

„Zelluläre Modelle für die direkte Analyse der Aktivität tumorrelevanter Signalwege“

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Patricia Reischmann
geb. am 10.07.1983 in Filderstadt

Mainz, 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2017

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2010 bis Dezember 2013 im Fachbereich IMST der Hochschule Kaiserslautern, Campus Zweibrücken angefertigt.

Teile der Arbeit wurden bereits in „Measured Effects of Wnt3a on Proliferation of HEK293T Cells depend on the Applied Assay” (Reischmann P, Fiebeck J, von der Weiden N, Müller O. International Journal of Cell Biology 2015; 2015:928502. doi: 10.1155/2015/928502. Epub 2015 Dec 22) veröffentlicht.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	X
1. EINLEITUNG	1
1.1 SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE IN DER ZELLE	1
1.1.1 Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg.....	1
1.1.1.2 Die Raf-Proteinfamilie	3
1.1.2 Der Wnt-Signalweg	6
1.1.2.1 Der kanonische Wnt-Signalweg	7
1.1.3 Verbindungen zwischen Wnt- und Ras/Raf-Signalweg	9
1.2. DEREGULIERTE SIGNALWEGE	10
1.2.1 Der deregulierte Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg	11
1.2.2 Der deregulierte Wnt-Signalweg.....	12
1.2.3 Die kolorektale Kanzerogenese	13
1.2.4 Tumorthherapie durch Beeinflussung des Ras/Raf- oder Wnt-Signalwegs	16
1.3 ZELLBASIERTE ASSAYS ZUR DETEKTION VON WIRKSTOFFEN	18
1.3.1 Fluoreszenzbasierte Zellassays.....	19
1.3.1.1 Fluoreszenzproteine.....	20
1.4 ZIELE DER ARBEIT	23
2. MATERIAL	24
2.1. GERÄTE	24
2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	25
2.3 CHEMIKALIEN	26
2.4 KIT-SYSTEME	27
2.5 NÄHRMEDIEN, ANTIBIOTIKA UND ZUSÄTZE FÜR BAKTERIEN- UND ZELLKULTUREN.....	27
2.6 PUFFER UND STAMMLÖSUNGEN.....	28
2.7 VERWENDETE ANALYSESOFTWARE	29

2.8 BIOLOGISCHE MATERIALIEN	29
2.8.1 Restriktionsenzyme	29
2.8.2 Polymerasen	29
2.8.3 Primer	30
2.8.4 Antikörper	31
2.8.5 Vektorkonstrukte	32
2.8.6 Bakterienstämme	32
2.8.7 Zelllinien	32
3. METHODEN	33
3.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	33
3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	33
3.1.1.1 Subkultivierung von Zellen	33
3.1.1.2 Bestimmung der Zellzahl und -vitalität	33
3.1.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	34
3.1.2 Transfektion von Zellen	34
3.1.2.1 Stabile Transfektion	35
3.1.3 Aufnahme einer Wachstumskurve	35
3.1.4 Optimierung von Selektionsbedingungen	36
3.1.5 Behandlung der Zellen mit EGF bzw. Sorafenib	36
3.1.6 MTT-Assay	36
3.1.7 BrdU-Assay	37
3.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	37
3.2.1 Herstellung von Proteinextrakten	37
3.2.1.1 Gesamtzellextrakte für Western-Blot-Analyse	38
3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	38
3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
3.2.4 Western-Blot-Analyse	39
3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	40
3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA	40
3.3.2 Isolierung von genomischer DNA	41
3.3.3 Isolierung von RNA	41
3.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
3.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
3.3.5.1 Overlap-Extension-PCR	43
3.3.5.2 Kolonie-PCR	45
3.3.6 cDNA-Synthese	45
3.3.7 DNA-Gelelektrophorese	46
3.3.8 Reinigung von PCR-Fragmenten	46
3.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten (Gelelution)	46
3.3.10 DNA-Sequenzierung	47
3.3.11 Klonierung	47
3.3.11.1 Transformation von Bakterien	47
3.3.11.2 Herstellung von Glycerinkulturen	48
3.3.11.3 Restriktionsverdau von DNA	48

3.3.11.4 Dephosphorylierung	48
3.3.11.5 Auffüllreaktion	49
3.3.11.6 Ligation	49
3.3.11.7 Klonierungen mit dem QIAGEN PCR Cloning Kit	49
3.4 IMMUNZYTOCHEMIE UND FLUORESZENZMIKROSKOPIE	50
3.4.1 Immunfluoreszenzfärbung eukaryotischer Zellen	50
3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie	50
3.4.2.1 Arbeiten mit dem Mikroskopiesystem Zeiss Observer Z1	50
3.4.2.2 Konfokales Mikroskopieren	51
4. ERGEBNISSE	52
4.1 KONSTRUKTION DER VEKTOREN	52
4.1.1 pDisplay-EGFP-cRaf	52
4.1.2 pcRaf-mCherry-N1	54
4.2 HERSTELLUNG VON RAF-DETEKTIERBAREN ZELLEN	57
4.2.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz durch transiente Transfektion	57
4.2.2 Ermittlung der zytotoxischen G418-Konzentration für MDCK und MDCK-F3 Zellen	59
4.2.3 Etablierung stabiler Klone	60
4.2.4 Charakterisierung der Raf-detektierbaren Zellklone	63
4.2.4.1 Vergleich der Zellmorphologie	63
4.2.4.2 Vergleich des Proliferationsverhaltens	66
4.2.4.4 Ermittlung der zytotoxischen Sorafenib-Konzentration für MDCK-F3 Zellen	68
4.2.4.5 Aktivierung und Inhibierung des Ras/Raf-Signalweges	69
4.3 MIKROSKOPIE-TESTSYSTEM FÜR DIE DETEKTION DES RAS/RAF-SIGNALWEGES IN STABIL TRANSFIZIERTEN ZELLEN	70
4.4 SIMULTANE VISUALISIERUNG DES RAS/RAF- UND DES WNT-SIGNALWEGES	72
4.5 ANALYSE WNT-INDUZIERTER HEK293T ZELLEN	73
4.5.1 Auswirkungen von Wnt3a auf die Induktion von β -Catenin und typischen Wnt Zielgenen	74
4.5.2 Proliferationsstudien	76
4.5.3 Mitochondriale Aktivität	79
5. DISKUSSION	81
5.1 DAS MODELLSYSTEM	81
5.2 ENTWICKLUNG NEUER REPORTERZELLEN FÜR DIE ANZEIGE VON RAF/RAS-SIGNALWEGVERÄNDERUNGEN	82
5.2.1 Konstruktion der Vektoren	83
5.2.2 Etablierung stabiler Reporterzelllinien	84
5.2.3 Charakterisierung stabiler Reporterzelllinien	85

5.3 FLUORESCENZBASIERTER REPORTERZELLASSAY ZUR DETEKTION DER RAF/RAS-PROTEININTERAKTION	86
5.4 SIMULTANE VISUALISIERUNG DES RAS/RAF- UND DES WNT-SIGNALWEGES.....	90
5.5 EFFEKTE VON WNT-PROTEINEN AUF DIE PROLIFERATION VON HEK293T ZELLEN.....	91
5.6 AUSBLICK.....	94
5.6.1 Reporterzellassay für die Anzeige von Raf/Ras-Signalwegveränderungen	94
5.6.2 Proliferationsstudien Wnt-induzierter HEK293T-Zellen	96
5.7 ZUSAMMENFASSUNG	97
6. LITERATUR	98
7. ANHANG	119
7.1 VEKTORKARTEN	119
7.1.1 Technische Daten des Vektors pDisplay	119
7.1.2 Technische Daten des Vektors pmCherry-N1	121
7.1.3 Technische Daten des Vektors pdrive	122
7.2 DNA-SEQUENZAUSSCHNITT DES VEKTORS PDISPLAY-EGFP-CRAF-NEU2	123
7.3 DNA-SEQUENZAUSSCHNITT DES VEKTORS PCRAF-SHIFT-MCHERRY-N1	125
7.4 WACHSTUMSKURVEN VON HEK293T UND HT29 ZELLEN.....	128
7.5 DANKSAGUNG.....	130
7.6 LEBENSLAUF	131
7.7 LISTE DER PUBLIKATIONEN.....	132
7.8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG DES AUTORS	134

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs	2
Abb. 2: Der c-Raf Aktivierungszyklus	5
Abb. 3: Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs	8
Abb. 4: Modell der mehrstufigen kolorektalen Kanzerogenese	15
Abb. 5: Struktur der Fluorophore GFP und mCherry	22
Abb. 6: Schematischer Ablauf der Overlap-Extension-PCR	44
Abb. 7: Restriktionsverdau von pDisplay-EGFP-cRaf Klonen und amplifizierte DNA von c-raf	53
Abb. 8: Vektorkarte und Sequenzausschnitt des Transfektionsvektors pDisplay-EGFP-cRaf-neu2	54
Abb. 9: Kontrolle der nach OE-PCR erhaltenen DNA-Fragmente	55
Abb. 10: Restriktionsverdau von pcRaf-mCherry-N1 Klonen	56
Abb. 11: Vektorkarte und Sequenzausschnitt des Transfektionsvektors pcRaf-shift-mCherry-N1	57
Abb. 12: Austestung der für die Selektion erforderlichen G418-Konzentration für MDCK bzw. MDCK-F3 Zellen	60
Abb. 13: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten	61
Abb. 14: Western Blot Ergebnisse zum Nachweis von mCherry (A) und EGFP (B) aus transfizierten MDCK bzw. MDCK-F3 Zellen	62
Abb. 15: Phänotyp von MDCK und MDCK-F3 Zellklonen	64/65
Abb. 16: Wachstumskurven der MDCK (A) und MDCK-F3 Klone (B)	67
Abb. 17: Zellviabilitätsanalyse von MDCK-F3 Zellen mittels MTT Assay	69
Abb. 18: Detektion des Aktivitätslevels von c-Raf	70
Abb. 19: Live-Cell-Imaging von stabil transfizierten MDCK Zellen mit cRaf-mCherry (A-C) oder EGFP-cRaf (D-F)	71
Abb. 20: Konfokale Mikroskopie der stabil transfizierten MDCK (A, C) und MDCK-F3 Zellen (B, D) mit cRaf-mCherry	72
Abb. 21: Kotransfektionsexperimente in MDCK-F3 Zellen	73
Abb. 22: Expression von β -Catenin in HEK293T-Zellen nach Wnt-3a-Behandlung	74
Abb. 23: PCR-Ergebnisse der Expression von CCND1 und C-MYC in HEK293T-Zellen nach Wnt-3a-Behandlung	75
Abb. 24: Western-Blot-Ergebnisse der Expression von CyclinD1 und c-Myc in HEK293T-Zellen nach Wnt-3a-Behandlung	76
Abb. 25: Ergebnisse der Proliferationsassays	78/79
Abb. 26: Mitochondriale Aktivität von Wnt3a behandelten HEK293T-Zellen	80
Abb. 27: Schematisierte Zellmodelle zur Analyse von Substanzwirkungen auf die Ras/Raf-Interaktion anhand ihrer Lokalisation	88

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete PCR-Primer	30
Tab. 2: Verwendete Primer für Sequenzierung und Klonierung	30
Tab. 3: Verwendete Primer für Overlap-Extension-PCR	31
Tab. 4: Verwendete Erstantikörper	31
Tab. 5: Verwendete gekoppelte Zweitantikörper	31
Tab. 6: Verwendete Vektoren	31
Tab. 7: Verwendete <i>E. coli</i> Bakterienstämme	32
Tab. 8: Verwendete Zelllinien	32
Tab. 9: Beispiel eines PCR-Ansatzes	43
Tab. 10: Aufschlüsselung der einzelnen verwendeten PCR-Programme in ihre Teilschritte	43
Tab. 11: Präparativer Ansatz für eine Overlap-Extension-PCR	44
Tab. 12: PCR-Programm für Overlap-Extension-PCR	45
Tab. 13 : Ermittlung der prozentualen Transfektionseffizienz von MDCK Zellen	59

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ADH	Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Gen, dass Proteinkinase B codiert
Amp	Ampicillin
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
BamHI	Nuklease I aus dem Stamm H von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BCL	B-cell lymphoma
β-TrCP	β-Transducin repeat Containing Protein
Bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBP	CREB-binding protein
CCND1	Gen, das Cyclin D1 codiert
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CDS	coding sequence
CIP	calf-intestine phosphatase
CKI	Casein Kinase I
c-KIT	Stem Cell Factor-Rezeptor, CD117
CMV	Cytomegalovirus
c-Myc	zelluläres Homolog des Myelocytomatose-Virus-Onkogens v-myc
COX	Cyclooxygenase
CR	hochkonservierte Region (conserved region)
CRD	Cystein-reiche Domäne
CtBP	C-terminal Binding Protein
C-terminal	Carboxyterminal
CTNNB1	Gen, dass β-catenin codiert
CTP	Cytidintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DCC	Tumorsuppressorgen "deleted in colon cancer"
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
DsRed	Fluoreszenzprotein Discosoma Red
DUSP	dual-spezifische Phosphatase
Dvl	Dishevelled
ECL	Enzymatic Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcoRI	Nuklease I aus dem Stamm R von <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescence protein
EGFR	epidermal growth factor receptor
Elk	ETS domain-containing protein
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alia (und Co-Autoren)
FAP	Familiäre Adenomatöse Polypose
FCS	Fetal Calf Serum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
Fz	Frizzled
G418	Geneticin
GAP	GTPase activating protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
G-Protein	GTP-bindendes Protein
Grb2	growth factor receptor bound protein 2
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
HCS	High Content Screening
HEK	human embryonal kidney

Abkürzungsverzeichnis

HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
HTS	High Throughput Screening
IgG	Immunglobulin G
IWP	Inhibitor of Wnt production
IWR	Inhibitor of Wnt response
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	KiloDalton
Kon	Kontrolle
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LB	lysogeny broth
LEF	Lymphoid enhancer factor
MAP	mitogen activated protein
MAPK	mitogen activated protein kinase
MAPKK (MEK)	mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kinase
MAPKKK (MEKK)	mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kinase-Kinase
MCR	mutation cluster region
MCS	multiple cloning site
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
min.	mindestens
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid
NEAA	non-essential amino acids
Neo	Neomycin
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
NGS	Normal Goat Serum
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
NSCLC	non small cell lung cancer
N-terminal	Aminoterminal
OE-PCR	Overlap-Extension-Polymerase Chain Reaction
P53	Tumorprotein p53
PBS	Phosphate Buffered Saline

Abkürzungsverzeichnis

PCP	Planar Cell Polarity
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPAR δ	peroxisome proliferator-activated receptor δ
PspOMI	Nuklease I aus dem Stamm OM2164 von <i>Pseudomonas species</i>
PstI	Nuklease I aus dem Stamm 164 von <i>Providencia stuartii</i>
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RBD	Ras-Bindedomäne
RKIP	Raf-1 kinase inhibitory protein
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	rounds per minute
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
RT	reverse Transkripton oder Raumtemperatur
SAPK	stress-activated protein kinase
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDHA	Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repression
SOS	Son of sevenless
SPRY	Sprouty
Src	Tyrosinkinase <i>sarcoma</i>
SV40	Simian-Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Triessigsäure
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCF	T-Cell Factor
TLE	Transducin-like enhancer protein
TOP	TCF optimal binding site
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u. a.	unter anderem

Abkürzungsverzeichnis

VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
v-Raf	virales Raf
wg	wingless
XhoI	Nuklease I von <i>Xanthomonas holcicola</i>
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Signaltransduktionswege in der Zelle

Damit komplizierte Stoffwechselvorgänge koordiniert ablaufen können, benötigt das Zellsystem des Menschen ein gut organisiertes Kommunikationssystem. Auf Zellen wirken eine Vielzahl unterschiedlicher externer Signale ein, welche die metabolischen Prozesse der Zelle, wie z. B. Wachstum, Differenzierung und Überleben beeinflussen. Zellen können extrazelluläre Signale durch Rezeptoren wahrnehmen, welche die Signale ins Zellinnere weiterleiten. Dabei lassen sich die Rezeptoren anhand ihrer Lokalisation in Transmembranrezeptoren (z. B. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren) und zytosolische Rezeptoren (z. B. Steroidhormonrezeptoren) einteilen. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer Signaltransduktionskaskade, indem ein Molekül das nächste aktiviert. Letztlich sind meistens Transkriptionsfaktoren für eine veränderte Expression spezifischer Gene verantwortlich. Eine solche Signalkaskade kann durch physiologische Reize wie Ionen, Hormone und Wachstumsfaktoren als Liganden der interzellulären Kommunikation nach Bindung an spezifischen Rezeptorproteinen (z. B. Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, Tyrosin-Kinase- oder G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren) ausgelöst werden, aber auch nicht-physiologische Reize, wie Strahlung oder oxidativen Stress können als Signale dienen. Abhängig von den extrazellulären Stimuli werden in der Zelle verschiedene Signalwege aktiviert. Im Fokus dieser Arbeit stehen zwei wichtige Signalwege der Zelle, der Ras/Raf-Signalweg und der Wnt-Signalweg.

1.1.1 Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg

Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg gehört zum mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Signalweg, welcher einer der bedeutendsten Signalwege in der Zelle ist und wichtige Prozesse wie Proliferation und Überleben reguliert. Er wird hauptsächlich durch Mitogene und Wachstumsfaktoren aktiviert. Der Signalweg ist durch eine Drei-Kinasen-Kaskade organisiert, ausgehend von einem Transmembranrezeptor folgen die Aktivierung von Signalproteinen und drei Folgekinasen, den mitogen-aktivierten-Proteinkinase-Kinase-Kinase (MAPKKK oder MEKK), mitogen-aktivierten-Proteinkinase-Kinase (MAPKK oder MEK) und MAPK (Chen et al., 2001; Dhillon et al., 2007). MAPKs selbst phosphorylieren spezifische Zielsubstrate, z. B. Proteine des Zytoskeletts, Phospholipasen oder Transkriptionsfaktoren, welche durch die Veränderung der Genexpression direkten Einfluss

auf viele zelluläre Prozesse, wie Wachstum, Differenzierung, Inflammation und Apoptose, nehmen. Alle Glieder der Signalkette werden durch duale Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten (MAPKKK, MAPKK) bzw. an Threonin- und Tyrosinresten (MAPK) im Threonin-X-Tyrosin-Motiv des so genannten Aktivierungsloops aktiviert (Marshall, 1994). Durch die kaskadenartige Signalweiterleitung über die verschiedenen Proteine wird eine schnelle Reaktion auf äußere und innere Stimuli sowie deren effiziente Regulation ermöglicht (Yang et al., 2003). Die MAPK können von Phosphatasen durch Dephosphorylierung deaktiviert werden (Neel and Tonks, 1997). Durch diesen Mechanismus wird die Phosphorylierung der MAPK reversibel und ermöglicht so die Regulation von Signaltransduktionsprozessen innerhalb kurzer Zeit. Die ERK-Aktivierung führt außerdem zu einer erhöhten Expression von DUSPs und SPRYs, die wiederum die Signalwegaktivität in normalen Zellen nach unten regulieren (Mason et al., 2006; Tsavachidou et al., 2004). Die Signaltransduktion verläuft wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist.

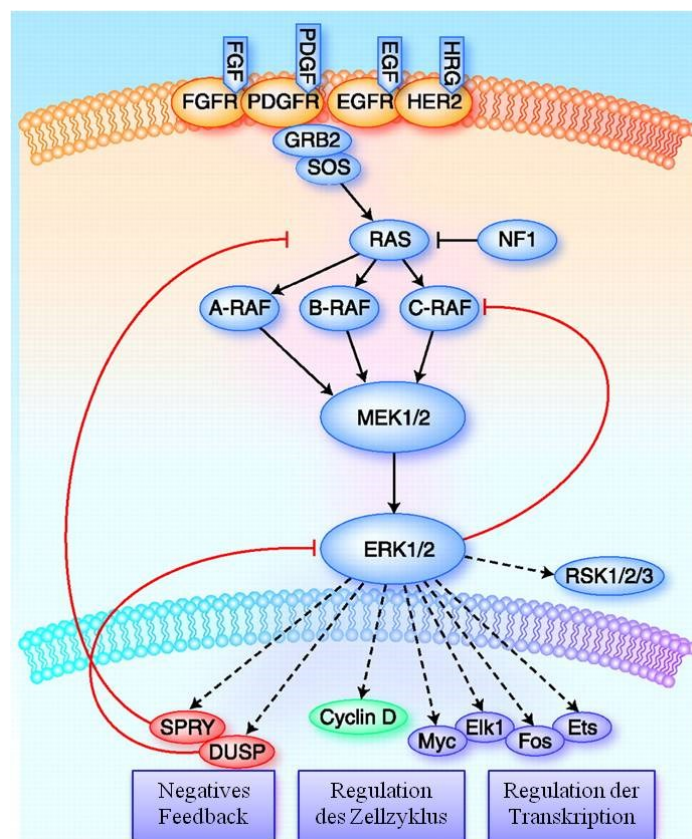


Abb. 1: **Schematische Darstellung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs**, modifiziert nach (Pratilas and Solit, 2010). Der klassische MAPK-Signalweg wird durch die Bindung von Liganden an Rezeptortyrosinkinasen aktiviert und die Signale durch eine 3-Kinasen-Kaskade weitergeleitet. Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK reguliert die Transkription von Zielgenen, die u. a. für die Zellzyklusprogression und das Überleben der Zelle wichtig sind. Details und Abkürzungen siehe Text.

