		n.d.	n.d.				
- RIN1	293T	n.d.	n.d.	++++	++++	3)	
	293T	n.d.	n.d.	++++	++++	3)	
	293T	n.d.	n.d.	++++	++++	3)	
- RASSF4	293T	n.d.	n.d.	++++	++++		
- Nore1	293T	n.d.	n.d.	++++	++++		
- Phospholipase C ϵ	293T	n.d.	n.d.	++++	++++	3)	

1) Yan *et al.*, 1998; 2) Voice *et al.*, 1999; 3) Rodriguez-Viciana *et al.*, 2004; 4) Li *et al.*, 2004;

5) Hamilton und Wolfman, 1998; n.d., *nicht determiniert*

Filme (nur auf der CD)

Film M1 und M2. **Visualisierung der Ras-Aktivierung *in vivo* bei heterologer Expression von DsRed1-H-Ras.** Cos-7 Zellen wurden mit den Vektoren für eGFP-R59A,N64D-3 und DsRed1-H-Ras transient transfiziert. 48h später wurden die ü.N. starvierten Zellen konfokal mikroskopiert und im Verlauf mit 50ng/ml EGF stimuliert. Für die Aufnahmen wurde ein Modus gewählt, bei dem alle 30sec automatisch ein Einzelbild des selben Bildausschnittes aufgenommen wurde.

Film M1. Darstellung des GFP- und DsRed1-Fluoreszenzkanals in der Überlagerung. Die Rekrutierung des Reporters eGFP-R59A,N64D-3 nach Stimulation (EGF erscheint) an die Plasmamembran führt zu einer Änderung der Farbgebung der Plasmamembran von rot nach orange/gelb und zeigt die Ras-Aktivierung an. Der Reporter ist jedoch Stimulus-unabhängig mit dem Bereich des Golgi-Apparates assoziiert (gelbe Färbung).

Film M2. Darstellung wie in M1, nur ist hier der GFP-Fluoreszenzkanal allein gezeigt. Hier wird die EGF-vermittelte (EGF erscheint) Rekrutierung von eGFP-R59A,N64D-3 aus dem Zytoplasma an die Plasmamembran deutlich, wobei der Reporter nahezu die gesamte Plasmamembran illuminiert.

Film M3. **Visualisierung der endogenen Ras-Aktivierung.** Das Konstrukt für eGFP-R59A,N64D-3 wurde transient in Cos-7 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden ü.N. starviert und anschließend konfokal mikroskopiert. Im Verlauf der Beobachtung wurden sie dann mit 50ng/ml EGF stimuliert. Für die konfokalen Bilder wurde ein Modus gewählt, bei dem alle 30sec automatisch ein Einzelbild des selben Bildausschnittes aufgenommen wurde. Nach EGF-Stimulation der Zellen (EGF erscheint) wird die Rekrutierung des Reporters eGFP-R59A,N64D-3 an die Plasmamembran evident, was die Aktivierung von endogenem Ras an diesen Stellen anzeigt. Auffällig dabei ist die Dynamik im Aktivierungsmuster, und dass die Aktivierung nur an distinkten Bereichen der Plasmamembran erfolgt.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Schriftenverzeichnis aufgeführten Quellen verwendet und sämtliche eingesetzten Hilfsmittel und persönlichen Mitteilungen angegeben. Ebenso sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachte Unterstützung als solche gekennzeichnet. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt. Darüber hinaus habe ich weder die vorliegende Dissertation noch Teile dieser Arbeit für eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Solna, den 07.07.2005

Martin Augsten

Danksagung

Dieser Abschnitt ist all denjenigen gewidmet, die mir bei der Zusammentragung der Ergebnisse und Anfertigung dieser Arbeit so vielfältig und hilfreich zur Seite gestanden haben und an ein Gelingen dieser Arbeit geglaubt haben.

HERZLICHEN DANK...

...meinen Eltern für ihre Geduld, vielfältige Hilfe und Unterstützung

...meiner Schwester und ihrer Familie für die vielen schönen Stunden, die mir Kraft und auch jede Menge nötiger Ablenkung vom „Alltag“ gegeben haben

...an Ignacio und Karlheinz für vier spannende Jahre im Labor, ihre fachliche und persönliche Unterstützung; für die Möglichkeit zur freien Entfaltung und ganz besonders dafür, dass sie sich jederzeit Zeit für mich genommen haben und Ansprechpartner waren

...allen Mitarbeitern in „Drackendorf“ und in der „Stadt“, insbesondere *Dr.* Rico Pusch, Birgit Schade und Ute Wittig, für ihre Begleitung und wertvolle Hilfe im Labor

...an Prof. Dr. Alfred Blume, Bettina Fölting und Katja Beyer vom Institut für Physikalische Chemie (Martin-Luther-Universität in Halle/Saale) für die Möglichkeit Einblicke in eine „Neue Welt“ gewinnen zu können und ihre exzellente fachliche und technische Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt Katja für die sehr gute Zusammenarbeit und sorgfältige Unterstützung bei der ITC

...an Dr. Christoph Biskup vom Institut für Physiologie (FSU, Jena), PD Dr. Peter Hemmerich vom Institut für molekulare Biotechnologie (IMB, Jena) sowie Prof. Dr. Stefan H. Heinemann von der AG Molekulare und zelluläre Biophysik (FSU, Jena) für den vertrauensvollen Zugang und die Unterstützung am LSM

...an Dr. Uwe Horn und seine Mitarbeiter vom Hans-Knöll-Institut (HKI, Jena) für die umfangreiche Unterstützung bei der Herstellung größerer Proteinmengen