Extrazelluläre Signalmoleküle binden an membranständige Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), welche N-terminal eine extrazelluläre Liganden-Bindedomäne und C-terminal eine intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne besitzen (Pawson, 2002; Schlessinger, 2000). Die Bindung eines Liganden induziert eine Dimerisierung der RTKs, dadurch werden die Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil der Rezeptoren autophosphoryliert (Heldin, 1995). Daraufhin bindet das Adapterprotein Growth-factor-receptor-protein 2 (Grb2) an die Phospho-Tyrosinreste (Lowenstein et al., 1992) und rekrutiert den Guanine-nucleotide-exchange-factor Son of Sevenless (SOS) an die Zellmembran. SOS verhilft dem G-Protein Ras, welches je nach Aktivitätsstatus in unterschiedlichen Konformationen vorliegt, zur Aktivierung über den Austausch von GDP durch GTP (Chardin et al., 1993). Dies passiert durch die Interaktion der speziellen helikalen Haarnadelstruktur von SOS mit der Ras-Region switch2. Außerdem schiebt SOS die Ras-Region switch1 zur Seite, um somit die Nukleotid-Bindestelle komplett freizulegen (Geyer and Wittinghofer, 1997). Erst dann kann GTP an Ras binden. Durch die Konformationsänderung kann dieses die Serin-/Threoninkinase Raf binden und an die Zellmembran rekrutieren (Avruch et al., 1994). Es kommt zur Aktivierung von Raf durch Phosphorylierung. Raf wiederum aktiviert und phosphoryliert die Serin-/Threoninkinasen MEK1 und MEK2. Aktiviertes MEK phosphoryliert dann ERK1 und ERK2. ERK1/2 haben sowohl zytosolische (z. B. Kinasen und Proteine des Zytoskeletts) als auch nukleäre Substrate (Marshall, 1999). Sie sind somit in der Lage in den Zellkern zu translozieren und dort verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie Elk oder c-Myc, zu aktivieren, die dann an die DNA binden und Zielgene anschalten. Außerdem löst aktiviertes ERK zwei Haupt-Feedbackschleifen aus, um den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg zu regulieren: Die positive Rückkopplungsschleife resultiert aus der Inaktivierung des inhibitorischen Proteins RKIP und die negative Feedbackschleife entsteht durch die Inaktivierung des Austauschfaktorkomplexes Grb2-SOS (Shin et al., 2009).

1.1.1.2 Die Raf-Proteinfamilie

Das erste Raf-Gen wurde im Jahr 1983 als retrovirales Onkogen, V-RAF, beschrieben, welches von dem akut transformierenden replikations-defizienten Maustyps C-Virus (MSV 3611) stammt (Rapp et al., 1983). Dem zellulären Homolog in der Maus und im Menschen wurde daher der Name C-RAF-1 verliehen. Das Produkt von C-RAF-1 wurde als c-Raf oder Raf-1 bezeichnet. In den folgenden Jahren stellte sich heraus, dass in Mammalia die Raf-Proteinfamilie aus drei Isoformen besteht: A-Raf, welches im Urogenitaltrakt auftritt, B-Raf,

welches im Nervensystem und den Hoden vorkommt und das ubiquitär exprimierte c-Raf (Luckett et al., 2000; Storm et al., 1990). Sie sind die wichtigsten Effektoren von Ras und unterschiedlich starke Aktivatoren von MEK-1 und MEK-2. A-Raf aktiviert die Kaskade am schwächsten, während B-Raf den stärksten Aktivator darstellt (Kolch et al., 2002). Das Molekulargewicht beträgt 68 kDa für A-Raf, 65-72 kDa für c-Raf und 72-100 kDa für B-Raf, wobei letzteres alternativem Spleißen unterliegt (Zebisch and Troppmair, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit c-Raf gearbeitet, weshalb nicht näher auf die beiden anderen Isoformen eingegangen wird. Raf-Kinasen sind Multi-Domänen-Proteine, deren Strukturen sich nur wenig unterscheiden. Alle besitzen drei hochkonservierte Regionen (CR), nämlich CR1 am N-Terminus, CR3 am C-Terminus und CR2 dazwischen. CR3 codiert die Kinase-Domäne, welche spezifisch Phosphatreste von ATP auf Serin- und Threoninreste überträgt (Chong et al., 2001). CR2 enthält eine Stelle mit konservierten Aminosäuren, die für die 14-3-3 Protein-Erkennung verantwortlich ist, falls ein bestimmter Serinrest (Ser259 in humanem c-Raf) phosphoryliert ist (Hekman et al., 2004), sowie wichtige hemmende Phosphorylierungsstellen, welche an der negativen Regulation der Ras-Bindung und Raf-Aktivierung beteiligt sind (Dhillon et al., 2002). CR1 enthält die Ras-Bindedomäne (RBD), die selektiv nur GTP-gebundene Ras-Proteine bindet und für die Membranassoziation notwendig ist (Emerson et al., 1995). Außerdem enthält sie die cysteinreiche Domäne (CRD), welche sich unmittelbar stromabwärts der Ras-Bindungsdomäne befindet und für die Interaktion mit Lipiden (u. a. Ceramide oder Phosphatidinsäure) sowie bei der Erkennung von aktiviertem Ras wichtig ist (Daub et al., 1998; Mott et al., 1996).

Raf-Proteine unterliegen einer komplexen Regulierung und stehen unter der Kontrolle einer Vielzahl von inhibitorischen Mechanismen. Der wichtigste Regulationsmechanismus ist die direkte physikalische Assoziation des N-terminalen autoinhibitorischen Bereichs, welcher aus der RBD und CRD besteht, an die Kinase-Domäne von c-Raf (Cutler et al., 1998). Diese Konformation wird durch die Bindung eines 14-3-3-Dimers an phospho-S259 (N-terminal) und pS621 (C-terminal) stabilisiert (Fischer et al., 2009). Dadurch wird das katalytische Zentrum blockiert und damit Kinaseaktivität vollständig inaktiviert. Die „Öffnung“ der katalytischen Domäne erfolgt durch die Anwesenheit von GTP-Ras, welches als Bindungskonkurrent fungiert und so eine Konformationsänderung bzw. Aktivierung der c-Raf-Kinase herbeiführen kann (Terai and Matsuda, 2005). Um die volle Aktivität zu erreichen und diesen Zustand zu stabilisieren, findet eine Dimerisierung statt. MEK1/2 werden als Substrate von den aktivierten Raf-Kinasen phosphoryliert. Der Aktivierungs-/Deaktivierungszyklus von c-Raf ist in Abbildung 2 dargestellt.

Erbliche Mutationen von C-RAF-1, meistens einzelne Aminosäureänderungen am 14-3-3 Bindungsmotiv, können zu seltenen Krankheiten wie dem Noonan Syndrom oder dem Multiple-Lentigines (LEOPARD-) Syndrom führen (Pandit et al., 2007). Betroffene Personen leiden unter unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotypen mit variablem Grad der geistigen Retardierung, Herzfehler, Gesichts-Dysmorphien, Kleinwuchs, Makrozephalie und Hautanomalien. Somatische Mutationen in C-RAF-1 werden mit der Entstehung von Tumoren in Zusammenhang gebracht. C-Raf ist jedoch weitaus seltener bei Krebskrankheiten beteiligt als das verwandte B-Raf (siehe Kap. 1.2.1.1) (Emuss et al., 2005). Da B-Raf aber durch Heterodimerisierung auch c-Raf aktivieren kann, hat diese Mutation einen folgenschweren Effekt durch die konstitutive Aktivierung des ERK1/2 Signalwegs und damit zur Auslösung unkontrollierter Zellteilung (Garnett et al., 2005).

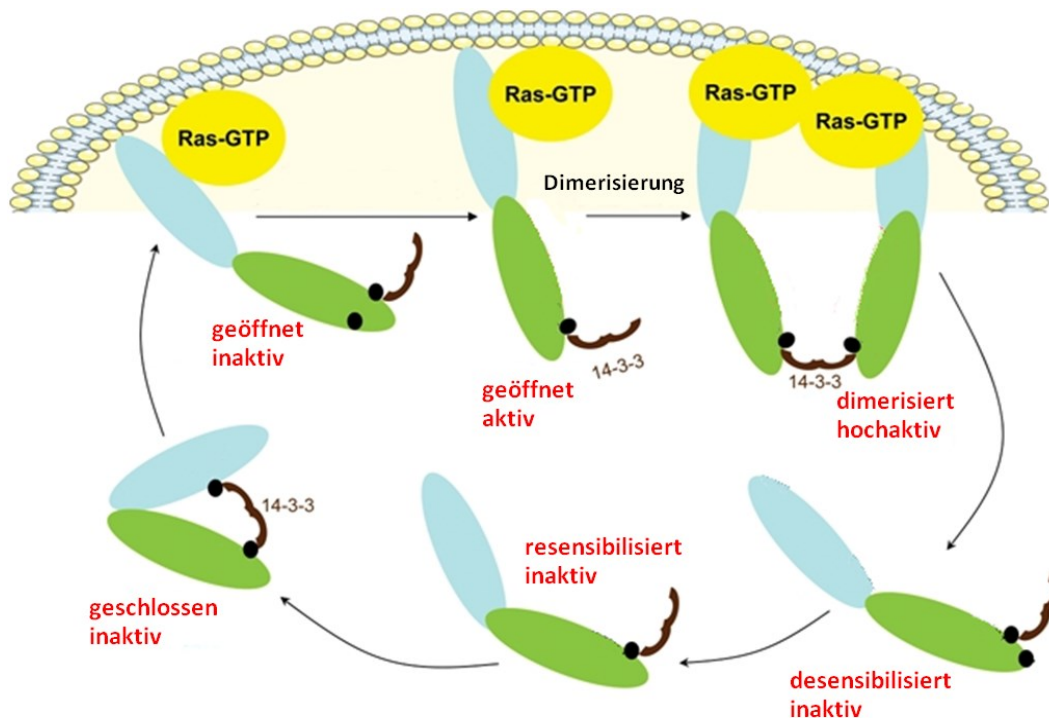


Abb. 2: **Der c-Raf Aktivierungszyklus**, modifiziert nach (Matallanas et al., 2011). In ruhenden Zellen ist c-Raf an beiden 14-3-3 Bindestellen phosphoryliert und befindet sich in einer geschlossenen inaktiven Konformation. Bei Membranaktivierung durch GTP-Ras wird S259 dephosphoryliert. Anschließend erfolgt die Phosphorylierung der N-terminalen Region und bedingt die aktive c-Raf Form. Durch eine Homo- oder Heterodimerisierung (mit B-Raf) erlangt c-Raf seine höchste Aktivierungsstufe. Die Deaktivierung wird durch die Dephosphorylierung von S338 ausgelöst. Außerdem unterdrückt die durch ERK vermittelte Feedback-Phosphorylierung die katalytische Aktivität von c-Raf. Schließlich wird der Rest der Aktivierungs- und der ERK-Feedback-Stellen dephosphoryliert. Die Rephosphorylierung von S259 ermöglicht die intramolekulare 14-3-3 Bindung und damit die Rückkehr in den inaktiven Zustand.

1.1.2 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist ein evolutionär hoch konservierter Signalweg und findet sich in einfachen Eukaryoten wie Hydrozoen oder Nematoden genauso wie in hochentwickelten Säugetieren und dem Menschen (Hobmayer et al., 2000; Wodarz and Nusse, 1998). Vermutlich entstand der Wnt-Signalweg mit der Evolution der Körperachsensymmetrie in den ersten Nesseltieren vor etwa 550 bis 600 Millionen Jahren und war erforderlich für die Weiterentwicklung der Eumetazoa und damit für fast alle Vertreter der heutigen Tierstämme (Chen et al., 2000a). Entdeckt wurde zunächst das zuständige Gen für die flügellose Mutante *wingless* (wg) von *Drosophila melanogaster* als wichtiges Schlüsselgen in der Embryonalentwicklung in den 1970er Jahren (Morata and Lawrence, 1977; Sharma and Chopra, 1976). Es wurde gezeigt, dass dieses Gen die Segmentpolarisierung des Embryos reguliert (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). In den 1980er Jahren wurde dann das Protoonkogen Int-1, welches die bevorzugte genomische Integrationsstelle für das *mouse mammary tumor virus* (MMTV) darstellt, als murines Homolog zu wg gefunden (Nusse et al., 1984; Rijsewijk et al., 1987). Aus der Namenskombination von *wingless* und Int-1 wurde die Bezeichnung Wnt geprägt.

Heute ist bekannt, dass der Wnt-Signalweg sowohl in der Embryogenese als auch im adulten Organismus eine große Rolle in der zellulären Differenzierung, Segmentierung, Proliferation und Migration spielt (Clevers, 2006; Nusse, 2005). In Säugetieren besteht die Wnt-Familie aus 19 verschiedenen sekretierten, cysteinreichen Glykoproteinen, welche 350-400 Aminosäuren lang sind (Miller, 2002). Die Wnt-Proteine binden an Rezeptoren und aktivieren so eine intrazelluläre Signalkaskade (Cadigan and Nusse, 1997), welche zum Beispiel für die Ausbildung der dorsoventralen Achse und die Organreifung im Embryo (Smalley and Dale, 1999) sowie für die Stammzellerneuerung und Proliferation im adulten Organismus von Bedeutung ist (Logan and Nusse, 2004). Dabei findet die Selbsterneuerung von Zellen in adultem Gewebe vor allem im zentralen Nervensystem, in der Haut, in den Haarfollikeln, im blutbildenden System, im Knochen und im Darmepithel statt (Reya and Clevers, 2005). Störungen in der Regulation dieser Signalkaskade können zu verschiedenen Krankheiten wie Osteoporose (Canalis, 2013), Morbus Alzheimer und Schizophrenie (Inestrosa et al., 2012) sowie insbesondere zu Krebs führen (Fuerer et al., 2008). Während bei Tumorerkrankungen häufig eine dauerhafte Aktivierung des Wnt-Signalwegs zu beobachten ist, kann die verminderte Aktivierung zu degenerativen Krankheiten führen (Luo et al., 2007; Nusse, 2005; Polakis, 2012).

Der Wnt-Signalweg wird traditionell in zwei Signaltransduktionswege unterteilt: den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg und den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg (Veeman et al., 2003). Wobei letzterer nochmal in den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg (Kuhl et al., 2000) und den planaren Zellpolaritäts- (PCP) Signalweg (Boutros et al., 1998) unterteilt ist. Allen diesen Signalwegen ist gemeinsam, dass sie durch die Bindung von extrazellulären Wnt-Proteinen an Zelloberflächenrezeptoren der, aus zehn Mitgliedern bestehenden, Frizzled- (Fz) Familie aktiviert werden. Welcher Signalweg genau angeregt wird, hängt von der Kombination aus Wnt-Protein und Frizzled-Rezeptor sowie der Bindung von Korezeptoren und intrazellulären Protein-Protein-Interaktionen ab. Früher teilte man die Wnt-Proteine, anhand ihrer Fähigkeit murine Brustdrüsenepithelzellen (C57MG) morphologisch zu transformieren oder in *Xenopus* Embryonen eine zweite dorsoventrale Körperachse zu induzieren, in kanonische und nicht-kanonische Aktivatoren ein (Du et al., 1995; Shimizu et al., 1997; Wong et al., 1994). Diese Klassifikation ist inzwischen überholt und nur beschränkt zutreffend, denn neuere Arbeiten zeigten, dass Wnt-Proteine je nach Rezeptorzelltyp auch unterschiedliche Wnt-Signalwege aktivieren können. Zum Beispiel ist Wnt-5a fähig sowohl den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg (Kuhl, 2004) als auch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu aktivieren (Mikels and Nusse, 2006; van Amerongen et al., 2012).

1.1.2.1 Der kanonische Wnt-Signalweg

Im kanonischen Wnt-Signalweg spielt das Protein β -Catenin die zentrale Rolle, deshalb wird dieser Signaltransduktionskaskade auch Wnt/ β -Catenin-Signalweg genannt. Durch die Ansammlung von freiem β -Catenin in der Zelle wird das Wnt-Signal vom Rezeptor in den Zellkern weitergeleitet, um dort die Transkription von Zielgenen anzuschalten. β -Catenin besitzt am N-terminalen Ende vier, für den Abbau wichtige, konservierte Phosphorylierungsstellen (Ser33, Ser37, Thr41 und Ser45) und am C-Terminus eine Transaktivierungsdomäne zur Regulation der Genexpression. In Abwesenheit eines Wnt-Signals wird freies β -Catenin im sogenannten *destruction complex* (Degradationskomplex) ständig abgebaut, um seine Konzentration auf einem konstant niedrigen Niveau zu halten. Der *destruction complex* besteht, neben β -Catenin selbst, aus den Tumorsuppressorproteinen Axin als Gerüstprotein und APC (*adenomatöse polyposis coli*) sowie den Serin-/Threoninkinasen Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) und der Caseinkinase I (CKI). β -Catenin wird zuerst von CKI an Ser45 phosphoryliert, bevor GSK-3 β die Stellen Ser33, Ser37 und Thr41 phosphorylieren kann (Liu et al., 2002; Price, 2006). Durch diese Phosphorylierungen ist β -

Catenin für die Bindung des Proteins β -TrCP (*β -transducinrepeat containing protein*), einem Element des Ubiquitin-Ligase-Komplexes, markiert, welches β -Catenin polyubiquitiniert und dessen proteasomalen Abbau einleitet (Aberle et al., 1997; Hart et al., 1999). Im Zellkern wirken die Mitglieder der *T-cell specific transcription factor* (TCF)/*lymphoid-enhancing factor* (LEF)-Familie ohne ihren Bindungspartner β -Catenin als Transkriptionsrepressoren in den Promotorbereichen der Zielgene des Wnt-Signalwegs. Dies wird durch die Bindung von Korepressoren wie dem *C-terminal binding protein* (CtBP) und *transducin-like enhancer of split* (TLE)/Groucho verstärkt, welche mit Histondeacetylasen interagieren, die das Kernchromatin in einem inaktiven Transkriptionsstatus halten (Cavallo et al., 1998; Chinnadurai, 2002; Daniels and Weis, 2005).

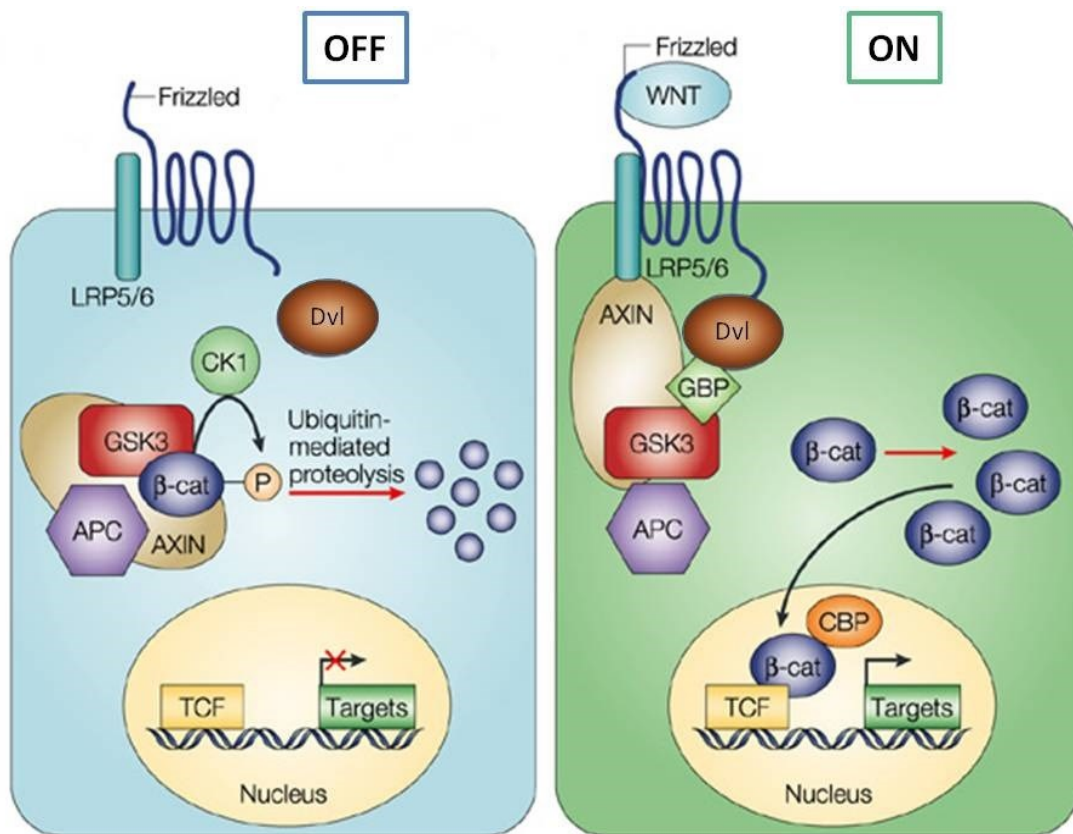


Abb. 3: **Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs**, modifiziert nach (Moon et al., 2004). Links („OFF“) ist die Zelle ohne Wnt-Signal dargestellt, hier findet ein ständiger Abbau von β -Catenin statt, die Transkription der Zielgene wird gehemmt. Rechts („ON“) ist der aktivierte Wnt-Signalweg abgebildet mit der Akkumulation von β -Catenin und der aktivierten Genexpression im Zellkern. Details und Abkürzungen siehe Text.

Kommt es zur Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch die Bindung eines Wnt-Liganden an den extrazellulären Teil eines Frizzled-Rezeptors, der mit dem Korezeptor low

density lipoprotein receptor related protein 5/6 (LRP 5/6) dimerisiert (Bhanot et al., 1996; Pinson et al., 2000), wird das intrazelluläre Protein *dishevelled* (Dvl) an den C-Terminus von Fz rekrutiert und phosphoryliert (Wallingford and Habas, 2005; Wong et al., 2003). Durch die Aktivierung von Dvl wird GSK-3 β gehemmt. Dies führt zum Zerfall des Degradationskomplexes, da die Phosphorylierungen durch GSK-3 β an Axin und APC ausbleiben, welche zur Stabilisierung des Komplexes notwendig sind (Rubinfeld et al., 1996). Dadurch unterbleibt die Phosphorylierung von β -Catenin, es kann sich im Cytosol anreichern und in den Zellkern translozieren (Tolwinski and Wieschaus, 2004). Dort lagert es sich, bei gleichzeitiger Verdrängung der Korepressoren CtBP und TLE/Groucho, an seinen nuklearen Bindungspartner TCF/LEF an. Durch zusätzliche Bindung von Koaktivatoren wie z. B. *Creb-binding-protein* (CBP) und *B-cell-lymphoma-9-2* (BCL9-2) wird die Transkription der Zielgene initiiert (Brembeck et al., 2004; Takemaru and Moon, 2000).

Zu den Zielgenen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zählen u. a. Gene zur Regulation der zellulären Proliferation, Differenzierung, Apoptose, der Zelladhäsion sowie Gene zur Feedback-Regulation der Wnt-Signalkaskade. Man unterscheidet außerdem zwischen primären und sekundären Zielgenen. Primäre Zielgene besitzen ein oder mehrere TCF/LEF-Bindemotive in ihrer Promotorregion und werden direkt durch die Bindung des β -Catenin-TCF/LEF-Komplexes reguliert. Der Transkriptionsfaktor c-Myc (He et al., 1998) und der Zellzyklusaktivator CyclinD1 (Shtutman et al., 1999) gehören beispielsweise zu den direkten Zielgenen, welche eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation spielen (Eilers, 1999). Das Protoonkogen c-Myc ist in vielen zellulären Prozessen involviert, es fördert nicht nur das Zellwachstum und die Proliferation, sondern kann sie für Apoptosesignale sensibilisieren oder auch die Differenzierung von verschiedenen Zellarten hemmen (Pelengaris and Khan, 2003). Cyclin D1 reguliert in Kombination mit den cyclin-abhängigen Kinasen 4 oder 6 (CDK 4/6) den Übergang der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (Morgan, 1995; Tetsu and McCormick, 1999).

1.1.3 Verbindungen zwischen Wnt- und Ras/Raf-Signalweg

Obwohl Signalwege oft nur als eine isolierte Einheit analysiert werden, gehören sie zu einem großen Netzwerk, welches untereinander kommuniziert. Viele dieser *Crosstalks* stehen unter der Kontrolle von Ras oder wirken auf den Ras/Raf Signalweg ein, was darauf hindeutet, dass Ras eine wichtige Rolle bei der Koordinierung dieses *Crosstalks* spielt. Wnt-Liganden können neben dem Wnt-Signalweg auch den MAPK-Signalweg aktivieren. Erstmals wurde im Jahr

1995 ein solcher Effekt, die Aktivierung des Ras/Raf-Signalwegs durch Wnt1, von Pan et al. in transformierten PC12 Zellen beschrieben, welcher damals jedoch der Wirkung zusätzlicher Zytokine beigemessen wurde (Pan et al., 1995). Ebenso konnte Yun et al. eine Aktivierung der Raf-1-MEK-ERK Kaskade in Wnt-3a behandelten Fibroblasten beobachten (Yun et al., 2005). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass Wnt-Proteine, unabhängig von ihrer Fähigkeit zur Stimulierung des Wnt-Signalwegs, das Überleben von Osteoblasten über die Aktivierung der Src/ERK und PI3K/Akt Signalkaskaden verlängern (Almeida et al., 2005). Anscheinend wird diese ERK-Aktivierung mittels Wnt-3a durch den EGF-Rezeptor vermittelt (Kim and Choi, 2007). Ebenso wurde gezeigt, dass durch eine chemische Hemmung der ERK-Aktivierung in totipotenten F9-Teratocarcinoma-Zellen oder mesenchymalen C3H10T1/2 Zellen, die Wnt-3a-sensitive LEF/TCF-Gentranskription abgeschwächt wird, wohingegen die Wnt-3a-induzierte β -Catenin-Akkumulation oder die primitive Endodermbildung nach der Behandlung mit solchen Inhibitoren weitgehend unbeeinflusst bleiben (Bikkavilli et al., 2008; Caverzasio and Manen, 2007). Wie genau Wnt-3a das Auslesen der TCF/LEF-abhängigen Gentranskription beeinflussen, aber auf der anderen Seite nicht den gesamten Weg zur Endodermbildung blockieren kann, lässt vermuten, dass die Beziehungen zwischen diesen Signalwegen weder linear noch im funktionalen Sinn vollständig geklärt sind (Bikkavilli and Malbon, 2009). Zwischen den beiden Signalwegen wurde in Tumorzellen sowohl positiver als auch negativer *Crosstalk* entdeckt. Beispielsweise reguliert ein hyperaktivierter MAPK-Signalweg die Wnt/ β -Catenin-Signalübertragungskaskade in Melanomen nach unten (Biechele et al., 2012), während im Gegensatz dazu bei Darmkrebszellen eine Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch die Stabilisierung von Ras führt (Guardavaccaro and Clevers, 2012; Jeong et al., 2012).

1.2. Deregulierte Signalwege

Normalerweise befinden sich Zellen im Gleichgewicht zwischen Wachstum, Proliferation und Apoptose. Defekte in den Signalwegen, die diese Gewebshomöostase regulieren, können zu einem Kontrollverlust führen. Meistens sind Mutationen für diese Störungen verantwortlich und in der Tumorgenese sind vor allem Protoonkogene, Tumorsuppressorgene und DNA-Reparaturgene betroffen. Onkogene kodieren für Proteine, die Zellwachstum/-proliferation induzieren können, zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Kinasen. Tumorsuppressorgene hingegen codieren für Proteine, die gegensätzlich wirken und zum Beispiel die Apoptose einleiten. Funktionsverluste von Genprodukten, die in der DNA-

Reparatur involviert sind, steigern die Mutationsrate einer Zelle, da beispielsweise Fehler während der Replikation nicht mehr korrigiert werden. Wenn nun durch Mutationen Onkogene überexprimiert und/oder Tumorsuppressorgene ihre Aktivität verlieren, kann dies Zellwachstum und Proliferation fördern und zur Entstehung von Tumoren beitragen.

1.2.1 Der deregulierte Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg

Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg ist in etwa jedem dritten aller humanen Tumoren von Mutationen betroffen. Die meisten krebsassoziierten Schäden, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs führen, sind dabei die Überexpression oder aktivierende Mutationen von RTK, dauerhafte autokrine oder parakrine Produktion von Aktivierungsliganden, Ras-Mutationen und B-Raf-Mutationen (Dhillon et al., 2007).

Ras-Gene sind die am häufigsten mutierten Onkogene in Säugern. Die Punktmutationen betreffen meistens das 12., 13. oder 61. Codon und bewirken einen Aminosäureaustausch, aufgrund dessen die Bindung von GAP/GEFs nicht stattfinden kann. Folglich wird das gebundene GTP nicht mehr hydrolysiert und Ras sowie der darunterliegende Signalweg ist dauerhaft aktiviert (Colicelli, 2004; Karnoub and Weinberg, 2008). Zur humanen Ras (Onkogen)-Familie gehören die Gene NRAS, KRAS und HRAS. Organspezifischer Krebs mit aktivierten Ras-Onkogenen ist häufig mit einer spezifischen Ras-Isoform assoziiert (Fiorucci and Hall, 1988): H-Ras in Blasen- und Nierenkarzinomen, N-Ras in Melanomen, myeloischen Erkrankungen und Leberkarzinomen sowie K-Ras in Lunge-, Kolon- und Pankreaskarzinomen (Rodenhuis, 1992).

Auch B-Raf kann durch Mutationen den Signalweg konstitutiv aktivieren und wird mit etlichen Tumorerkrankungen (7 % aller humanen Tumoren), wie malignes Melanom, Schilddrüsen-, Kolorektal-, Pankreas- oder Ovarialkarzinom, in Verbindung gebracht (Davies et al., 2002; Dhomen and Marais, 2007). Es wurden über 30 verschiedene B-Raf Mutationen in menschlichen Tumoren identifiziert, wobei die meisten in der Kinasedomäne des Proteins liegen. Die häufigste Mutation (90 %) ist jedoch ein einziger Nukleotidaustausch von Thymin zu Adenin im Codon 600, was zu einem Glutamin statt Valin (V600E) Aminosäureeinbau in der Kinasedomäne des B-Raf Proteins führt (Mercer and Pritchard, 2003). Diese Mutation bedingt ein dauerhaft aktives Protein, da die Phosphorylierung an den zwei B-Raf-Phosphorylierungsstellen T599 und S602 imitiert wird. Daraufhin kommt es zur konstitutiven Aktivierung des Ras/Raf-Signalwegs.

Die erste Verbindung zwischen Krebs und mutierten RTK wurde 1984 bekannt (Ullrich et al., 1984). Seitdem wurde die gestörte Signalweiterleitung durch RTKs häufig mit der Entstehung von Tumoren in Zusammenhang gebracht, z. B. bei Brust-, Ovarial-, Magen-, Blasen- und Lungenkarzinomen (Kolibaba and Druker, 1997; Prigent and Lemoine, 1992). Die konstitutive Aktivierung bzw. das transformierende Potential von RTKs kann durch Genamplifikation, Überexpression oder Mutation auftreten. Wobei Mutationen in der extrazellulären Region, der katalytischen Domäne, insbesondere des ATP-Bindungsmotivs, oder der Transmembrandomäne vorkommen können (Zwick et al., 2001). Beispielsweise konnten Missense-Mutationen in der extrazellulären Domäne des EGFR in Glioblastoma festgestellt werden (Lee et al., 2006). Eine Daueraktivierung der RTK kann ebenso durch Überexpression des Liganden entstehen, z. B. durch Liganden der EGF Familie, als auch durch PDGF (Hermanson et al., 1992; Tateishi et al., 1990).

1.2.2 Der deregulierte Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist nach dem Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg am zweithäufigsten von Mutationen in signalübertragenden Proteinen betroffen, welche in humanen Tumoren detektiert werden (Klaus and Birchmeier, 2008). Dazu gehören u. a. Kolorektal-, Pankreas-, Magen-, Leber-, Ovarial- und Prostatakarzinome (Wagener and Müller, 2010). Mutationen, welche die Wnt-Stimulation imitieren, resultieren in der Regel in der Inaktivierung von APC oder Axin oder der Aktivierung von β -Catenin. Alle diese Mutationen führen zu einer Anhäufung von β -Catenin im Zellkern, welche anschließend mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren binden, um die Transkription von Zielgenen zu aktivieren (Giles et al., 2003).

Der Funktionsverlust des Tumorsuppressorproteins APC wirkt sich auf viele zelluläre Prozesse aus, wie die Regulierung des Zellzyklus, die Zell-Zell-Adhäsion, die Apoptose sowie die Stabilität des Mikrotubuli-Zytoskeletts (Fearnhead et al., 2001). Mutationen im APC-Gen innerhalb der sogenannten mutation cluster region (MCR) resultieren in einem verkürzten Protein, dem die Axin-Bindestellen sowie viele β -Catenin-Bindestellen fehlen können (Beroud and Soussi, 1996). Diese Mutationen in der MCR sind mit einem Allelverlust assoziiert, wobei die Inaktivierung beider APC-Allele durch somatische Mutationen sehr häufig in kolorektalen Krebserkrankungen auftreten (Nagase and Nakamura, 1993).

Mutationen im β -Catenin kodierenden CTNNB1-Gen bewirken häufig einen Verlust der Phosphorylierungsstellen für die Kinasen GSK-3 β und CK1 α , daher kann mutiertes β -Catenin nicht mehr abgebaut werden (Polakis, 2007). β -Catenin-Mutationen findet man insbesondere

bei Hirn-, Magen-, Haut- und Lebertumoren sowie kolorektalen Karzinomen. In letzteren schließen sich APC- und β -Catenin-Mutationen gegenseitig aus, da sie beide zu einer Stabilisierung von β -Catenin und zu einer konstitutiven β -catenin/TCF Transkriptionsaktivität führen (Kaler et al., 2012).

Ebenfalls zu einer Erhöhung des β -Catenin-Levels führen Mutationen in einem der beiden Axin-Gene. Oft liegen die Veränderungen des Axin-Proteins infolge der Mutationen im Bindungsbereich von β -Catenin, APC oder GSK-3 β . Mutationen in Axin2 findet man fast ausschließlich im Exon 7 und bewirken meistens den Verlust der DVL-Bindestelle. Axin-Sequenzvarianten wurden in verschiedenen Tumoren gefunden, darunter Leber-, Kolorektal- und Ovarialtumore (Salahshor and Woodgett, 2005).

1.2.3 Die kolorektale Kanzerogenese

In Deutschland sind bösartige Neubildungen des Darms die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern und die dritthäufigste bei Frauen (RKI and GEKID, 2015). Das Vorkommen von Darmkrebs wird mit steigender Tendenz registriert und umfasst jährlich über 60.000 Neuerkrankungen in Deutschland. Das Risiko im Laufe des Lebens an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken liegt bei ca. 5 %, wobei das mittlere Erkrankungsrisiko zwischen 72-75 Jahren liegt (RKI and GEKID, 2015). Als Ursachen werden das Zusammenspiel von Umwelteinflüssen und genetischer Disposition angenommen, wobei eine ballaststoffreiche, fettarme und vorwiegend vegetarische Ernährung sowie der Verzicht auf Alkohol und Tabak das Risiko der Erkrankung vermindern soll (Durko and Malecka-Panas, 2014). Hinweise darauf erhält man u. a. im Mausmodell (Tammariello and Milner, 2010), hier wurde beispielsweise die Aufnahme von fettreicher Nahrung und der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen untersucht (Wasan et al., 1997).

Der Darm braucht für seine Aufgaben, der Absorption von Nährstoffen, die Resorption von Wasser und Elektrolyten sowie der Abwehr von Pathogenen, eine sehr große Oberfläche, die er in Form von Epitheleinstülpungen (Krypten) und im Dünndarm auch Ausstülpungen (Villi) erreicht. Im Kryptengrund befinden sich pluripotente Stammzellen, die sich ungefähr alle 24 Stunden teilen. Sie differenzieren sich zu einer der vier epithelialen Zelltypen aus: absorbierende Enterozyten, enteroendokrinen Zellen, sekretierende Becherzellen und Panethzellen (Sancho et al., 2003). Während dieser Reifung, von der Stammzelle über Vorläuferzellen bis zur differenzierten Zelle, bewegen sich die Zellen aufwärts in Richtung Lumen, wo sie sich schließlich nach drei bis fünf Tagen apoptotisch ablösen. Eine Ausnahme

sind die Panethzellen, die wieder Richtung Kryptengrund migrieren, wo sie bis zu 60 Tagen verbleiben und anti-mikrobielle Stoffe sezernieren. Der Erhalt des Darmepithels ist folglich von einer kontrollierten, stetigen sowie genau balancierten Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose abhängig. Dieser komplexe Ablauf wird hauptsächlich von der Aktivität des Wnt-Signalweges kontrolliert, welcher die Proliferation der Stammzellen in den Krypten induziert (Pinto et al., 2003). Die dazu benötigten Wnt-Proteine werden von dem mesenchymalen Gewebe, das die Krypten umgibt sezerniert, so dass sich ein Wnt-Gradient bildet, der zur Kryptenspitze hin abnimmt. So findet im Kryptengrund zelluläre Proliferation und im oberen Drittel der Krypten die Differenzierung der Zellen statt (Pinto and Clevers, 2005).

Die meisten Darmtumore treten sporadisch auf, nur 1-5 % sind familiär genetisch prädisponiert. Die häufigsten erblichen Vertreter sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), bei der autosomal-dominant vererbte Funktionsverlustmutationen in APC vorliegen, und das hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinomsyndrom (HNPCC), bei dem Keimbahnmutationen an der DNA-Reparatur beteiligter Gene, den sogenannten Mismatch-Repair-Genen bestehen (Fishel et al., 1993; Tomlinson et al., 1997). Ein Großteil aller Tumore des Kolons entwickelt sich über Jahre hinweg aus normalen Epithelzellen durch, von Mutationen verursachter, Aktivierung von Onkogenen und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in einem mehrstufigen Prozess über Polypen, gutartigen Adenomen bis hin zu Karzinomen (Vogelstein et al., 1988). Die Arbeitsgruppe um B. Vogelstein stellte zu diesem Prozess ein genetisches Modell zur kolorektalen Kanzerogenese auf (siehe Abbildung 4). In diesem Prozess sind vier zentrale Signalwege betroffen, wobei die Reihenfolge der Mutationen nicht determiniert ist, aber häufig in der nachfolgend beschriebenen Abfolge auftritt. Oft (in 80 % der Fälle) steht am Anfang des Prozesses, vom gesunden zu einem übermäßig proliferierenden Darmepithel, eine Mutation beider Allele des Tumorsuppressorgens APC (Kinzler et al., 1991; Polakis et al., 1999). Die Mutation resultiert in einem verkürzten Protein, dem die Bindungsstellen für β -Catenin und Axin fehlen, was zu einer Destabilisierung des *destruction complex* führt. Alternativ kann auch eine Mutation in β -Catenin oder Axin2 (Liu et al., 2000) vorliegen. Bei einer aktivierenden Mutation in β -Catenin kommt es zum Funktionsverlust der Phosphorylierungsstelle, daraufhin kann β -Catenin nicht mehr abgebaut werden. Bei beiden Fällen wird aufgrund der Mutationen der Wnt-Signalweg konstitutiv aktiviert und somit die Proliferation der Zelle stimuliert. Die vermehrte Proliferation führt zu Ausstülpungen des Epithels und schließlich zur Bildung benignen Polypen bzw. frühen Adenomen. In diesem Stadium kann es zu Veränderungen der

DNA-Methylierung und zu einer Mutation im Protoonkogen KRAS kommen. Infolgedessen verliert das Ras Protein seine GTP-Hydrolysefähigkeit und dadurch ist der Ras/Raf/ERK-Signalweg dauerhaft angeschaltet, was wiederum die Zellproliferation begünstigt (Young et al., 2009). In ca. 50 % aller Kolonadenome und -karzinome lassen sich Mutationen in Ras-Genen nachweisen (Vogelstein et al., 1988). Erfolgen im späten Adenom noch weitere Mutationen in den Tumorsuppressorgenen DCC (deleted in colon cancer), SMAD4 (small mothers against decapentaplegic homolog 4) und p53 (Tumorprotein 53) kann sich ein Karzinom entwickeln (Vogelstein et al., 1988). DCC ist zum einen in der Lage, gebunden an Netrin1, die MAP-Kinase ERK1/2 zu aktivieren und zum anderen die Apoptose via Caspase 9 einzuleiten (Mehlen and Fearon, 2004). SMAD4 ist u. a. ein zentraler Transmitter von Signalen der TGF (transforming growth factor)- β -Zytokin-Superfamilie, es kann mit anderen Transkriptionsfaktoren die Transkriptionsrate wachstumsinhibierender Gene modulieren (Clarke and Liu, 2008; Goumans et al., 2009). Demzufolge haben Mutationen im SMAD4-Gen eine gesteigerte Zellproliferation zur Folge. Der „Wächter des Genoms“ p53 ist als Transkriptionsfaktor in der Lage die Expression von Genen zu regulieren, die an der Kontrolle des Zellzyklus, der DNA-Reparatur, und an der Induktion der Apoptose beteiligt sind (Lane, 1992; Stiewe, 2007). Ein Funktionsverlust von p53 führt demnach zu einem Ausfall des Zellzyklusarrests zur DNA-Reparatur und einer reduzierten Apoptosefähigkeit der Zelle, so dass sich ein invasiver Tumor bilden kann (Vousden and Lane, 2007).

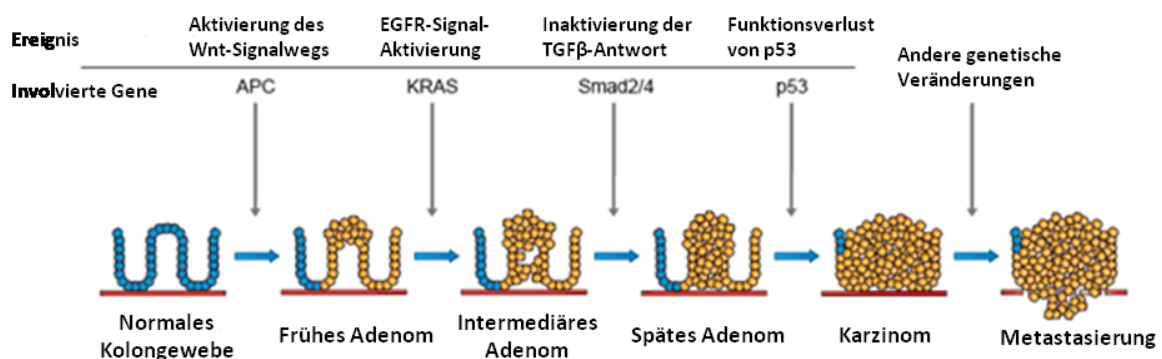


Abb. 4: **Modell der mehrstufigen kolorektalen Kanzerogenese**, modifiziert nach (Davies et al., 2005). Mehrere genetische Veränderungen führen über verschiedene Adenomstadien zur Bildung eines Karzinoms. Details und Abkürzungen siehe Text.

1.2.4 Tumorthherapie durch Beeinflussung des Ras/Raf- oder Wnt-Signalwegs

Die Konvergenz des Ras/Raf- und Wnt-Signalwegs fördert die Tumorentstehung durch die Erhöhung der Expression verschiedener Gene, z. B. C-MYC oder COX2 (Araki et al., 2003; Kerkhoff et al., 1998). Es konnte in zahlreichen transgenen Maus-Tumormodellen beobachtet werden, dass Wnt- und Ras/Raf-Signalisierungskaskaden synergistisch zur Tumorentstehung und –entwicklung, wie beispielsweise Darm- und Lebertumoren (Harada et al., 2004; Janssen, 2003), beitragen. Aufgrund der Bedeutung von Mutationen im Ras/Raf- bzw. im Wnt-Signalweg in der Tumorentstehung wird intensiv nach Inhibitoren geforscht.

Es gibt zurzeit noch keine therapeutisch zugelassenen Medikamente, welche den Wnt-Signalweg spezifisch beeinflussen. Jedoch gibt es eine Reihe von Modulatoren, welche unspezifisch auf den Wnt-Weg wirken. Viele Studien haben gezeigt, dass verschiedene NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs), wie Sulindac, Celecoxib oder Aspirin, chemopräventive Wirkungen, vor allem in Darmkrebs, haben (Boon et al., 2004; Sandler et al., 2003; Thun et al., 2002). Viele therapeutische Wirkungen der NSAIDs werden auf die Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Inaktivierung der Cyclooxygenasen COX-1 und 2 zurückgeführt, NSAIDs bewirken aber auch eine Verringerung des nukleären β -Catenin-Levels (Dihlmann et al., 2001; Janssens et al., 2006). Vitamin D zeigte ebenfalls einen chemopräventiven Effekt bei Darm- und Brustkrebs in Tiermodellen. Retinoide (Vitamin A Derivate) können β -Catenin in der Zelle destabilisieren und die Wnt-vermittelte Transkription inhibieren. Ein weiteres Beispiel ist der Wirkstoff Pyrvinium, welcher die Wirkung von CK1 α steigert und dadurch zur Degradation von Axin und β -Catenin beiträgt (Thorne et al., 2010).