...an Prof. Dr. Reinhard Wetzker und Prof. Dr. Hartmut Beug für ihre Bereitschaft als Gutachter dieser Arbeit zu wirken

...an Prof. Dr. Bernd Wiederanders für sein Vertrauen und die Möglichkeit, die Arbeiten an seinem Institut durchzuführen

...an Gretchen Murphy, PD Dr. Peter Hemmerich und Prof. Dr. Alfred Wittinghofer für die Bereitstellung von Plasmiden

...an PD Dr. Arne Östman für sein Verständnis während der Anfertigung dieses Manuskriptes und seine Unterstützung

Ganz besonders innig möchte ich meiner lieben Freundin Sandra danken, die mich durch alle schönen, schwierigen und frustrierenden Situationen während dieser Zeit begleitet hat und mich dabei immer unterstützt und wiederaufgebaut hat. Nicht zuletzt danke ich Ihr sehr für Ihre Geduld mit mir und dieser Arbeit, die endlosen nächtlichen Diskussionen und vor allem dafür, dass sie mir auch immer wieder zeigt, wie schön das Leben außerhalb des Labors ist.

Vielen Dank für Alles, liebe Gabi - es erfüllt uns alle mit Traurigkeit, dass Du in diesen Tagen nicht mehr bei uns sein kannst.

curriculum vitae

Martin Augsten

Olof af Acrels väg 8, 5tr; SE 17164 Solna; Schweden • e-mail: Martin.Augsten@cck.ki.se

- Geburtsdatum: 19.10.1975
Geburtsort: Eisenach
- 1981- 1994: Schulbildung
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife am Staatlichen Gymnasium „Ernst Haeckel“ in Jena
Leistungskurse: Mathematik und Biologie
Gesamtnote: 1,6
- 1995- 2000 Studium im Fach Biochemie/ Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena;
Prüfungsfächer: Biochemie, Molekularbiologie, Zellbiologie, Mikrobiologie
- 1999- 2000 Diplomarbeit in der Abteilung Mikrobielle Infektionsbiologie am Hans-Knöll-Institut Jena unter Betreuung von Dr. Raimund Eck
Thema:
Untersuchungen zum intrazellulären Proteintransport in *Candida albicans*-
Disruption des Phosphatidylinositol(3)5-Kinase-Gens *CaFAB1* und
Charakterisierung der Mutanten
- 2000 Beendigung des Diplomverfahrens mit Einreichen der Diplomarbeit
Gesamtnote: 1,3
- ab 2001 Anfertigung der Dissertation am Institut für Biochemie I des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena als wissenschaftlicher Mitarbeiter (Bat IIa/20) unter Betreuung von PD Dr. Karlheinz Friedrich und Prof. Dr. Reinhard Wetzker
Thema:
Entwicklung von multivalenten Sonden zur gezielten Analyse und Beeinflussung Ras-abhängiger Signalwege
- ab 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Department of Oncology-Pathology (Gruppenleiter: Arne Östman) des Cancer Center Karolinska (CCK), Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Publikationsverzeichnis

Publikationen

Augsten, M.; Hubner, C.; Nguyen, M.; Kunkel, W.; Hartl, A.; Eck, R.: Defective Hyphal induction of a *Candida albicans* phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase null mutant on solid media does not lead to decreased virulence. *Infect Immun.* **70**: 4462-4470 (2002)

Augsten, M.; Pusch, R.; Rennert, K.; Wittig, U.; Beyer, K.; Blume, A.; Wetzker, R.; Friedrich, K.H.; Rubio, I. Live-cell monitoring of endogenous Ras-GTP illustrates predominant Ras activation at the plasma membrane. *EMBO Rep.*, resubmitted (2005)

Konferenzpräsentationen

Augsten, M.; Rubio, I.; Friedrich, K.H.: Multivalent scavengers of oncogenic Ras (MSOR): A novel approach to tracking and therapeutic inhibition of Ras activity;
Fall Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM) in Halle/ Saale (2002)

Augsten, M.; Rubio, I.; Friedrich, K.H.: Blocking and tracking Ras activity by oligomeric binders: multivalent scavengers of oncogenic Ras (MSORs).
6th Meeting of the Signal Transduction Society (STS) in Weimar (2002)

Augsten, M.; Rubio, I.; Friedrich, K.H.: Real-time visualization of active Ras in living cells employing oligomeric binders.
7th Meeting of the Signal Transduction Society (STS) in Weimar (2003)

Augsten, M.; Pusch, R.; Wetzker, R.; Friedrich, K.H.; *Rubio, I.* Selected oral communication: Activation of endogenous Ras is predominant at the plasma membrane.
Biochemical Society Meeting in Cirencester, UK (2005)

Konferenzteilnahmen

- 2001 5th Meeting of the Signal Transduction Society (STS) in Weimar
- 2002 Fall Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM) in Halle/ Saale
- 2002 6th Meeting of the Signal Transduction Society (STS) in Weimar
- 2003 Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM) and European Life Scientist Organization (ELSO) in Dresden
- 2003 7th Meeting of the Signal Transduction Society (STS) in Weimar

Gutachter

PD Dr. Karlheinz Friedrich
Institut für Biochemie I
Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Nonnenplan 2
07743 Jena

Prof. Dr. Reinhard Wetzker
AG Molekulare Zellbiologie
Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Drackendorfer Str. 1
07747 Jena

Prof. Dr. Hartmut Beug
IMP (Research Institute of Molecular Pathology)
Dr. Bohr-Gasse 7
1030 Wien
Österreich