Neben diesen unspezifischen Modulatoren wurden mehrere molekulare Zielwirkstoffe durch High-Throughput-Assays entdeckt, welche den Wnt-Signalweg an unterschiedlichen Angriffspunkten inhibieren. Als β -Catenin–TCF-Antagonisten wurden die Moleküle PKF115-584, iCRT3/5/14, CGP049090 und 2,4-diamino-quinazoline gefunden (Chen et al., 2009b; Gonsalves et al., 2011; Lepourcelet et al., 2004), während die Wirkstoffe NSC668036, FJ9 und 3289–8625 die PDZ-Domäne von DVL blockieren und somit die Frizzled-PDZ-Interaktion inhibieren (Fujii et al., 2007; Grandy et al., 2009; Shan et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass das Molekül FH535 in der Lage ist cytosolisches β -Catenin abzufangen, die nukleäre Translokation zu verhindern und den β -Catenin/TCF-Komplexes als Antagonist des PPAR δ - (peroxisome proliferator–activated receptor) Signalwegs zu blockieren (Handeli and Simon, 2008). Desweiteren gibt es kleine Moleküle, welche, z. B. durch die Inhibierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen Tankyrase 1 und 2, das Protein Axin stabilisieren (IWR-1 und XAV939) sowie IWP-2 und LGK974, welche die Acyltransferase Porcupine inhibieren,

die für die Wnt Sekretion wichtig ist (Chen et al., 2009a; Huang et al., 2009; Liu et al., 2013). Eine andere Möglichkeit den Wnt-Signalweg zu blockieren wären beispielsweise monoklonale Antikörper wie OMP-18R5, die an Frizzled-Rezeptoren binden (Gurney et al., 2012) oder Inhibitoren gegen Wnt-Coaktivatoren (CBP und p300) wie ICG-001 und PRI-724 (Emami et al., 2004; Lenz and Kahn, 2014). Derzeit befinden sich bereits einige dieser Wirkstoffe in klinischen Studien für verschiedene Tumorerkrankungen, z. B. LGK974, OMP-18R5 (Vantictumab) oder PRI-724.

Auch innerhalb des Ras/Raf-Signalwegs wurden inzwischen mehrere Inhibitoren gefunden bzw. entwickelt, welche in verschiedenen Phasen der klinischen Bewertung sind. Man kann diese Inhibitoren aufgrund ihres Angriffsziels in Raf-, MEK- und ERK-Inhibitoren unterteilen. Die Raf-Inhibitoren kann man wiederum nach ihrer Bindungsaffinität in zwei Klassen einteilen. Verbindungen der Klasse II Inhibitoren besitzen eine höhere Affinität zur inaktiven Raf-Isoform, sie sind indirekte ATP-Konkurrenten und können auch verschiedene andere Kinasen hemmen, z. B. VEGFR, c-KIT, PDGFR (Liu and Gray, 2006). Klasse I Raf-Inhibitoren zielen hingegen auf die ATP-Bindungsstelle in der aktiven Konformation von Raf, folglich sind sie spezifischer für die V600E onkogene B-Raf-Isoform und demnach aktivere Anti-Krebs-Mittel in Tumoren, die von dieser Mutation betroffen sind (Rusconi et al., 2012). Sorafenib (BAY43-9006, Nexavar®) ist ein, von den pharmazeutischen Firmen Bayer und Onyx entwickelter, C-Raf Kinase-Inhibitor der Klasse II (Lowinger et al., 2002; Smith et al., 2001). Im Jahr 2002 begannen die klinischen Studien des Medikaments und im Dezember 2005 erhielt es die Zulassung für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms sowie im November 2007 für die Behandlung von fortgeschrittenem Leberzellkarzinom. Es stellte sich heraus, dass Sorafenib keine spezifische C-Raf-Inhibitor-Aktivität, sondern vielmehr eine inhibitorische Wirkung gegen eine Vielzahl von Proteinkinasen, einschließlich anderer Raf-Kinase-Isoformen wie B-Raf und einer Anzahl von Tyrosinkinasen (z. B. VEGFR 1/2/3, PDGFR-B) verfügt, welche alle mit der Tumorentstehung und –progression verknüpft sind (Wilhelm et al., 2004). In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Sorafenib auch das Tumorwachstum von humanen Melanomen sowie Dickdarm-, Pankreas-, Schilddrüsen-, Ovarialkarzinomen und NSCLC hemmt, indem es die Zellproliferation und Angiogenese inhibiert (Sharma et al., 2005; Wilhelm and Chien, 2002; Wilhelm et al., 2004), wobei der multiple Wirkmechanismus im Einzelnen noch nicht vollständig geklärt ist. In den meisten Tumortypen hemmte Sorafenib die Signalübertragung durch Raf und infolgedessen das Zellwachstum (Wilhelm et al., 2008). Sorafenib induziert in einigen Tumorzelltypen auch Apoptose. Dies geschieht vor allem durch

Down-Regulation des antiapoptotischen Proteins Mcl-1, möglicherweise durch einen MEK/ERK-unabhängigen Mechanismus (Yu et al., 2005). Weitere Klasse II Raf-Inhibitoren sind z. B. Regorafenib (BAY73-4506, Stivarga®), RAF-265 (CHIR-265) und XL821(BMS-908662) (Dickson et al., 2015; Wilhelm et al., 2011; Wong, 2009).

Beispiele für Raf-Inhibitoren der Klasse I sind Vemurafenib (PLX4032), Dabrafenib (SB-590885) und PLX4720 (Sala et al., 2008; Takle et al., 2006; Tsai et al., 2008).

Obwohl MEK1/2 Gene selten in Tumorerkrankungen mutiert sind, ist es sinnvoll MEK1/2 zu inhibieren, um die weitere Signalkaskade zu unterdrücken. MEK1/2-Inhibitoren der sogenannten ersten Generation sind beispielsweise die Substanzen PD98059, U0126, Ro 09-2210 und CI-1040 (PD184352) (Duncia et al., 1998; Sebolt-Leopold et al., 1999; Sebolt-Leopold and Herrera, 2004; Williams et al., 1998). Beispiele der zweiten Generation mit verbesserten pharmakokinetischen Profilen sind die Wirkstoffe PD0325901, Selumetinib (AZD6244), Trametinib (GSK1120212), BAY869766, TAK733, RO4987655 und Cobimetinib (XL-518) (Dong et al., 2011; Gilmartin et al., 2011; Isshiki et al., 2011; Iverson et al., 2009; Takahashi et al., 2016; Yeh et al., 2007).

Durch die übermäßige Aktivierung von ERK in Raf-Inhibitor-resistenten Tumoren und anderen MAPK-aktivierten Krebsarten, ist auch die direkte Inhibition von ERK eine anzustrebende Strategie für die Krebsbehandlung (Hatzivassiliou et al., 2012). Bis heute gibt es allerdings erst wenig bekannte ERK1/2-Inhibitoren, wie z. B. FR180204, VTX-11e und SCH772984 (Aronov et al., 2009; Chaikuad et al., 2014; Otori et al., 2005).

1.3 Zellbasierte Assays zur Detektion von Wirkstoffen

Das Verständnis zellulärer Signalwege und ihre molekularen Mechanismen ist ein wichtiges Ziel wissenschaftlicher Forschung und ist eng mit der Suche nach neuen Wirkstoffen verknüpft, um Krankheiten aufgrund deregulierter Signalwege besser behandeln zu können. In den letzten Jahren wurde viel Geld und Mühe investiert, um kleine, bioaktive Moleküle (*small molecules*) zu entdecken und zu charakterisieren, welche Komponenten von zellulären Signalwegen beeinflussen. Zum Beispiel kann durch die Bindung eines *small molecule* die Enzymaktivität beeinflusst und somit Protein-Ligand-Interaktionen gestört werden. Zu den am häufigsten verwendeten Zielen (*Targets*) gehören Kinasen sowie verschiedene andere Enzyme, Ionenkanäle und -transporter, Zelloberflächen-Rezeptoren und Protein-Protein-Interaktionen (Crespi et al., 1997). Biologisch aktive Moleküle sind früher häufig durch die Prüfung einer einzigen Verbindung entdeckt worden, ein solcher Ansatz ist aber ineffizient

und kostenintensiv. Deshalb sind Hochdurchsatz-Screening (HTS)-Technologien entwickelt worden, um eine große Anzahl von Substanzen gleichzeitig, im miniaturisierten Ansatz, oftmals mithilfe von automatisierten Protokollen, in kurzer Zeit testen zu können. Dabei kann die Anzahl von zu prüfenden Substanzen zwischen Dutzenden über mehrere Tausende bis hin zu Millionen schwanken. Es gibt zwei Hauptvarianten ein Hochdurchsatz-Screening-Verfahren auf neue Wirkstoffe bzw. *small molecules* durchzuführen, zum einen rein protein-biochemische und zum anderen zellbasierte Assays (Hüser, 2006). Bei biochemischen Assays werden meist durch Überexpression und Aufreinigung gewonnene Proteine auf ihre Funktionalität in Gegenwart von einer bestimmten Substanz untersucht, z. B. werden Substanz-Targetmolekül-Bindungen oder Enzymaktivität gemessen, hierbei wird aber die Komplexität eines lebenden, biologischen Systems vernachlässigt. Zu den zellbasierten Assays gehören u. a. Second-Messenger-, Membranpotenzial- und Reporter-gen-Assays. Bei letzterem handelt es sich oftmals um eine lumineszenzbasierte Methode, durch die man die Expression eines Zielproteins durch enzymatische Luciferase-Aktivität messen kann (Auld et al., 2008; Fraga, 2008). Ein Vorteil von zellbasierten Assays ist, dass man auch Aussagen über Zytotoxizität, Interaktionen der Substanz mit anderen Zellkomponenten und der Membrandurchlässigkeit (bei intrazellulären Targets) treffen kann (Clemons, 2004; Xia and Wong, 2012). Im Gegensatz zu biochemischen Assays erspart man sich bei Assays auf Zellbasis die oft zeitintensive Aufreinigung von Proteinen, außerdem findet sie Anwendung wenn Targets oder Cofaktoren unbekannt sind. Aufgrund dieser Vorzüge machen zellbasierte Assays inzwischen etwa die Hälfte aller Hochdurchsatz-Verfahren aus (An and Tolliday, 2009).

1.3.1 Fluoreszenzbasierte Zellassays

Die fluoreszenzbasierte Detektion ist wahrscheinlich das meist angewendete Nachweisverfahren in der biowissenschaftlichen Forschung, da es eine sehr hohe Empfindlichkeit, eine vielfältige Auswahl an Fluorophoren und eine große Auswahl an Auslesemöglichkeiten auf Basis der verschiedenen Fluoreszenzeigenschaften besitzt (An, 2009). Fluoreszenzbasierte Assays können allgemein in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe umfasst Verfahren, welche makroskopisch die Gesamtfluoreszenzintensität detektieren, wie z. B. Fluoreszenzpolarisation, Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), Fluoreszenzlebensdauer und zeitaufgelöste Fluoreszenz. Zur zweiten Gruppe zählen Methoden, welche die Fluoreszenz von einzelnen Molekülen detektieren, beispielsweise die

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie oder die Analyse der Fluoreszenzintensitätsverteilung (An, 2009). Mit diesen Techniken wurden bereits viele biologische Abläufe, wie Protein-Proteininteraktionen, Enzymaktivität, Zustände und Lokalisation von Molekülen, Organellen oder Zellen, überwacht und erforscht.

Mithilfe der (automatisierten) Fluoreszenzmikroskopie können beim Screening unerwünschte Wirkungen einer Substanz wie z. B. Toxizität, temporäre Zustände der Zelle bzw. von Zellbestandteilen sowie weitere Veränderungen der Zellmorphologie und –physiologie entdeckt und analysiert werden (Zanella et al., 2010). Dabei ist die Fluoreszenzmikroskopie so sensitiv, dass auch geringe Mengen an exprimierten Proteinen in wenigen Zellen detektiert werden können (Mitchison, 2005). Außerdem kann durch Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe mehrere Parameter gleichzeitig überprüft werden (Haney et al., 2006). Die Kombination aus Mikroskopie und HTS hat zu einer neuen Technologie geführt: das High-Content-Screening (HCS) (Taylor, 2007). Dieser Begriff vereint die Fortschritte aus den Bereichen Zellassays, Fluoreszenz-Imaging und Bioinformatik und kann aufgrund dieses großen Informationsgehaltes drastisch zur Erhöhung der Produktivität im Bereich der Wirkstofffindung beitragen (Abraham et al., 2004). Dabei wird typischerweise mit automatischen Zellanalysesystemen und hochentwickelter Bildanalyse-Software gearbeitet, um die gewonnenen Daten auszuwerten.

1.3.1.1 Fluoreszenzproteine

Fluoreszierende Moleküle finden eine breite Anwendung in der Detektion und Untersuchung vieler biochemischer und zellbiologischer Fragestellungen. Dabei wurde zunächst auf natürlich vorkommende Fluoreszenzproteine zur spezifischen Markierung zellulärer Proteine zurückgegriffen. Vor bereits über fünfzig Jahren wurde der bekannteste Vertreter, nämlich das grün fluoreszierende Protein (GFP), aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* beschrieben (Shimomura et al., 1962). Die Fluoreszenz des Tieres kommt durch einen Energietransfer zwischen den Proteinen Aequorin und GFP zustande. Nach Aktivierung von Calciumionen emittiert das Aequorin ein Photon im blauen Spektralbereich. Das kurzwellige blaue Licht regt die chromophore Gruppe des GFP an, welche daraufhin längerwelliges grünes Licht emittiert (Morin and Hastings, 1971; Morise et al., 1974; Shimomura, 2005). Seit Anfang der neunziger Jahre ist die DNA-Sequenz von GFP bekannt und kurz darauf wurde GFP als Marker für Proteine zur Standardmethode in der Zellbiologie (Chalfie et al., 1994; Prasher et al., 1992). Ein großer Vorteil bei der Verwendung von GFP ist, dass keine zusätzlichen Kofaktoren, Enzyme oder Substrate gebraucht werden. Die GFP-Fluoreszenz lässt sich

sowohl in lebenden Zellen und Geweben als auch in fixierten Proben mit einem Fluoreszenzmikroskop detektieren. Die Sequenz von GFP besteht aus 238 Aminosäuren, die eine Zylinderstruktur aus einer α -Helix und elf umgebenden antiparallelen β -Faltblättern bilden (Yang et al., 1996a). In der Mitte des Zylinders befindet sich das Chromophor, welches durch einen autokatalytischen Faltungsprozess der Aminosäuren Ser65, Tyr66 und Gly67 gebildet wird (Heim et al., 1994). GFP besitzt zwei Absorptionsmaxima, das höchste Maximum bei 395 nm und ein weiteres bei 475 nm, das Emissionsmaximum liegt im hellgrünen Bereich bei 509 nm (Ormo et al., 1996). Trotz aller Vorteile des GFPs stieß die Forschung bald auf Grenzen in der Anwendung, nämlich die relativ langsame Chromophorbildung, die geringe Fluoreszenzintensität und die Neigung zur Bildung von inaktiven Aggregaten bei Temperaturen über 20 °C (Niswender et al., 1995). Durch Mutagenese der Fluorophor-Sequenz und einiger in räumlicher Nähe befindlichen Aminosäuren war es möglich die Eigenschaften von GFP zu verbessern, dabei wurde eine Vielzahl von Varianten erstellt. In diesen Experimenten konnte z. B. durch Austausch der Aminosäuren Ser65 zu Thr (S65T) und Phe64 zu Leu (F64L) eine 35-fach gesteigerte Fluoreszenzintensität, eine schnellere Faltung, eine erhöhte Photostabilität sowie die Vermeidung der zellschädigenden UV-Absorption erreicht werden (Cormack et al., 1996; Yang et al., 1996b). Diese inzwischen am meisten genutzte Version des GFP wurde enhanced GFP (EGFP) genannt und besitzt nur ein Absorptionsmaximum bei 489 nm.

Es wurden aber neben der Einführung von Mutationen auch weitere natürlich vorkommende GFP-ähnliche Proteine gefunden, wie z. B. das rot fluoreszierende Protein dsRed aus der Koralle *Discosoma striata*. Dieses liegt im Gegensatz zum monomeren GFP als sich langsam bildendes Tetramer vor (Shaner et al., 2004). Auch dsRed hat man durch Mutationen verändert und monomere, rötlich-fluoreszierende Derivate erstellen können. Eines davon ist das Protein namens mCherry, welches im Gegensatz zu dsRed eine höhere Faltungsgeschwindigkeit sowie ein zum längerwelligen Licht verschobenes Absorptionsmaximum bei 587 nm (dsRed 558 nm) und einem Emissionsmaximum bei 610 nm (dsRed 583 nm) besitzt (Shaner et al., 2004).

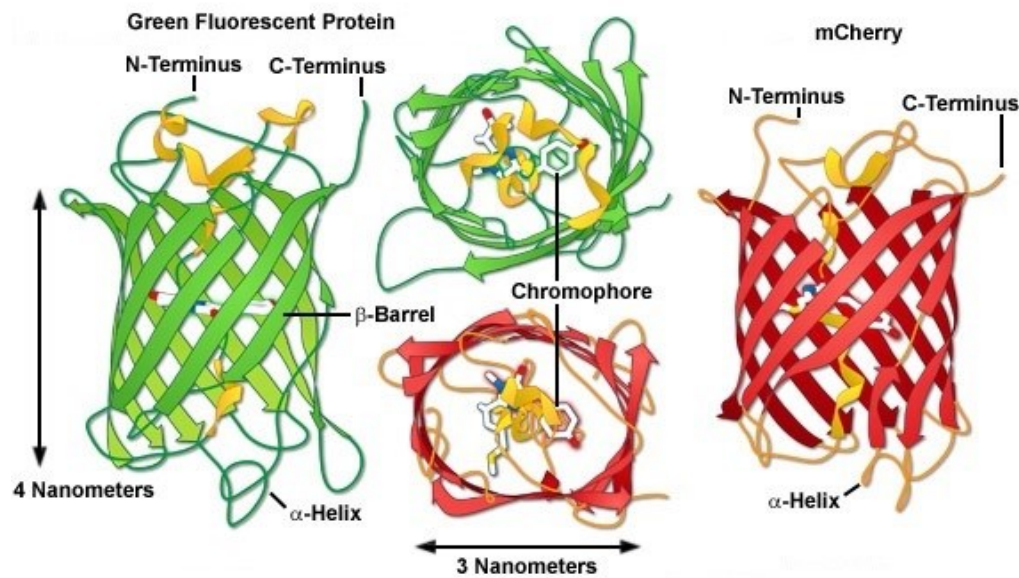


Abb. 5: **Struktur der Fluorophore GFP und mCherry** modifiziert nach (Silfies J. S., 2016)

Fluoreszierende Proteine ermöglichen eine Visualisierung der intrazellulären Lokalisation von Proteinen in lebenden Zellen, dabei werden die Fluoreszenzintensität sowie die räumliche und zeitliche Verteilung analysiert. Die GFP-Fusionsmethode, d. h. die Verknüpfung des GFP an das N- oder C-terminale Ende des zu untersuchenden Proteins, ermöglicht dynamische Prozesse wie Proteintranslokationen unter physiologischen Bedingungen in Echtzeit zu untersuchen und optisch festzuhalten, dabei ist sie außerdem schneller und effektiver als der Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Ein entsprechendes Protein-Fluorophor-Konstrukt sollte auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt werden, um eine Proteintranslokation im Raf-/Ras-Signaltransduktionsweg zu verfolgen.

1.4 Ziele der Arbeit

Der Ras/Raf-Signalweg ist in vielen menschlichen Tumoren durch Mutation in den Proto-Onkogenen RAS oder RAF überaktiviert. Um Krebszellen besser bekämpfen zu können, ist die Identifikation von neuen Inhibitoren und Informationen über ihre Funktion von großer Bedeutung. Bisher gibt es nur sehr wenige bekannte kleine Moleküle, die die Ras/Raf-Interaktion beeinflussen. Die Hauptursache dafür, dass bislang nur wenige kleine Inhibitoren von Proteininteraktionen identifiziert werden konnten, ist der Mangel an geeigneten Screeningsystemen zur direkten Messung dieser Interaktionen. Zurzeit gibt es nur sehr wenige Zellen und zelluläre Assays, welche die direkte Detektion einer Proteinaktivität oder sogar -interaktion erlauben. Bei den momentan kommerziell erhältlichen Assays beruht die eigentliche Detektion auf einer enzymatischen Farbreaktion, die die Zugabe eines Substrats und die Aufarbeitung der Zellen notwendig macht, was den Einsatz des Systems in einem Hochdurchsatzverfahren erschwert.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung und Etablierung neuer Zelllinien, in denen wichtige krankheitsrelevante Proteininteraktionen direkt mikroskopisch detektiert werden können. Dafür werden im ersten Schritt die c-Raf-cDNA mit der DNA eines Fluorophors gekoppelt und in einen Transfektionsvektor kloniert. Anschließend werden diese Vektoren in verschiedene Zelllinien transfiziert. Stabil hergestellte Zelllinien, in denen fluoreszenzmikroskopisch die Aktivität des Ras/Raf-Signalwegs abgebildet werden kann, sollen charakterisiert und etabliert werden. Dabei beruht die zu entwickelnde Methode der Detektion der Protein-Proteininteraktion auf dem Prinzip der intrazellulären Proteintranslokation. Die Interaktion zwischen Raf und Ras soll durch die membranäre Translokation von Raf fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Danach sollte die grundsätzliche Möglichkeit der Herstellung einer Doppeltransfektanten getestet werden, indem ein in der Arbeitsgruppe bereits existierendes, Wnt-Signalwegaktivität-anzeigendes Reportergenkonstrukt in eine während dieser Arbeit hergestellte, c-Raf-Fluorophor stabil überexprimierende Zelllinie transfiziert wird.

Ein weiteres Ziel im Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg ist die Untersuchung des zellulären Einflusses von Wnt-Liganden auf die Zelllinie HEK293T. Hierzu sollten die Auswirkungen von Wnt-3a auf HEK293T Zellen durch den Vergleich verschiedener Proliferationsassays analysiert werden.

2. Material

Im Folgenden sind alle verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sowie Chemikalien, Lösungen und deren Bezugsquellen aufgelistet, welche für die in Kapitel 3 beschriebenen Methoden verwendet wurden.

2.1. Geräte

-80°C Tiefgefrierschrank HeraFreeze	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Autoklav VE-75	Systec GmbH, Linden
Blotting-System „iBlot“	Life Science Technologies, Darmstadt
Celloshaker Variospeed	Chemetron, Malta
CO ₂ -Inkubator IncuSafe	SANYO Electric Co. Ltd, München
Einfriergerät „Mr. Frosty“	Carl Roth, Karlsruhe
Einzelkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg & Gilson, Middleton, USA
Eismaschine SPR 80	NordCap, Bremen
Feinwaage	Kern & Sohn, Balingen
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX50	Olympus, Hamburg
Fluorophotometer Genius	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Gefrierschrank exquisit	GGV H.-Ges., Kaarst
Geldokumentationssystem Quantum ST4	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Heiz-Magnetrührer IKAMAG RH	IKA-Werke, Staufen
Inversmikroskop Olympus CKX41	Olympus, Hamburg
Konfokalmikroskop LSM710	Carl Zeiss, Jena
Kühlschrank exquisit	GGV H.-Ges., Kaarst
Kühlzentrifuge Hermle Z323K	Hermle Labortechnik, Wehingen
Magnetrührer Faust Mono	Faust Lab Science, Klettgau
Mikrowelle exquisit MW1780G	GGV H.-Ges., Kaarst
Mini und Midi Elektrophorese-Einheit	Carl Roth, Karlsruhe
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Netzgeräte	Bio-Rad, München
Observer.Z1	Carl Zeiss, Jena
PH-Meter PB-11	Sartorius, Göttingen
Photometer NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipetboy acu2	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz

Schüttelinkubator Ecotron	Infors, Bottmingen, Schweiz
Spektralphotometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Biowizard mit Sauger, Zellkultur	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Sterilbank MSC Advantage, Bakterienkultur	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen
Thermomixblock MB-102	Biozym, Hessisch Oldendorf
Tischzentrifuge Sprout	Biozym, Hessisch Oldendorf
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad Aqualine AL12	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen
Zentrifuge C5804	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf, Hamburg

2.2 Verbrauchsmaterialien

Bakterienröhrchen 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellview Glasboden 4-Kompartimentschale	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Combitips plus 1 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten (steril) 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einweg-Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Parafilm	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Ketten 0,2 ml	Neolab, Heidelberg
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen 0,1-10 µl	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 10-200 µl, 100-1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterilfilter	Neolab, Heidelberg

Whatman 3 MM Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturflaschen 50ml, 250ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte glass-view 24-well schwarz	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten 6-well, 24-well, 96-well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Neolab, Heidelberg

2.3 Chemikalien

1 kbp und 100 bp DNA-Leiter	Bioline, Luckenwalde
DNA-Leiter Mix 100-5000 bp	Applchem, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Alkaline Phosphatase CIP	New England Biolabs, Frankfurt
Agarose peqGold Universal	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Bradford Assay Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
Dako fluorescent mounting medium	Dako, Eching
DAPI	Life Technologies, Darmstadt
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Applchem, Darmstadt
Formaldehydlösung	Carl Roth, Karlsruhe
GelStar	Biozym, Hessisch Oldendorf
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kodak-Entwickler	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kodak-Fixierer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ladepuffer Bluejuice	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
MTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Applchem, Darmstadt
NGS	PAA, Cölbe
PBS	PAN Biotech, Aidenbach
Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Roti-Lumin	Carl Roth, Karlsruhe

Schwefelsäure	Carl Roth, Karlsruhe
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sorafenib	LC Laboratories, Woburn, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Applichem, Carl Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

2.4 Kit-Systeme

BrdU Cell Proliferation ELISA Kit (col.)	Roche Diagnostics, Mannheim
cDNA-Synthese-Kit	ABgene, Hamburg
iBlot 7-Minute Blotting Kit	Life Science Technologies, Darmstadt
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
MyTaq™ Red Mix	Bioline, Luckenwalde
Novex NuPAGE SDS-PAGE Gel System	Life Science Technologie, Darmstadt
Peqlab Tissue DNA Extraction Kit	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Phusion® Flash High-Fidelity PCR Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Qiagen PCR Cloning Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
RNA-Isolationskit	Macherey-Nagel, Düren
Transfektionskit Effectene	QIAGEN, Hilden
Transfektionskit Attractene	QIAGEN, Hilden
Transfektionskit Rotifect Plus	Carl Roth, Karlsruhe
Transfektionskit Metafectene	Biontex Laboratories, München

2.5 Nährmedien, Antibiotika und Zusätze für Bakterien- und Zellkulturen

Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) with low Glucose (1 mg/l)	PAN Biotech, Aidenbach
FCS	PAN Biotech, Aidenbach
Geneticinsulfat (G418)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Material

LB-Pulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
LB-agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NEAAs	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rc-EGF	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Rh-Wnt3a	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
S.O.C. Medium	New England Biolabs, Frankfurt
TB-Pulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung	PAN Biotech, Aidenbach

2.6 Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit entmineralisiertem Wasser angesetzt. Bei Bedarf wurden diese autoklaviert.

<u>Agaroselösung</u> für x %-iges Gel	x g Agarose auf 100 ml 1x TAE Aufkochen + 2 µl Gelstar
<u>Blockierlösung</u>	10 % NGS in PBS
<u>BSA-Lösung</u>	5 % BSA in TBS-T
<u>Einfriermedium</u>	10 % FCS 10 % DMSO 1 % Penicillin/Streptomycin in DMEM
<u>Entwickler-Lösung</u>	Kodak-Entwickler 1:5 verdünnt in Wasser
<u>Fixier-Lösung</u>	Kodak-Fixierer 1:5 verdünnt in Wasser
<u>LB-Medium</u>	25 g fertiges LB-Pulver auf 1000 ml Wasser
<u>LB-Agarplatten</u>	15 g Agar-Agar auf 1000 ml LB-Flüssigmedium
<u>LB-Amp-Agarplatten</u>	+ Ampicillin [100 µg/ml]
<u>LB-Kan-Agarplatten</u>	+ Kanamycin [50 µg/ml]
<u>Membran-Blocking-Lösung</u>	3 % Magermilchpulver in 1x TBS 0,1 % Tween-20

Material

<u>Membran-Wasch-Lösung</u>	1x PBS oder 1x TBS 0,1 % Tween-20
<u>Ponceau S-Lösung</u>	0,1 % Ponceau red 5 % Essigsäure
<u>Proteaseinhibitormix</u>	1 Tablette auf 10 ml PBS
<u>TAE 50x (pH 8,0)</u>	2 M Tris pH 8,2 450 mM Essigsäure 50 mM EDTA
<u>TBS 10x (pH 7,6)</u>	0,2 M Tris 0,2 % HCl 1,37 M Natriumchlorid
<u>TB-Medium</u>	50,8 g fertiges TB-Pulver 4 ml Glycerin auf 1000 ml Wasser
<u>Triton-Lösung</u>	0,5 % Triton X-100 in PBS

2.7 Verwendete Analysesoftware

AxioVision	Carl Zeiss, Jena
FinchTV	Geospiza, Seattle, USA
ImageJ	Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA
Microsoft Office Professional Pro	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nanodrop Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Quantum Capt.	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Serial Cloner	Softonic, Barcelona, Spanien
ZEN	Carl Zeiss, Jena

2.8 Biologische Materialien

2.8.1 Restriktionsenzyme

Alle benutzten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt) erworben.

2.8.2 Polymerasen

Für PCR-Testansätze wurde der fertige PCR-Mix „MyTaq™ Red Mix“ von Bioline (Luckenwalde) benutzt. Im präparativen Ansatz wurde die Polymerase „Phusion“ von

Finnzymes/Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet. Überhängende DNA-Enden nach Restriktionen wurden mit der Polymerase T4 geglättet.

2.8.3 Primer

Die aufgelisteten Primer wurden selbst designend, von der Firma MWG Operon (München) käuflich erworben und als Stocklösung von 100 pmol/μl bei -20 °C aufbewahrt.

Tab. 1: Verwendete PCR-Primer

Primer		Sequenz	Annealing-temperatur
egfp	for	5'-GATCTATGGTGAGCAAGGGC-3'	58 °C
	rev	5'-CTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'	
mCherry	for	5'-CATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'	60 °C
	rev	5'-CTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'	
gapdh	for	5'-CATGGTGCTGAGATTTGCCAAC-3'	57 °C
	rev	5'-TCAACACCTTGACCTTCTCATCAC-3'	
c-myc	for	5'-CCGAGCAAGGACGCGACTCTC-3'	60 °C
	rev	5'-GCCTTTCAGAGAAGCGGGTCC-3'	
cyclinD1	for	5'-GCCTGAACCTGAGGAGCC-3'	55 °C
	rev	5'-GTCACACTTGATCACTCTGG-3'	
cRaf	for	5'-CGCCACCATGGGATCATG-3'	58 °C
	rev	5'-CTATGTCCGAACGAAGAC-3'	

Tab. 2: Verwendete Primer für Sequenzierung und Klonierung

EGFP-end	rev	5'-ATCCCGGCGGTCAGAACTCCAGCAC-3'
pDisplay	for	5'-CGGCTTGGGGATATCCACCATG-3'
pDisplay	rev	5'-GGCTGATCTCGAGCGGCCGCC-3'
pDSeq	rev	5'-CAGGAGTGTGTCTGTCTCCAT-3'
Raf_anfang	rev	5'-CCAAGCTCCCTGTATGTGCTCC-3'
Raf_klon_BamHI	rev	5'-CATGCTCGAGCGGCGGATCCTG-3'
Raf_klon_EcoRI	for	5'-GGAGAATTCAGCTTGGTA-3'
Raf_klon_pstI	for	5'-CCCAAGCTGCAGACCGCCACCATG-3'
Raf_klon_xhoI	rev	5'-GATGCATGCTCGAGCGGCGCCAG-3'
Raf_mitte	for	5'-CTCCTATGGCATCGTATTG-3'

Tab. 3: Verwendete Primer für Overlap-Extension-PCR

Primer		Sequenz	Annealing-temperatur
cRaf_shift	for	5'-CACAAAGGTAAAAAAGCACGC-3'	59°C/62°C
	rev	5'-GCGTGCTTTTTTACCTTTGTG-3'	
Raf_End+C	rev	5'-GTGGATCCAGAATTCGTGATTCGTATGTC-3'	
Raf_Anf_XhoI	for	5'-CTCAGATCTCGAGAAGCTTGTCGAC-3'	

2.8.4 Antikörper

Tab. 4: Verwendete Erstantikörper

Primäre Antikörper	Typ	Bildungsorganismus	Hersteller
β-Actin	Monoclonal, IgG1	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA
β-Catenin	Monoclonal, IgG1	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA
c-Myc	Polyclonal, IgG	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA
c-Raf	Polyclonal, IgG	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA
Cyclin D1	Polyclonal, IgG	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA
GAPDH	Monoclonal, IgG2b	Maus	Abcam, England
mCherry	Monoclonal, IgG2a	Maus	Abcam, England
p-c-Raf	Polyclonal, IgG	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA
SDHA	Monoclonal, IgG1	Maus	Abcam, England

Tab. 5: Verwendete gekoppelte Zweitantikörper. Alle Antikörper sind vom Isotyp IgG.

Sekundäre Antikörper	Kopplung	Bildungsorganismus	Firma
Kaninchen	HRP	Ziege	Cell Signaling Technology, USA
Kaninchen	Alexa Fluor 546	Ziege	Life Technologies, Darmstadt
Maus	HRP	Ziege	Abcam, England
Maus	Alexa Fluor 488	Ziege	Life Technologies, Darmstadt

2.8.5 Vektorkonstrukte

Tab. 6: Verwendete Vektoren

Name	Firma	Verwendung
pDisplay	Invitrogen/ Life Technologies, Darmstadt	pDisplay-EGFP, pDisplay-EGFP-cRaf
pEGFP	MPI Dortmund	cDNA für EGFP
pmCherry-N1	Clontech/ Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich	pcRaf-mCherry-N1
pcDNA3-cRaf	MPI Dortmund	cDNA für cRaf
pDrive	QIAGEN, Hilden	Zwischenklonierungsvektor
pDisplay-STE-neu4	zur Verfügung gestellt von HS Zweibrücken	Kotransfektionversuche

2.8.6 Bakterienstämme

Tab. 7: Verwendete *E. coli* Bakterienstämme

Name	Quelle
NEB-10 β	New England Biolabs, Frankfurt
NEB-5 α	New England Biolabs, Frankfurt
TG1	MPI Dortmund

2.8.7 Zelllinien

Tab. 8: Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Quelle
MDCK	Nierenepithelzellen aus dem Hund (<i>Madin Darby canine kidney</i>)	MPI Dortmund
MDCK-F3	canine Nierenepithelzellen transformiert mit onkogenem v-H-Ras	MPI Dortmund
HEK293T	humane embryonale Nierenepithelzelllinie	MPI Dortmund
HT29	humane Kolonkarzinomzelllinie	MPI Dortmund

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt und die verwendeten Lösungen und Materialien waren vorher in geeigneter Weise sterilisiert/autoklaviert worden, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Zellen wurden in Plastikkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Dulbecco's MEM with low Glucose (1 mg/l) diente als Medium für alle Zelllinien. Zusätzlich wurde dem Kulturmedium 10 % fetales Kälberserum und 1 % nichtessentielle Aminosäuren als Wachstumsförderung sowie 1 % PenStrep supplementiert.

3.1.1.1 Subkultivierung von Zellen

Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und das Nährmedium alle zwei bis drei Tage erneuert. Die in Kultur gehaltenen Zelllinien unterschieden sich in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, so dass die Zeitspanne bis zum Umsetzen der Zellen variierte. Die Zellen wurden bei Erreichen der optischen Konfluenz gesplittet, indem zunächst das in der Flasche befindliche Kulturmedium abgesaugt wurde, danach die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA für einige Minuten inkubiert wurden, bis sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Dies wurde mikroskopisch überprüft. Dann wurden die nicht mehr adhärenen Zellen in frischem, 37 °C warmen Medium aufgenommen, in Röhrchen überführt und bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in frischem, 37 °C warmen Medium resuspendiert. Nach dem Auszählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät.

3.1.1.2 Bestimmung der Zellzahl und -vitalität

Mithilfe der Trypanblaufärbung kann die Zellvitalität überprüft werden. Trypanblau gehört zu den Azofarbstoffen und kann als Anion an Zellproteine binden. Aufgrund seiner Größe ($M = 960,8 \text{ g/mol}$) kann Trypanblau die intakte Membran lebender Zellen nicht passieren und färbt somit selektiv tote Zellen, deren Membran durchlässig geworden ist. Deshalb erscheinen lebende Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop hell und tote Zellen tiefblau. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 5 µl Zellsuspension (nach dem Ablösen mit Trypsin) mit

5 µl 0,5 %-iger Trypanblau-Lösung gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Anschließend wurden die lebenden Zellen in den vier Großquadranten gezählt. Durch Bildung des Mittelwertes und Multiplikation mit dem Faktor 2×10^4 ließ sich die Zellzahl pro Milliliter Suspension berechnen. Zur Ermittlung des Anteils an nekrotischen Zellen wurde der Quotient aus gefärbten Zellen zur Gesamtzellzahl berechnet.

3.1.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, bei einer optischen Konfluenz von ca. 70-80 % geerntet, in Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Das Medium wurde entfernt, das Zellpellet in entsprechender Menge Einfriermedium resuspendiert (ca. 10^6 Zellen pro ml) und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden sofort danach mithilfe eines Einfriergerätes bei -80°C tiefgefroren. Das Einfriergerät ist mit 100%igem Isopropanol gefüllt und bewirkt dadurch eine langsame Abkühlung der Zellen um 1°C pro Minute. Nach ca. 24 h wurden die Kryoröhrchen zur langfristigen Konservierung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Bei Bedarf wurden die tiefgefrorenen Zellen wieder der Kryokonservierung entnommen und in einem 37°C warmen Wasserbad zügig aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in frischem, vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert, sowie abzentrifugiert, um verbleibendes DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die frisch aufgetauten Zellen in 5 ml Medium aufgenommen, in eine 25 ml-Zellkulturflasche überführt und im CO_2 -Inkubator bei 37°C kultiviert.

3.1.2 Transfektion von Zellen

In Vorversuchen wurde mit verschiedenen kommerziellen Lipofektionskits die besten Transfektionsbedingungen (Menge Transfektionsreagenz und DNA, unterschiedliche Medien und Zellzahlen) ermittelt. Die Analyse der Transfektionseffizienz erfolgte hierbei mithilfe eines EGFP-Vektors. Die Transfektionsbedingung, die die höchste Anzahl an fluoreszierenden Zellen zeigte, wurde für weitere Versuche genutzt. Die Transfektionskits „Metafectene“, „Rotifect Plus“, „Effectene“ und „Attractene“ wurden nach Protokoll des jeweiligen Herstellers verwendet.

Die Transfektion der MDCK und MDCK-F3 Zellen erfolgte schließlich mit dem „Effectene™ Transfection Reagent“ der Firma QIAGEN mit jeweils $0,5\text{ }\mu\text{g}$ Plasmid-DNA und $5\text{ }\mu\text{l}$ Reagenz nach Herstellerangaben. Hierbei handelt es sich um eine liposomale Transfektion, bei der kationische Liposomen mit der negativ geladenen DNA Komplexe bilden, die dann

von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden können. Bei einer transienten Transfektion bleibt das eingeschleuste Plasmid nur für kurze Zeit in der Zelle, deshalb findet die Expression auch nur für einen begrenzten Zeitraum statt. Wird jedoch auf die transfizierten Zellen ein Selektionsdruck ausgeübt, z. B. durch Inkubation der transfizierten Zellen mit einem entsprechenden Selektionsantibiotikum, können nur die plasmidhaltigen Zellen überleben. Das Plasmid wird in das Genom der Zellen eingebaut und dessen genetische Information an die nächste Generation weitergegeben.

3.1.2.1 Stabile Transfektion

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät. Bei der transienten Transfektion konnten die Zellen nach 24 - 72 h für weitere Experimente verwendet werden. Bei der stabilen Transfektion hingegen wurden die Zellen nach 48 h mit dem Selektionsantibiotikum Geneticin behandelt. Die effektive Konzentration des Selektionsmediums wurde zuvor experimentell ermittelt (siehe Kap. 3.1.4), so dass MDCK Zellen mit 1 mg/ml und MDCK-F3 Zellen mit 0,5 mg/ml Geneticin selektiert wurden. Die Kultivierung mit dem Selektionsantibiotikum erfolgte so lange (i. d. R. zwei bis drei Wochen mit regelmäßigen Medienwechsel), bis man Zellkolonien durch Picken mit fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle auf 96-well-Platten überführen konnte. Nachdem ein Well konfluent bewachsen war, wurden die Zellen zur weiteren Ausbreitung in eine nächst größere Well-Platte, danach in kleine Kulturfラスchen überführt und dort bis zu ihrer Charakterisierung mit der halben Menge an Geneticin weiterbehandelt. Wenn genügend Zellen eines Klonen verfügbar waren, wurde ein Teil zur Konservierung tiefgefroren (siehe Kap. 3.1.1.3). Zur Expressionskontrolle wurde das transfizierte Gen mithilfe PCR oder das entsprechende Protein mit dem passenden Antikörper in der Western-Blot-Analyse detektiert. Außerdem wurden Morphologie und Eigenschaften der Zellklone mit denen der Ausgangszelllinie verglichen.

3.1.3 Aufnahme einer Wachstumskurve

Zur Analyse des Wachstumsverhalten bzw. der Zellteilungsrate einer Zelllinie wurden Wachstumskurven aufgenommen. Dafür wurden in 6-well Platten je Vertiefung 5×10^4 Zellen ausgesät. Das Medium wurde nach zwei bis drei Tagen gewechselt. Die Zellen wurden in 100 µl Trypsin von der Oberfläche gelöst, mit 100 µl Medium verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Auswertung erfolgte aus jeweils drei Wiederholungen.

Die Zellen wurden über mehrere Tage gezählt, die Daten in Excel ausgewertet und in einem Diagramm mit berechneter Standardabweichung aufgezeichnet.

3.1.4 Optimierung von Selektionsbedingungen

Für die Ermittlung der Sensitivität von Zelllinien auf das Selektionsantibiotikum Geneticin, welches für die Herstellung von stabil transfizierten Zellen verwendet wird, wurde eine so genannte „death-curve“ aufgenommen. Mit dieser Methode wurde die geringste effektive Antibiotikakonzentration bestimmt, bei der die (nicht transfizierten) Zellen innerhalb weniger Tage absterben, da diese kein, auf dem Transfektionsvektor vorhandenes, Resistenzgen besitzen.

Dafür wurden 3×10^4 MDCK bzw. MDCK-F3 Zellen in eine 24-well-Platte ausgesät und nach 24 h mit verschiedenen Geneticin-Konzentrationen [100 µg/ml bis 1500 µg/ml] über mehrere Tage kultiviert, wobei nach zwei bis drei Tagen das Selektionsmedium erneuert oder eine Subkultivierung durchgeführt wurde. Das Zellwachstum wurde während dieser Zeit mikroskopisch beobachtet. Nach einer Inkubationszeit von zehn Tagen wurde zusätzlich mittels Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer ermittelt, ab welcher Konzentration das Antibiotikum auf die Zellen toxisch wirkte.

3.1.5 Behandlung der Zellen mit EGF bzw. Sorafenib

Vor MAPK-Signalwegaktivierungs- bzw. Inhibierungsexperimenten wurden die Zellen 24 h lang mit serumreduzierten Medium (bis zu 5 % FCS) kultiviert. Die MDCK Zellen wurden je nach Versuchsansatz mit dem Wachstumsfaktor EGF [100 ng/ml] und die MDCK-F3 Zellen mit dem Proteinkinaseinhibitor Sorafenib [1 µM] behandelt. Zur gleichmäßigen Verteilung wurde das Medium nach Zugabe der Substanzen leicht geschwenkt.

3.1.6 MTT-Assay

Der MTT Assay dient der quantitativen Bestimmung lebender Zellen in einer Flüssigkeit. Der Assay beruht darauf, dass Mitochondrien vitaler Zellen das gelbe Tetrazol MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid) zu lilafarbenen Formazankristallen transformieren. Diese Reduktionsreaktion wird durch das Enzym Dehydrogenase, mit den Kofaktoren NADH/NADPH, ermöglicht, da dieses in der Lage ist den Tetrazoliumring zu schneiden. Die Formazankristalle werden gelöst und die Farbintensität kann anschließend mit einem ELISA-Photometer gemessen werden. Der Absorptionswert der farbigen Lösung ist

direkt abhängig von der Menge der verbrauchten Substanz und wird bei 590 nm ermittelt. Mithilfe einer separat erstellten Eichkurve kann von dem ermittelten Wert auf die Anzahl vitaler Zellen in der Probenflüssigkeit geschlossen werden. Möglich ist dies durch das ebenfalls direkt proportionale Verhältnis zwischen Zellzahl und gebildetem MTT Formazan. Zur Durchführung wurden 20 µl MTT in jedes 96-Well gegeben und drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und durch 200 µl DMSO pro Well ersetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte das photometrische Auslesen der Absorptionswerte.

3.1.7 BrdU-Assay

Zur Bestimmung der DNA-Syntheserate wurde das Kit „Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric)“ von der Firma Roche verwendet. Die Zellen werden hierbei mit einer BrdU-Lösung (5-Bromo-2'-deoxyuridin) behandelt. BrdU ist ein Pyrimidin-Analogon, welches anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Durch einen anschließenden Fixationsschritt, bei dem die DNA denaturiert, wird die Zugänglichkeit des in die Nukleinsäuren eingebauten BrdU für den monoklonalen, mit Peroxidase konjugierten Antikörper verbessert. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex kann durch eine anschließend ablaufende Substratreaktion detektiert werden. Die dafür notwendige photometrische Messung erfolgt bei 450 nm. Die Absorptionswerte korrelieren dabei mit der DNA-Syntheserate. Mittels einer Eichkurve mit bekannten Zellkonzentrationen kann von dem ermittelten Wert auf die Zahl proliferierender Zellen geschlossen werden.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll, wobei für die Färbereaktion drei Stunden bei 37 °C inkubiert und die Substratreaktion mittels Schwefelsäure nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur beendet wurde.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Proteinextrakten

Zur Isolation von Proteinextrakten wurde den Zellen das Medium abgesaugt, danach mit PBS gewaschen, anschließend mit 0,5 ml Trypsin und einem Gummischaber geerntet und in ein Eppendorfgefäß überführt. Es folgte die Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min und die Entfernung des Überstandes. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Zellpellets bei -80 °C eingefroren.

3.2.1.1 Gesamtzellextrakte für Western-Blot-Analyse

Um proteinbiochemische Analysen an zellulärem Material durchzuführen, müssen die Proteine zunächst extrahiert werden. Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellpellets in einem Mix aus PBS und Proteaseinhibitor (1:10) resuspendiert, wodurch der enzymatische Abbau von Proteinen vermieden werden sollte. Bei ca. 2×10^6 Zellen wurden 0,5 ml Proteaseinhibitormix eingesetzt. Es folgte ein thermischer Zellaufschluss mittels fünfmaligen Einfrierens in flüssigen Stickstoff. Die Proteinkonzentration wurde mittels der Methode nach Bradford bestimmt.

3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) beruht auf der Komplexbildung zwischen der Aminogruppe der Proteine und dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Das Absorptionsspektrum dieses Farbstoffs verschiebt sich in phosphosaurer Lösung von 465 nm auf eine Wellenlänge von 595 nm. Dies führt zu einer Blaufärbung der Lösung. Die Absorption verhält sich dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration der Lösung.

In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst eine Eichkurve mittels einer BSA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen angefertigt, die auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt wurde. Für die Proteinkonzentrationsbestimmung der Versuchsproben wurden je 2 µl der Proteinextrakte auf 200 µl Bradford-Reagenz gegeben. Nach 15 minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Messung der Absorption am Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm vorgenommen. Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde anhand der Eichkurve ermittelt.

3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der extrahierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (*Sodium-dodecylsulphate polyacrylamid gelelectrophoresis*). Die Elektrophorese erfolgte nach dem denaturierenden und diskontinuierlichen System nach Laemmli (Laemmli, 1970), wobei die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches an die hydrophoben Proteinregionen bindet und die Eigenladung der Proteine maskiert, indem es die Proteine in eine stark negative Ladung einhüllt, so dass sie nur aufgrund ihres Molekulargewichts im Gel aufgetrennt werden. Die Proteine wurden in einem grobmaschigen Sammelgel und einem höher vernetzten Trenngel aufgetrennt. Die zurückgelegte Strecke der Proteine im Gel ist etwa linear vom dekadischen Logarithmus der

Molekülgrößen abhängig und lässt sich anhand von Eichproteinen mit bekanntem Molekulargewicht bestimmen.

Die fertigen Polyacrylamidgele bestanden aus einem 7,5 %igen Trenngel und einem 5 %igen Sammelgel. Zunächst wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit SDS-Laufpuffer gespült. Die aufzutragenden Proben wurden wie folgt behandelt: 25 µg Protein wurden mit 1/2 Volumen Ladepuffer und dieses Gemisch nochmal 1:10 mit dem reduzierenden Agens versetzt. Dann wurden die Proben 5 min bei 75°C denaturiert und nach Abkühlen auf das Gel aufgetragen. Als Standard wurde der Proteinmarker „SeeBlue® Plus 2 Pre-Stained Standard“ (Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte im SDS-Laufpuffer bei 10 mA innerhalb des Sammelgels und bei 100 mA innerhalb des Trenngels.

Im Anschluss wurden die aufgetrennten Proteine mittels eines Western-Blot-Transfers aus dem Acrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

3.2.4 Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot ermöglicht spezifische Nachweisreaktionen von Proteinen, welche zuvor auf eine Membran übertragen wurden (Renart et al., 1979; Towbin et al., 1979).

Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE wurden die Proteine durch das Western-Blot-Verfahren elektrophoretisch aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurde zunächst das Sammelgel vom Trenngel entfernt. Das Trenngel wurde dann auf eine in Blotting-Puffer befeuchtete Nitrozellulosemembran gelegt und nach folgendem Schema luftblasenfrei im iBlot-Gerät fixiert:

Kupfer-**Anode** mit Gelmatrix

Nitrozellulosemembran

Trenngel

1 Lage feuchtes 3MM-Whatmanpapier

Schwamm

Kupfer-**Kathode** mit Gelmatrix

Das fertige „Sandwich“ wurde schließlich für acht Minuten geblottet und die Nitrozellulosemembran anschließend herausgeholt. Der verwendete Prestained-Protein-Standard wurde nach erfolgreichem Transfer auf der Membran sichtbar. Zusätzlich wurde zur Kontrolle des blasenfreien Proteintransfers die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung

gefärbt und dabei die Markerbanden auf der Membran mit Bleistift markiert. Die Färbelösung wurde durch Spülen mit TBS + 0,2 % Tween-20 wieder vollständig von der Membran entfernt. Dann erfolgte der spezifische Nachweis von auf der Membran immobilisierten Proteinen mithilfe von Antikörpern. Zunächst wurde zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen die Membran in Membran-Blocking-Lösung für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper in der jeweiligen Blockierlösung in einer für den Antikörper speziellen Verdünnung ü. N. bei 4 °C. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal für je 5 min mit der Membran-Wasch-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal für je 5 min mit der Membran-Wasch-Lösung gewaschen. Zum Schluss wurden die Proteinbanden mithilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht, indem Luminol mit Wasserstoffperoxid durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert und dadurch Energie in Form von Licht frei wird. Das Maximum der Lichtemission liegt bei 428 nm, welche zur Röntgenfilm-Belichtung genutzt werden kann. Zur Visualisierung wurde die Membran nach Angaben des Herstellers mit den Roti[®]-Lumin Reagenzien behandelt und in Folie eingepackt. Direkt im Anschluss wurden ECL-Hyperfilme auf die Folie gelegt und je nach Intensität der Signale entsprechend lange abgedunkelt belichtet. Der Film wurde zuerst kurz in Entwicklerlösung eingetaucht, dann im Wasser gewaschen, danach einige Minuten in die Fixierlösung gegeben und abschließend wieder mit Wasser gewaschen. Die Quantifizierung der Bandenstärke wurde mithilfe der ImageJ Software vorgenommen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch kommerzielle Kits nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und der Anionenaustauschchromatographie über eine Säule. Je nach Verwendungszweck des zu isolierenden Plasmids wurde für geringe DNA-Mengen eine Präparation im kleinen Maßstab (Mini-Präparation) und für größere DNA-Mengen eine Isolierung im größeren Maßstab (Midi-Präparation) durchgeführt.

Für die Plasmid-Mini-Präparation wurden 3-5 ml einer Bakterienkultur, welche ca. 8 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert wurde, zur weiteren Bearbeitung mit dem „Plasmid Miniprep Kit I“ (Phebra) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Plasmid-Midi-Präparation

erfolgte mit 50-100 ml einer Bakterien-Übernachtskultur unter Verwendung des „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ nach Herstellerangaben. Das erhaltene Plasmid-DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend, je nach Größe, in 30-200 µl A.dest gelöst. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde spektralphotometrisch bestimmt und bis zur weiteren Verwendung wurde diese bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.2 Isolierung von genomischer DNA

Die genomische DNA aus eukaryotischen Zelllinien wurde mittels „Peqlab Tissue DNA Extraction Kit“ nach Angaben der Herstellerfirma isoliert. Die geernteten, pelletierten Zellen wurden dabei zunächst im Lyse-Puffer mit Proteinase K sowie RNase-Lösung inkubiert, um Proteine und RNA zu zerstören. Nach Zugabe des Binding-Puffers wurden die Probe auf eine Säule geladen und es folgten mehrere Waschschrte zur Reinigung der DNA. Die Elution erfolgte mit 50-100 µl Elutionspuffer bzw. A. dest. Zur weiteren Verwendung wurde die Konzentration der DNA spektralphotometrisch bestimmt und diese bei -20 °C gelagert.

3.3.3 Isolierung von RNA

Die RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zelllinien erfolgte mit dem „NucleoSpin® RNAII“-Kit der Firma Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden die zuvor geernteten Zellen lysiert und mit Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die RNA an eine Silicamembran gebunden und mögliche DNA-Kontaminationen wurden durch einen DNase-Verdau eliminiert. Die RNA wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und danach wurde die Konzentration der RNA-Proben spektralphotometrisch bestimmt. Aufgrund der Instabilität wurde die RNA unmittelbar nach der Isolation bei -80 °C gelagert.

3.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde photometrisch unter Verwendung des Spektralphotometers "NanoDrop" bestimmt. Dabei wurde jeweils 1 µl der unverdünnten Probenlösung auf die Messvorrichtung aufgetragen und die Konzentration über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen eine entsprechende Referenzlösung ermittelt. So entspricht eine OD₂₆₀ von 1 ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Das Verhältnis von OD₂₆₀ und OD₂₈₀ gibt Aufschluss über Proteinkontaminationen in der Lösung, da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen, so dass der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ bei deren

Vorhandensein abnimmt. Reine DNA bzw. RNA besitzt A_{260}/A_{280} -Raten von 1,7 - 2,0 bzw. 1,9 - 2,1.

3.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist ein Verfahren zur selektiven Amplifizierung bzw. Erzeugung bestimmter DNA-Sequenzen und basiert auf den Arbeiten von Mullis und Saiki (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988). Die Position und Länge des Amplikons wird dabei durch die Wahl der Primer, kurze ca. 17-25mer lange Oligonukleotide, bestimmt. Die Primer binden komplementär auf jeweils einem der beiden denaturierten DNA-Stränge und weisen mit ihren 3'-Enden auf einander zu. Die Primer für eine PCR wurden mit möglichst ähnlicher Schmelztemperatur, die zwischen 55 und 70 °C lag, gewählt. Die Schmelztemperatur ist dabei abhängig von der Länge und vom G/C-Gehalt des Oligonukleotids. Außerdem wurde beim Primerdesign darauf geachtet, dass sich weder Haarnadelstrukturen noch Primerdimere bilden können und dass GC-Primerenden zur Stabilisierung bevorzugt werden. Mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen, dNTPs und zwei Primer wird die DNA durch mehrfache Wiederholung eines dreistufigen Reaktionszyklus vervielfältigt. Dieser lässt sich wie folgt gliedern:

1. Denaturierung der DNA (meist 90-95 °C)
2. Hybridisierung der Primer (55-70 °C, je nach Primerpaar)
3. Polymerisation (65-74 °C), bei der die DNA-Polymerase den Primer komplementär zur Matrize verlängert

Die Amplifikation der DNA verlief in den meisten Fällen in 20 µl Volumen Ansätzen.

Tab. 9: Beispiel eines PCR-Ansatzes

Reagenzien	Menge
Red Taq Mix	10 µl
Primer for [10 pmol/µl] Primer rev [10 pmol/µl]	1 µl 1 µl
DNA	x µl (100-200 ng)
Steriles bidest. Aqua	auf 20 µl

Bei Klonierungsarbeiten wurde eine präparative PCR durchgeführt. Wenn möglich wurde hierbei die Proofreading-Polymerase „Phusion“ nach Herstellerangaben in einem 50 µl-Ansatz eingesetzt. Darin wurden ca. 500 ng der Ausgangs-DNA mit den spezifischen Primern eingesetzt. Das Programm ist in Tabelle 10 dargestellt.

Die Annealing-Temperatur und die Zyklenanzahl richteten sich nach den unterschiedlichen Primersequenzen (siehe Tab. 1). Am Ende wurden die PCR-Produkte auf 4 °C heruntergekühlt und bei -20 °C gelagert. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch DNA-Agarose-Gelelektrophorese auf Größe und Reinheit überprüft.

Tab. 10: Aufschlüsselung der einzelnen verwendeten PCR-Programme in ihre Teilschritte

	Taq				Phusion		
Initiale Denaturierung	2 min	95°C			10 s	98°C	
Denaturierung	30 s	95°C		30 Zyklen	1 s	98°C	
Annealing	30 s	x°C			5 s	x°C	
Elongation	30 s/1 kb	72°C			15 s/1 kb	72°C	
Finale Elongation	10 min	72°C			60 s	72°C	
Lagerung bis zur Verwendung	unbegrenzt	4°C			unbegrenzt	4°C	

3.3.5.1 Overlap-Extension-PCR

Die Overlap-Extension-PCR (Ho et al., 1989) wurde zur zielgerichteten Punktmutation innerhalb einer DNA-Sequenz eingesetzt und besteht aus drei Schritten, wie in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Im ersten Schritt erhält man ein PCR Produkt, welches von den Primern 1 (in dieser Arbeit: Raf_Anf_Xho1_for) und 2 (cRaf_shift_rev) flankiert wird und an seinem Ende die Mutation enthält. Im zweiten Schritt geschieht das gleiche mit dem Primerpaar 3 (cRaf_shift_for) und 4 (Raf_End+C_rev). Die zueinander komplementären Primer 2 und 3 sind dabei die mutagenen Primer, welche dieselbe Sequenzänderung in die jeweiligen PCR Produkte einführen. Die beiden PCR Ansätze wurden in einem Agarosegel überprüft, die Banden der erwartenden Größe ausgeschnitten und eluiert. Beide Amplifikate können in der folgenden Fusions-PCR an ihren überlappenden Enden hybridisieren und die jeweiligen 3'-Enden werden von der Phusion Polymerase aufgefüllt. Diese fusionierten DNA-Fragmente dienen als Matrize für die letzte PCR, in welcher die äußeren Primer 1 und 4 eingesetzt werden. Die Einführung der Punktmutation in die Zielsequenz wurde durch Testrestriktion sowie Sequenzierung des entsprechenden Bereiches bestätigt. Im Anschluss konnte die fusionierte DNA in einen Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert werden.

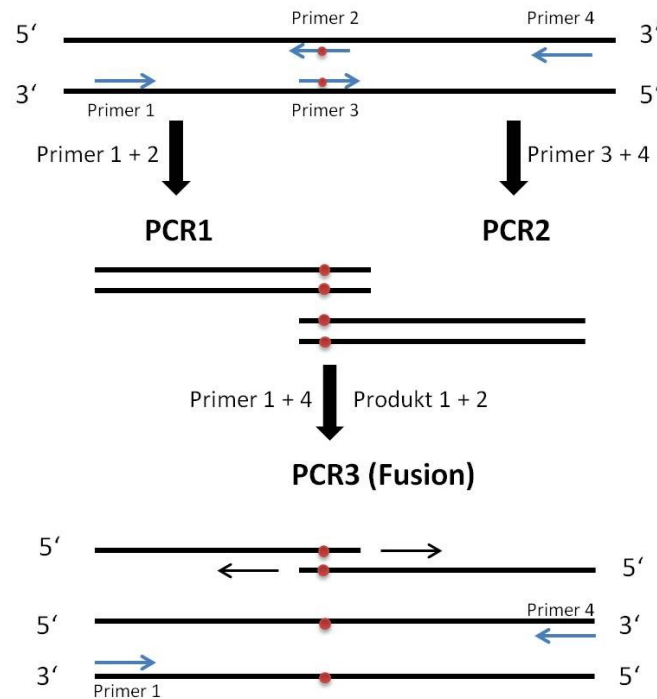


Abb. 6: **Schematischer Ablauf der Overlap-Extension-PCR.** Zunächst wird jeweils eine PCR mit Primerpaar 1 u. 2 sowie mit Primerpaar 3 u. 4 durchgeführt, wobei die zueinander komplementären Primer 2 u. 3 die Punktmutation einführen. Danach folgt die Fusions-PCR, in der die beiden eingesetzten PCR Produkte an ihren komplementären Enden hybridisieren können. Die DNA Polymerase verlängert die 3'-Enden und durch Zugabe der Primer 1 u. 4 kann die mutierte DNA amplifiziert werden.

Tab. 11: Präparativer Ansatz für eine Overlap-Extension-PCR

PCR 1 + 2		PCR 3 (Fusion)	
Reagenzien	Menge	Reagenzien	Menge
Phusion Mix	50 µl	Phusion Mix	25 µl
Primer 1 bzw. 3 [10 pmol/µl]	5 µl	Primer 1 [10 pmol/µl]	2,5 µl
Primer 2 bzw. 4 [10 pmol/µl]	5 µl	Primer 4 [10 pmol/µl]	2,5 µl
DNA	x µl (750-1000 ng)	DNA aus PCR 1	x µl (100-200 ng)
		DNA aus PCR 2	x µl (100-200 ng)
Steriles bidest. Aqua	auf 100 µl	Steriles bidest. Aqua	auf 50 µl

Tab. 12: PCR-Programm für Overlap-Extension-PCR

PCR 1 + 2			PCR 3 (Fusion)		
Zeit	Temperatur	Wiederholungen	Zeit	Temperatur	Wiederholungen
120 s	95°C	1x	120 s	98°C	1x
30 s	95°C	30x	30 s	98°C	35x
30 s	59°C		30 s	62°C	
90 s	72°C		90 s	72°C	
300 s	72°C	1x	600 s	72°C	1x
∞	4°C	1x	∞	4°C	1x

3.3.5.2 Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR wurde zur schnellen Überprüfung von Bakterienklonen durchgeführt. Hierzu wurde nach erfolgter Transformation (siehe Abschnitt 3.3.11.1) Zellmaterial von *E. coli* Kolonien mit einer kleinen sterilen Pipettenspitze aufgenommen und direkt in einen 20 µl PCR-Ansatz gegeben. Mit derselben Spitze wurde außerdem eine 5 ml TB- oder LB-Flüssigmedium, welche ein entsprechendes Selektionsantibiotikum beinhaltete, angeimpft. Der PCR-Reaktionsansatz wurde auf einem Agarosegel analysiert und bei positivem Ergebnis konnte mit der zugehörigen Bakterienkultur eine Plasmid-Präparation angefertigt werden.

3.3.6 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde mithilfe des „Verso™ cDNA“-Kit von ABgene (Hamburg) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Für die Reaktion wurden je 1 µg RNA eingesetzt, mit RNase-freiem Wasser auf 11 µl aufgefüllt und für 5 min auf 70°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA zu vermeiden. Danach wurde der Ansatz sofort auf Eis gelagert und die restlichen Komponenten für die reverse Transkription hinzugefügt, so dass ein Endvolumen von 20 µl zustande kam. Als Primer wurde der Oligo dT-Primer gewählt, der an Poly-A-Enden der RNA bindet. Die cDNA-Synthese fand für 60 min bei 42 °C statt, es folgte die Inaktivierung der Enzyme für 2 min bei 95 °C. Die synthetisierte cDNA konnte als Matrize für darauffolgende PCRs eingesetzt werden.

3.3.7 DNA-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wandert die DNA mit einer Geschwindigkeit durch die Agarosematrix, die proportional zum negativen Logarithmus der Länge des DNA-Fragments ist. In dieser Arbeit wurde die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente mit 1-2 %-igen (w/v) Agarosegelen in 1x TAE durchgeführt.

Falls die DNA-Proben nicht schon nach einer PCR durch die RedTaqTM farblich erkennbar und beschwert worden waren, wurden sie vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit 1/10 Vol. 10x DNA-Ladepuffer versetzt. Durch die enthaltene Saccharose, welches die Dichte der DNA-Proben erhöht, sanken die DNA-Proben in den Taschen nach unten. Außerdem enthielt der DNA-Ladepuffer Bromphenolblau, ein Farbstoff, der, abhängig von der Agarosekonzentration, einer Fragmentgröße zwischen 100-300 bp entspricht, und als Abschätzung der Wanderungsgeschwindigkeit dient. Als Molekulargewichtsstandard wurde entweder eine 100 bp oder 1 kb DNA-Leiter verwendet. Nach dem Auftragen der DNA-Proben erfolgte die elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel bei einer konstanten Spannung von bis zu 70 V (kleine Gelkammer) oder bis zu 110 V (mittlere Gelkammer). Mithilfe des DNA-Farbstoffs „GelStarTM“ (Biozym) konnte die elektrophoretisch aufgetrennte DNA unter UV-Licht (bei 312 nm) des Geldokumentationssystems Quantum ST4 (Vilber Lourmat) sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

3.3.8 Reinigung von PCR-Fragmenten

Mithilfe des „QIAquick PCR Purification“-Kits (QIAGEN) wurden PCR-Produkte von Enzymen, Primern, nicht verbrauchten Nukleotiden und Salzen gereinigt, um für Restriktionsverdau, Klonierungen sowie Sequenzierungen verwendbar zu sein. Dabei wurde nach Herstellerangaben die DNA unter sauren Bedingungen in einem Hochsalzpuffer an eine Silica-Membran gebunden und nach dem Waschen mit 30 µl A. dest von der Säule eluiert.

3.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten (Gelelution)

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente einer PCR oder Restriktion können mittels Gelelution isoliert werden. Zur Extraktion von DNA aus einem Agarosegel wurde die DNA durch die Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht, das gewünschte DNA-Fragment entsprechend seiner Laufhöhe identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction-Kit“ der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers. Dabei

beruht die Isolierung aus dem Gel auf einer chemischen und hitzevermittelten Auflösung der Agarose. Nachdem die DNA an eine Silica-Membransäule gebunden und mehrfach gewaschen wurde, erfolgte die Elution mit 20-50 µl A. dest.

3.3.10 DNA-Sequenzierung

Für Sequenzanalysen wurden 100 ng DNA (Plasmid oder PCR Produkt) mit 100 pg Primer gemischt und mit A. dest auf ein Endvolumen von 10 µl gefüllt. Anschließend wurden die Proben an die Firma LGC (Berlin) oder GATC (Köln) geschickt, die die enzymatische Sequenzierungen basierend auf dem Prinzip der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger durchführten (Sanger et al., 1977). Die Programme „FinchTV“ und „Serial Cloner“ wurden zur Auswertung der erhaltenen Daten benutzt. Zeigte ein Klon nach der Sequenzierung eine 100%-ige Übereinstimmung mit der in den Datenbanken vorhandenen DNA-Sequenz, wurde der rekombinante Vektor einer Midi-Präparation (Abschnitt 3.3.1) unterzogen.

3.3.11 Klonierung

3.3.11.1 Transformation von Bakterien

Zur Transformation wurden kommerziell erworbene chemisch kompetente *E. coli* des Stammes NEB 5- α (DH5- α Derivat) oder NEB 10- β (DH10- β Derivat) verwendet. Zunächst wurde ein 50 µl Bakterien-Aliquot auf Eis aufgetaut, danach ca. 100 ng der zu transformierenden DNA zugegeben und vorsichtig gemischt. Es folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt auf Eis, gefolgt von einem 30-sekündigem Hitzeschock bei 42°C. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis, wurde dem Ansatz 950 µl S.O.C.-Medium zugegeben und eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Dann wurden sowohl unverdünnte als auch verschiedene Verdünnungen (mit LB-Medium) der transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Auf den Selektions-Agarplatten können, wegen des im transformierten Plasmid enthaltenen Resistenzgens, nur jene Bakterien wachsen, welche das Plasmid aufgenommen haben. Am nächsten Tag konnten Einzelkolonien gepickt und zum Animpfen einer Kultur für eine Plasmidpräparation verwendet werden.

3.3.11.2 Herstellung von Glycerinkulturen

Zur Langzeitlagerung wurden transformierte oder nicht-transformierte *E. coli* in Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden 500 µl steriles Glycerin und 500 µl einer entsprechend gewachsenen Bakterienkultur gemischt und anschließend bei -80 °C tiefgefroren.

3.3.11.3 Restriktionsverdau von DNA

Die Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen wurde sowohl im Rahmen einer Klonierung als auch zur Verifizierung der Plasmid-DNA-Sequenzen nach der Transformation durchgeführt. Restriktionsendonukleasen erkennen spezifisch Sequenzen innerhalb eines DNA-Doppelstranges und spalten diese hydrolytisch. Für diese Spaltreaktionen wurden die Herstellerangaben von New England Biolabs (Frankfurt) beachtet.

Für eine Klonierungsrestriktion (präparativer Ansatz) wurden 2 Units des Restriktionsenzym bzw. der Restriktionsenzyme mit 5 µl des zugehörigen 10x Enzym-Reaktionspuffers und mindestens 3 µg der zu spaltenden DNA vermischt und mit destilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde bei normalen Enzymen eine Stunde, bei High Fidelity Enzymen 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Je nach Enzym erfolgte nach der Restriktion noch eine Abstoppreaktion für 10 min bei 65°C. Die Auswertung der Restriktion erfolgte im Agarosegel. Bei positivem Ergebnis konnte mit der Gelelution (Abschnitt 3.3.10) weiterverfahren werden.

Für eine Testrestriktion wurden ca. 0,5 µg DNA in 2 µl des vom Hersteller angegebenen Puffers mit 0,5 Units Enzym angesetzt und durch Aqua dest. auf ein Endvolumen von 20 µl gefüllt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C (bei High Fidelity Enzymen 10 min) wurde der Verdau ohne Abstoppreaktion mit 2 µl DNA-Ladepuffer auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.3.11.4 Dephosphorylierung

Um eine spontane Religation des Vektors ohne Aufnahme der einzufügenden DNA (Insert) zu verhindern, wurden das geschnittene Plasmid mit dem Enzym Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert. Dem Restriktionsansatz wurden 1 µl CIP (Calf-intestine phosphatase) und der zugehörige 10x Buffer zugegeben, danach 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer Hitzeinaktivierung bei 65 °C konnte der Ansatz für die Ligation (Abschnitt 3.3.11.6) verwendet werden.

3.3.11.5 Auffüllreaktion

Die T4 DNA-Polymerase katalysiert die DNA Synthese in 5'→3' Richtung und ermöglicht das Auffüllen von 5'-Überhängen. Durch die ebenfalls vorhandene 3'→5' Exonuklease Aktivität dieses Enzyms können zusätzlich 3'-Überhänge entfernt werden. Diese Polymerase wurde eingesetzt um nicht kompatible DNA-Enden nach Restriktionen zu glätten und danach miteinander verknüpfen zu können. In dem Ansatz wurden 250 ng/μl DNA mit 1 μl dNTPs, 1x T4 DNA Polymerase Puffer sowie 1-3 Units DNA Polymerase/μg für 15 min bei 12 °C inkubiert. Die Hitze-Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 20 min bei 75 °C.

3.3.11.6 Ligation

Für die Verknüpfung von geschnittenem Plasmid und einzufügendem DNA-Insert benötigt man die Bildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen 5'-Phosphatrest und 3'-Hydroxylgruppe. In dieser Arbeit wurde hierfür die DNA-Ligase des T4-Phagen des „Rapid DNA Ligation Kit“ der Firma Roche (Mannheim) verwendet, welche in Gegenwart von ATP und Mg²⁺ Phosphodiesterbindungen katalysiert. Nach Herstellerprotokoll wurden Vektor-DNA und Insert-DNA im Verhältnis 1:3 gemischt und mit DNA-Dilutionspuffer zu einem Gesamtvolumen von 10 μl versehen. Dazu werden 10 μl Ligations-Reaktionspuffer gegeben und schließlich 1 μl T4 DNA Ligase hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde für 5-30 min bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 μl dieses Ansatzes für die Transformation in kompetente Bakterien eingesetzt (Abschnitt 3.3.11.1).

3.3.11.7 Klonierungen mit dem QIAGEN PCR Cloning Kit

Mithilfe des QIAGEN PCR Cloning Kits wurde ein gewünschtes DNA-Insert in den pDrive Vektor zwischenkloniert, um so geeignete Restriktionsstellen für die weitere Klonierung zur Verfügung zu haben. Hierbei handelt es sich um eine sogenannte UA-Klonierung. Das Kit beinhaltet einen linearen Vektor mit Uracil-Überhang, an den ein PCR-Produkt, welches zuvor durch die Taq-Polymerase automatisch einen Adenin-Überhang erhalten hatte, sich leicht anlagern und ligieren lässt. Durch die zusätzlichen Restriktionsstellen des pDrive-Vektors wurde die Möglichkeit geboten ohne komplizierte Einfügung neuer Schnittstellen das zu klonierende DNA-Stück in den gewünschten Endvektor zu überführen.

Dabei wurde zunächst durch PCR die zu klonierende Sequenz mithilfe des RedTaq-Mixes vervielfältigt. Dann wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und nach Herstellerangaben in den pDrive-Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert.

3.4 Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie

3.4.1 Immunfluoreszenzfärbung eukaryotischer Zellen

Diese Methode dient zur Untersuchung der Lokalisation von Proteinen in einer Zelle. Zur immunfluoreszenten Markierung wurden Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden nach erreichter optischer Konfluenz und evtl. Behandlung mit PBS gewaschen und danach für 10 min in 4 % (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, wobei der dritte Waschvorgang mit 0,5 % Triton X-100-Lösung erfolgen konnte. Dann wurden die Zellen 30 min in der Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, und mit einem gegen das zu untersuchende Protein gerichteten Erstantikörper (1:100-1:500) für eine Stunde behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper (1:1000), der den Erstantikörper spezifisch erkennt, für eine Stunde unter Lichtausschluss inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte zusätzlich je nach Bedarf eine Zellkernfärbung mit DAPI (1:1000) für 5 min. Es wurde wieder dreimal mit PBS gewaschen und abschließend einmal mit A. dest. Danach wurden die Zellen auf den Deckgläsern mit *Dako fluorescent mounting medium* auf Objektträgern eingedeckt und nach dem Trocknen bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung bei 4 °C aufbewahrt.

3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Während zellbiologischen Experimenten wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop protokolliert. Für allgemeine Übersichtsbilder wurde das Olympus IX30 sowie die zugehörige Analysesoftware Analysis genutzt. Das Anregungslicht wurde mittels Quecksilberdampfampe erzeugt und mit Filtersets für die entsprechende Farbe zu der jeweils passenden Wellenlänge gefiltert (grün: 470 nm, rot: 620 nm, blau: 350 nm).

3.4.2.1 Arbeiten mit dem Mikroskopiesystem Zeiss Observer Z1

Mit Hilfe des Zeiss Observer Z1 wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Quantifizierung und Live-Cell Imaging durchgeführt. Das System besitzt eine integrierte Inkubationskammer, so dass man sowohl Temperatur als auch CO₂-Gehalt zur Analyse lebender Zellen einstellen kann. Ein weiterer Vorteil ist der computergesteuerte Probentisch und Filterrevolver, so dass mithilfe des Programms automatisch exakte Positionen mehrfach über einen längeren Zeitraum mit unterschiedlichen Filtern angesteuert werden können. Für Live-Cell Imaging Aufnahmen wurden die Kultivierungsparameter auf 37 °C und 6 % CO₂

eingestellt. Über einen bestimmten Zeitraum wurden Fluoreszenz- und Phasenkontrastfotos des gewünschten Bildausschnitts in Abständen von 2-3 min aufgenommen. Um einen größeren Bildausschnitt bei gleicher Auflösung analysieren zu können, wurden Mosaikbilder zu 2 x 2 Bildern um das Zentrum ausgewählt. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der assoziierten Aufnahme- und Analysesoftware AxioVision sowie die Weiterverarbeitung mit Microsoft Excel. Die erhaltenen Bilddaten konnten mit Hilfe dieser Software u. a. als Film betrachtet werden. Zur Analyse des Gesamtfluoreszenzsignals über die Zeit wurde je nach Bildqualität ein Bereich oder das gesamte Foto markiert und durch AxioVision das mittlere Fluoreszenzsignal zu den jeweiligen Zeitpunkten erhalten.

2.4.2.2 Konfokales Mikroskopieren

Bei der Konfokalmikroskopie gelangt nur Fluoreszenzlicht eines sehr kleinen Teils der angeregten Probe in das Mikroskop. Dies hat den Vorteil, dass Hintergrundsignale und fluoreszierende Bestandteile aus höher oder tiefer liegenden Schichten der Probe ausgeblendet werden können. Die Aufnahmen für diese Arbeit entstanden in freundlicher Zusammenarbeit mit dem Institut für physikalische und theoretische Chemie in Frankfurt. Dort wurde mit dem „LSM710“ (Zeiss, Jena) mit Plan-APOchromat unter der Verwendung eines 63x/1,4 Öl-Immersion-Objektivs und eines Helium-Neon 543 nm Lasers sowie Coherent Cube 402 nm Laser gearbeitet. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der assoziierten Aufnahme- und Analysesoftware ZEN. Mithilfe dieser Software konnten übereinander liegenden Zellschichten durchgescannt und die erhaltenen Einzelbilder zu einem dreidimensionalen Bild rekonstruiert werden. Die Bilder besitzen eine Pixel-Größe von 80 nm und wurden bei einer dwell time von ~20 μ s/px mit 20 % Laserleistung aufgenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Konstruktion der Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zweckmäßige Transfektionsvektoren hergestellt werden, welche anschließend zur direkten Detektion der Interaktion zwischen Raf und Ras verwendet werden können. Hierzu wurde der kodierende Abschnitt von CRAF an ein Fluorophor fusioniert, welches sich in einem zum Transfizieren eukaryotischer Zellen geeigneten Expressionsvektor befand. Zur Konstruktion dieser Vektoren wurde sowohl das grün fluoreszierende Protein EGFP als auch das rot fluoreszierende mCherry gewählt.

4.1.1 pDisplay-EGFP-cRaf

Die Klonierung des Vektors pDisplay-EGFP-cRaf erfolgte über mehrere Schritte. Zu Beginn lag die CDS für CRAF, welche 1947 Bp lang ist, im pcDNA3 Vektor sowie EGFP (720 Bp) in pDisplay vor. Die DNA-Sequenz des cRaf-Gens wurde zunächst mit den Restriktionsenzymen XhoI und KpnI aus dem Vektor pcDNA3 herausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurde das gewünschte DNA-Teilstück einer PCR mit Taq-Polymerase unterzogen, um an den 3'-Enden Adenin-Überhänge für eine UA-Klonierung zu erhalten. Nach erneuter Aufreinigung wurde dann die DNA-Sequenz mithilfe des PCR Cloning Kits von Qiagen in den Zwischenvektor pDrive kloniert. Die Kontrolle der Klonierung erfolgte zum einen durch Kolonie-PCR mit dem Primerpaar cRaf_for/cRaf_rev und zum anderen durch eine Testrestriktion mit EcoRI, welches das Insert komplett aus dem Vektor herausfallen lässt. Nach anschließender Agarosegelelektrophorese konnte die Ausbeute an positiven Klonen mit 60 % (n=10) angegeben werden. Es wurden zwei der positiv getesteten Klone, pDrive-cRaf-Klon 9 und 10, zum Sequenzieren an die Firma LGC (Berlin) geschickt. Die Sequenzanalyse ergab, dass das Insert in Klon 9 in antisense Richtung und in Klon 10 in sense Richtung orientiert ist.

Im nächsten Schritt wurde pDrive-cRaf-Klon 10 sowie pDisplay-EGFP mit den Restriktionsenzymen PstI und XhoI hydrolysiert. Der Vektor pDisplay-EGFP erhielt außerdem eine Dephosphorylierung mittels CIP, um eine Selbstligation zu vermeiden. Nach der Aufreinigung erfolgten die Ligation des Inserts CRAF mit dem Vektor pDisplay-EGFP und die sofortige Transformation in *E. coli*. Der Erfolg der Klonierung wurde durch eine Testrestriktion überprüft (siehe Abbildung 7) und anschließend wurden zwei dieser positiv getesteten Klone, pDisplay-EGFP-cRaf-Klon 1 und 4, zum Sequenzieren der relevanten

Sequenz an LGC gesendet. Die Auswertung der Sequenzdaten ergab, dass beide Klone die fehlerfreie *craf*-Sequenz im Leserahmen hinter der DNA-Sequenz für EGFP aufweisen.

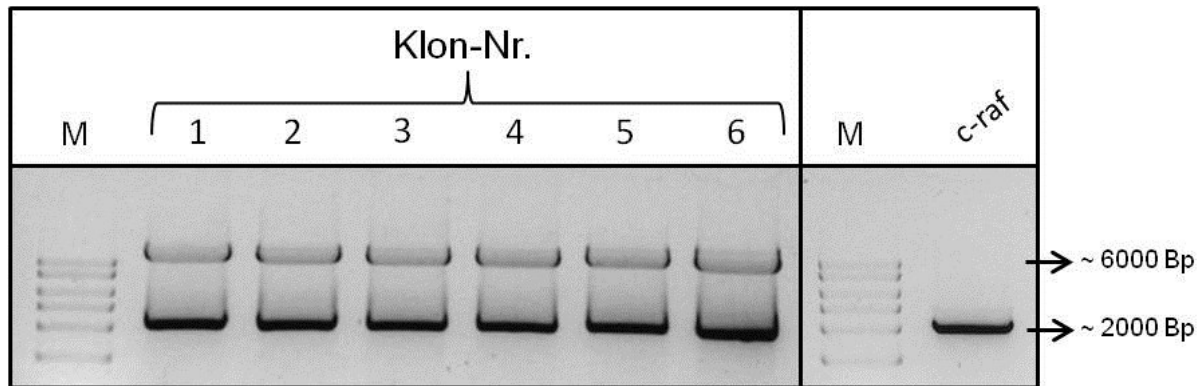
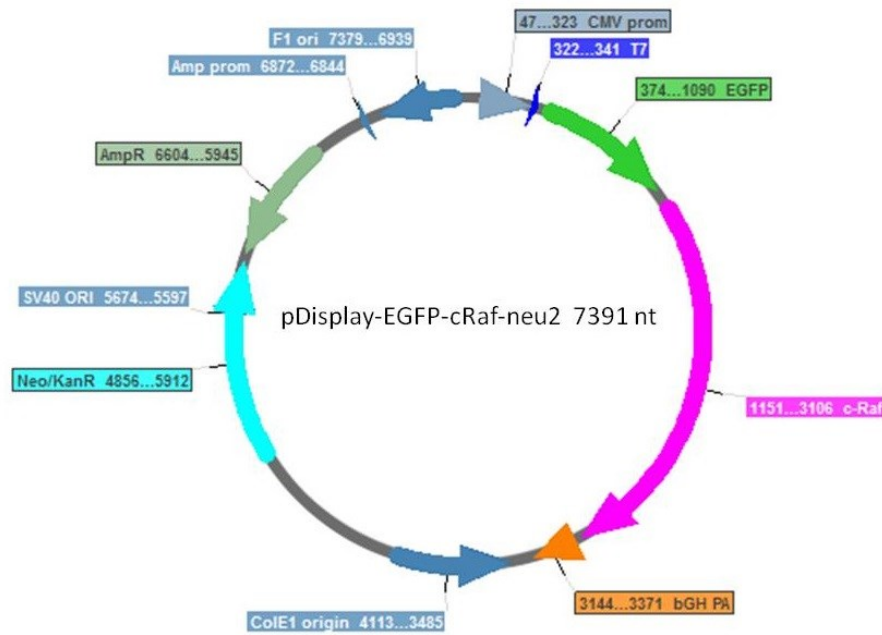


Abb. 7: **Restriktionsverdau von pDisplay-EGFP-cRaf Klonen (links) und amplifizierte DNA von c-raf (rechts).** Zur Überprüfung des Klonierungserfolges wurden Testrestriktionen durchgeführt. Der Verdau der Klon-Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen PstI und XhoI bei 37°C für 1 h durchgeführt. Die durch PCR vervielfältigte DNA-Sequenz von c-raf diente zur Größenkontrolle der Banden. In Spur M befindet sich die 100-5000 Bp DNA-Leiter.

Um die in den pDisplay-Vektoren enthaltene Membranverankerungssequenz *Igk-chain leader sequence* zu entfernen, wurde der neu klonierte Vektor pDisplay-EGFP-cRaf Klon 1 durch den Einsatz der Restriktionsenzyme KpnI und PspOMI gekürzt. Da aus der Verwendung dieses Enzympaares keine kompatiblen Enden entstanden, mussten die überhängenden Enden des aufgereinigten Restriktionprodukts mithilfe der T4-Polymerase geglättet werden, um anschließend eine Blunt End Ligation durchführen zu können. Danach erfolgte wiederum die Transformation in kompetente *E. coli* Bakterien. Der Klonierungserfolg wurde erneut durch eine Testrestriktion, anhand der unterschiedlichen Anzahl von BglII-Schnittstellen nach erfolgreicher Klonierung, und anschließender Sequenzierung bestätigt.

Für die weiteren Arbeiten wurde der finale Vektor pDisplay-EGFP-cRaf-neu Klon 2 verwendet (siehe Abbildung 8). Dieser hat eine Größe von 7391 Bp und besitzt einen CMV- und T7-Promotor, gefolgt von der egfp- und CRAF-Sequenz. Des Weiteren gehört ein Ampicillin- sowie Neomycin-Resistenzgen zur Ausstattung des Vektorkonstrukts.



5'-egfp ...AAG CCG CGG CTG CAG ACG CGT TAC GTA TCG GAT CCA GAA TTC
GTG ATT CGC CAC CAT GGG ATC ATG... cRaf-3'

Abb. 8: Vektorkarte und Sequenzausschnitt des Transfektionsvektors pDisplay-EGFP-cRaf-neu2. Anhand von Pfeilen sind die wichtigsten codierenden Bereiche des Vektors und deren Richtung dargestellt. Der Sequenzausschnitt zeigt den Linkerbereich zwischen der egfp- und CRAF-Sequenz.

4.1.2 pcRaf-mCherry-N1

Die Erstellung des Vektors pcRaf-mCherry-N1 erfolgte ebenfalls über eine mehrstufige Entwicklung, wobei die ersten Schritte, nämlich die Gewinnung des CRAF-Inserts und dessen Zwischenklonierung in den pDrive Vektor, mit den oben bereits in Kapitel 4.1.1 aufgeführten Erläuterungen identisch sind. Weitergearbeitet wurde hier mit dem pDrive-cRaf-Klon 9, welcher mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI geschnitten wurde. Ebenso wurde der Basisvektor pmCherry-N1, welcher die CDS für mcherry (711 Bp) beinhaltete, mit den genannten Enzymen verdaut und zusätzlich mit CIP behandelt, wodurch eine Religation verhindert werden sollte. Nach erfolgter Aufreinigung wurden die Ligation der beiden Komponenten und die Transformation in *E. coli* durchgeführt. Die Kontrolle der Klonierung fand durch eine Testrestriktion statt. Danach wurden zwei der positiv getesteten Klone zum Sequenzieren des relevanten Sequenzabschnittes an die Firma LGC (Berlin) gesendet. Die Sequenzdatenanalyse ergab, dass die CRAF-Sequenz in beiden Klonen zwar vor der mcherry DNA-Sequenz integriert wurde, allerdings nicht im richtigen Leserahmen, so dass kein

Fusionsprotein entstehen konnte. Desweiteren befand sich zwischen dem kodierenden Abschnitt für CRAF und mcherry ein Stopcodon.

Mithilfe einer Mutagenese-PCR wurden beide Probleme gelöst, indem über einen Primer ein zusätzliches Nukleotid (CTP) an der gewünschten Stelle im Linkerbereich eingebaut wurde. Nach erneutem Durchlauf des Klonierungsprozesses und anschließender Sequenzüberprüfung von mehreren, durch vorherige Restriktion positiv getesteter Klone (siehe Abbildung 10), wurde festgestellt, dass das Stopcodon substituiert und der Leserahmen zwischen den Sequenzabschnitten von CRAF und mcherry somit korrigiert worden ist. Durch diese Korrekturarbeiten wurde aber nun ein zusätzliches Adeninnukleotid an Stelle 984 der neu klonierten pcRaf-mCherry-N1 Vektoren eingebaut, welches einen *Frameshift* des Leserahmens verursachte. Diese Insertion konnte mittels Overlap-Extension-PCR der cRaf-DNA mit dem punktmutationstragenden Primerpaar c-Raf_shift_for/c-Raf_shift_rev erfolgreich, nach dem in Kapitel 3.3.5.1 beschriebenen Prinzip, entfernt werden. In Abbildung 9 sind die amplifizierten DNA-Fragmente aus den drei Teilschritten der OE-PCR im Agarosegelbild zu sehen. Das Endprodukt der OE-PCR wurde durch Sequenzierung überprüft, bevor dieses zur weiteren Klonierung verwendet wurde.

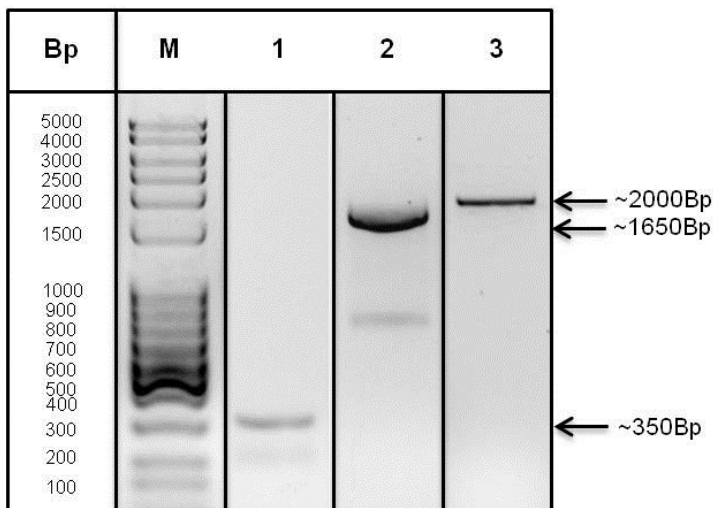


Abb. 9: **Kontrolle der nach OE-PCR erhaltenen DNA-Fragmente.** Spur M: DNA Leiter Mix 100-5000 Bp ; Spur 1: DNA-Fragment aus OE-PCR 1; Spur 2: DNA-Fragment aus OE-PCR 2; Spur 3: fusionierte DNA-Fragmente aus OE-PCR 3

Im letzten Klonierungsschritt wurde die Fusions-PCR-DNA von cRaf mit dem Vektor pmCherry-N1 durch Ligation und Transformation in *E. coli* abgeschlossen und der erhaltene, durch Restriktion als positiv getestete Klon pcRaf-shift-mCherry-N1 (siehe Abbildung 10) anschließend zur Firma GATC (Köln) zum Sequenzieren geschickt.

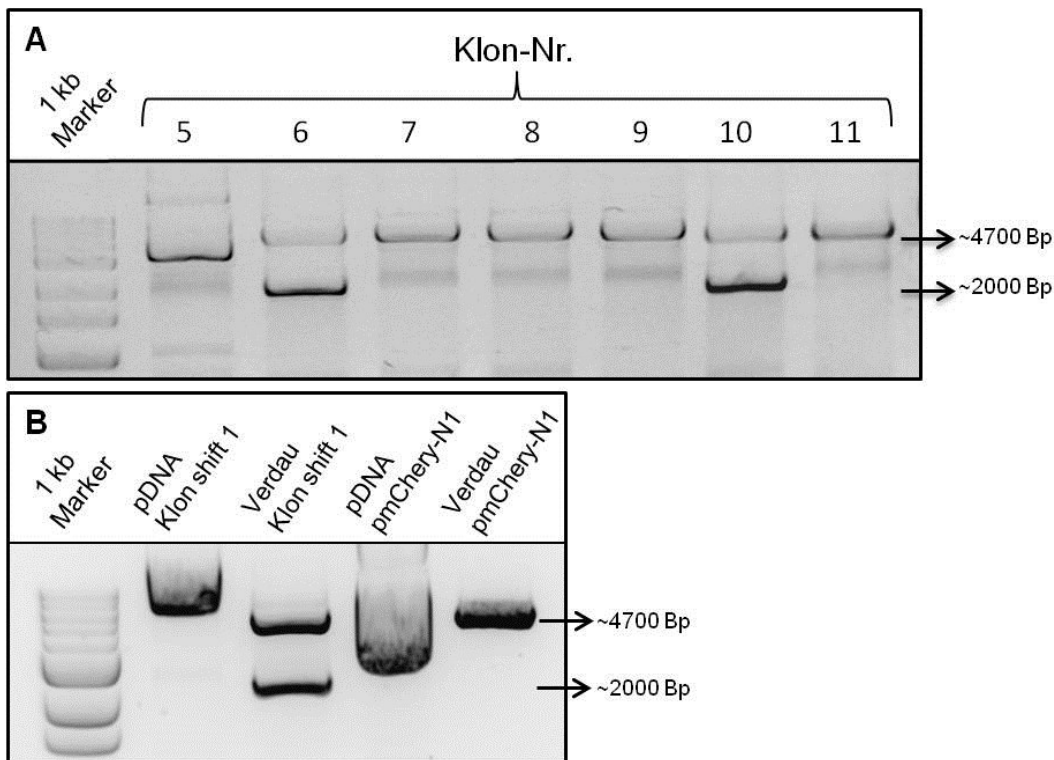
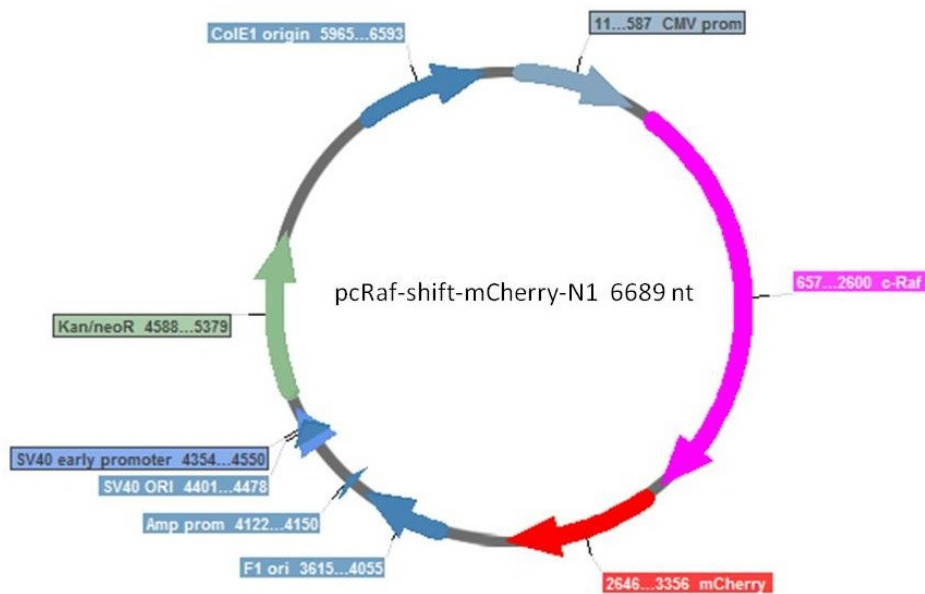


Abb. 10: **Restriktionsverdau von pcRaf-mCherry-N1 Klonen.** Zur Überprüfung des Klonierungserfolges wurden Testrestriktionen durchgeführt. Der Verdau der Klon-Plasmid-DNA sowie des leeren Vektors pmCherry-N1, welcher als Kontrolle diente, wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI bei 37 °C für 1 h durchgeführt. **A:** Überprüfung der Klonierung nach Mutagenese-PCR; **B:** Überprüfung der Klonierung nach OE-PCR

Für die weiteren Arbeiten wurde der finale Vektor pcRaf-shift-mCherry-N1 verwendet (siehe Abbildung 11). Dabei handelt es sich um einen 6689 Bp großen Transfektionsvektor, welcher einen CMV-Promotor besitzt, gefolgt von CRAF und mcherry. Der Vektor besitzt außerdem ein Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen.



5'-craf ...TTC GTT CGG ACA TAC GAA TCA CGA ATT CTG GAT CCA CCG GTC
GCC ACC ATG... mcherry-3'

Abb. 11: Vektorkarte und Sequenzausschnitt des Transfektionsvektors pcRaf-shift-mCherry-N1. Durch Pfeile sind die wichtigsten codierenden Abschnitte des Vektors und deren Richtung hervorgehoben. Der Sequenzausschnitt zeigt den Übergangsbereich zwischen CRAF und mcherry.

4.2 Herstellung von Raf-detektierbaren Zellen

Für die Aufstellung eines zellulären Testsystems sollten mithilfe der konstruierten Transfektionsvektoren der Ras/Raf-Signalweg in den Zelllinien MDCK und MDCK-F3 mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Die Zielsetzung beinhaltete dementsprechend die Generierung von stabil transfizierten Zelllinien, welche dauerhaft ein c-Raf-Fluorophor-Fusionsprotein als Targetprotein exprimieren.

4.2.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz durch transiente Transfektion

Da MDCK-Zellen als schwierig zu transfizieren gelten, wurde zunächst die Transfektionseffizienz mittels des transient transfizierten Kontrollvektors pDisplay-EGFP ermittelt. Die Zellen mit integriertem Vektor sollten unter dem Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszieren. Hierzu wurden verschiedene kommerzielle Lipofektionskits mit unterschiedlichen DNA:Reagenz-Verhältnissen getestet, welche an den vorgeschlagenen Protokollen der Hersteller orientiert sind.

Tab. 13: **Ermittlung der prozentualen Transfektionseffizienz von MDCK Zellen.** MDCK Zellen wurden mit verschiedenen Lipofektionskits und unterschiedlicher DNA:Reagenz-Menge getestet. Nach 24 h, 48 h und 72 h Nachinkubationszeit wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Name des Kits	DNA [μ g]	Reagenz [μ g]	Zeit [h]	Transfektionseffizienz [%]
Rotifect Plus	0,25	2	24	0
			48	< 1
			72	< 1
	0,5	2	24	< 1
			48	< 5
			72	< 5
Metafectene	0,5	1,5	24	< 1
			48	< 5
			72	< 5
	0,5	3,5	24	< 1
			48	< 1
			72	< 1
Attractene	0,4	1,5	24	< 5
			48	< 5
			72	< 5
	0,4	1	24	< 5
			48	< 5
			72	< 5
Effectene	0,25	5	24	< 5
			48	< 5
			72	< 5
	0,5	5	24	< 5
			48	< 10
			72	< 10

Es wurden jeweils $2,5 \times 10^4$ Zellen in 24-well-Platten ausgesät und bei einer ungefähren Konfluenz von 70 % transfiziert. Nach 16-24 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um den Transfektionsmix von den Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Um mögliche Fehlerquellen auszuschließen, wurde der Versuch dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. In die Tabelle 13 wurde dabei das jeweils beste Transfektionsergebnis der drei Versuche eingetragen sowie die eingesetzten DNA-, Reagenzkonzentrationen und Inkubationszeiten. Als Kontrolle wurde das jeweilige Reagenz ohne DNA auf die Zellen gegeben.

Es stellte sich heraus, dass die Transfektionseffizienz der MDCK Zellen, welche mit dem Kit Effectene (Qiagen) unter Verwendung von 0,5 µg Plasmid-DNA mit ca. 10 % nach 48 und 72 Stunden transfiziert wurden am höchsten war. Somit wurden diese Parameter für die weiteren Transfektionen der Zelllinie MDCK als auch ihrer verwandten Zelllinie MDCK-F3 verwendet.

4.2.2 Ermittlung der zytotoxischen G418-Konzentration für MDCK und MDCK-F3 Zellen

Im Vorfeld der stabilen Transfektion wurde die zytotoxische Geneticin (G418)-Konzentration bestimmt. G418 ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das irreversibel an die 80S Ribosomenuntereinheit bindet und damit die Proteinbiosynthese der Zellen hemmt. So können normalerweise nur die Zellen mit stabil integriertem Vektor überleben, denn dieser beinhaltet das Resistenzgen Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase (ADH), welches auf Plasmidvektoren als Kan/Neo-Resistenzgen bezeichnet wird und dessen Protein u. a. das Neomycinanalogon G418 phosphoryliert. Die untransfizierten Zellen hingegen, denen das Resistenzgen fehlt, können durch G418 leicht abgetötet werden.

In einer 24-well-Platte wurden jeweils die Hälfte der Wells mit 3×10^4 MDCK-Zellen und die andere Hälfte mit MDCK-F3 Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium mit G418-Konzentrationen von 100 µg/ml bis 1500 µg/ml zugegeben, ein Well blieb zur Kontrolle unbehandelt. Die Zellen wurden nach vier Tagen passagiert, in gleichem Maße ausgedünnt und wieder mit dem jeweiligen G418-haltigem Medium versorgt. Nach einer Inkubationszeit von zehn Tagen wurde mittels Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer ermittelt, ab welcher Konzentration die Zellen sterben. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, trat dieser Effekt bei den MDCK-Zellen ab einer Konzentration von 800 µg/ml G418 und bei den MDCK-F3 Zellen ab einer Konzentration von 400 µg/ml G418 auf. Zur Selektion der

transfizierten MDCK-Zellen wurde Medium mit einer Konzentration von 1 mg/ml G418 und für die MDCK-F3 Zellen von 500 µg/ml verwendet.

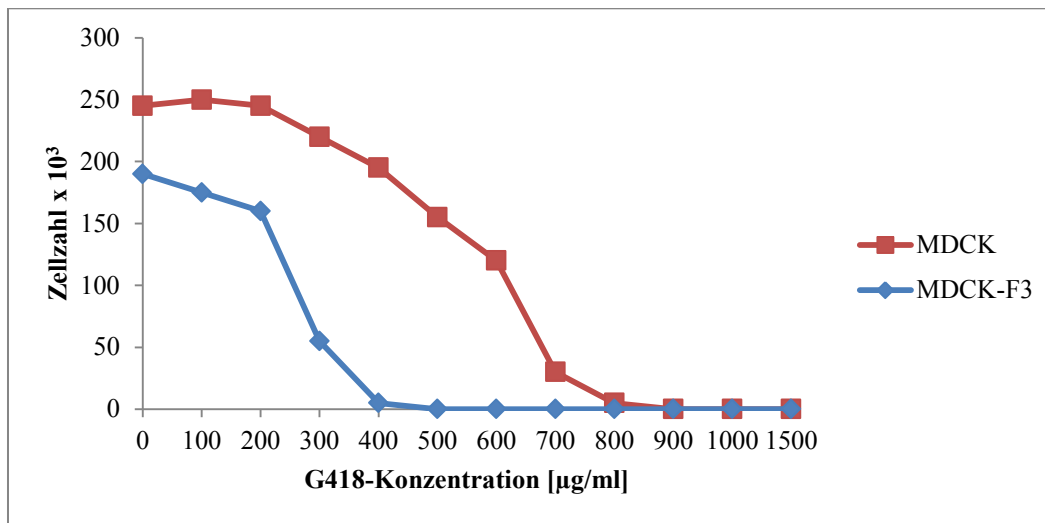


Abb. 12: Austestung der für die Selektion erforderlichen G418-Konzentration für MDCK bzw. MDCK-F3 Zellen. Die Zellen wurden in einer Dichte von 3×10^4 in einer 24-Well-Platte ausgesät und mit G418-Konzentrationen von 100-1500 µg/ml über einen Zeitraum von zehn Tagen behandelt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Anschließend wurden die lebenden Zellen gezählt.

4.2.3 Etablierung stabiler Klone

Die stabile Transfektion folgte dem Protokoll, welches zuvor aus den transienten Transfektionsversuchen gewonnen worden ist, mit dem Unterschied, dass die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit dem Antibiotikum G418 einem Selektionsdruck ausgesetzt wurden. Nach zwei bis drei Wochen wurden einzelne Kolonien, teils unter dem Fluoreszenzmikroskop, gepickt und in 96-well-Platten überführt. Dabei wurden die Klone nach Zeile und Spalte (A1-Z12) durchnummeriert. Wenn die Fläche des Wells optisch konfluent war, wurden die Zellen in eine nächstgrößere Well-Platte überführt bis ausreichend viele Zellen für weitere Versuche vorhanden waren.

Die gewonnenen klonalen Zelllinien mit dem pcRaf-shift-mCherry-N1 bzw. pDisplay-EGFP-cRaf-neu2 Transfektionsvektor wurden anschließend auf die Existenz des Fusionsproteins mittels PCR und Western Blot überprüft. Um in den Zellklonen die integrierte DNA zu identifizieren, wurde die gesamte Zell-DNA isoliert und PCRs mit angeglichenen DNA-Mengen angefertigt. Die verwendeten Primerpaare für egfp bzw. mcherry hybridisierten mit Sequenzabschnitten des in die MDCK und MDCK-F3 Zellen transfizierten Vektors pDisplay-EGFP-cRaf-neu2 bzw. pcRaf-shift-mCherry-N1 und amplifizierten auf der genomischen

DNA das EGFP- bzw. mCherry-Gen, so dass sich in beiden Fällen ein ca. 700 Bp großes Fragment ergab. Abbildung 13 zeigt eine Auswahl an getesteten Zellklonen. Man kann im Teilbild B erkennen, dass die Klone A1, A2 und E2 der Zelllinie MDCK, welche mit cRaf-mCherry transfiziert wurden, mcherry-positiv sind, wie auch die Klone A1, A2 und A5 der Zelllinie MDCK-F3, dabei gibt es jedoch Unterschiede in der Bandenstärke. Der Klon A5 zeigt unter den cRaf-mCherry-Klonen die stärkste Expression, gefolgt Klon E2. Im Teilbild A ist zu sehen, dass alle MDCK und MDCK-F3 Klone ein positives PCR-Ergebnis zeigen, jedoch kann man auch hier unterschiedliche Bandenintensitäten feststellen. Die EGFP-cRaf-Klone C1 und D5 exprimieren EGFP am stärksten. Als Kontrolle diente jeweils ein Zellklon, der mit dem Vektor pDisplay-EGFP bzw. pmCherry-N1 ohne Insert transfiziert wurde.

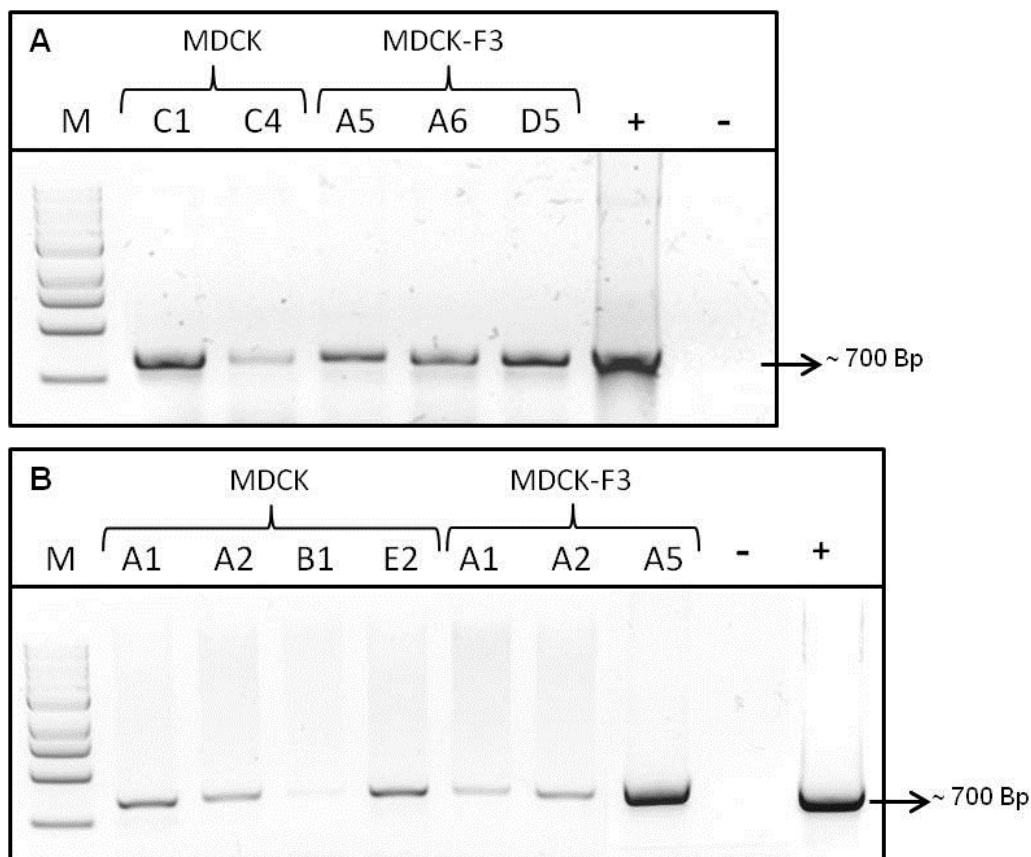


Abb. 13: **Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten.** Genomische DNA wurde aus, mit den Vektoren pDisplay-EGFP-cRaf-neu2 (A) und pcRaf-shift-mCherry-N1 (B), stabil transfizierten MDCK- sowie MDCK-F3-Klonen isoliert und PCRs zum Nachweis des 720 Bp großen egfp-Fragmentes (A) und des 711 Bp großen mcherry-Fragmentes (B) durchgeführt. Die Positivkontrolle beinhaltet die jeweilige pDNA des Vektorkonstruktes. Die Abbildung zeigt nur einen Teil der geprüften Klone.

Für den Nachweis des Fusionsproteins mittels Western Blot Analyse wurden Gesamtzellextrakte der MDCK und MDCK-F3 Klone hergestellt. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung und elektrophoretischen Auftrennung durch ein SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine auf eine Membran geblottet und mit einem spezifischen Primärantikörper gegen mCherry bzw. EGFP und einem passenden peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Banden wurden anschließend mittels ECL-Reagenz auf entsprechenden Filmen detektiert, eine Auswahl ist in Abbildung 14 zu sehen. Die Membranen wurden nach dieser ersten Detektion zusätzlich mit dem Antikörper β -Actin zur Kontrolle der Proteinbeladung inkubiert, die entsprechende Bande ist auf jedem Blot bei 45 kDa zu beobachten. Als Kontrolle diente wieder ein Zellklon, der mit dem Vektor pDisplay-EGFP bzw. pmCherry-N1 ohne Insert transfiziert wurde. Anhand des Molekulargewichtsmarkers konnten im Teilbild A für alle Zelllinien eine Bande bei 28 kDa identifiziert werden, die der mCherry-Proteinbande entspricht. Zusätzlich ist bei den Zellklonen MDCK-F3-cRaf-mCherry-A5 und MDCK-cRaf-mCherry-E2 eine Bande bei ca. 93 kDa zu sehen, welche dem Fusionsprotein cRaf-mCherry entspricht. Im Teilbild B wurde bei allen Zelllinien eine Bande bei 27 kDa detektiert, welche mit dem Proteingewicht von EGFP übereinstimmt. In den geblotteten Proteinspuren der Zellklone MDCK-EGFP-cRaf-C1 und MDCK-F3-EGFP-cRaf-D5 ist außerdem eine Bande bei ca. 92 kDa zu sehen, die dem Fusionsprotein EGFP-cRaf entspricht.

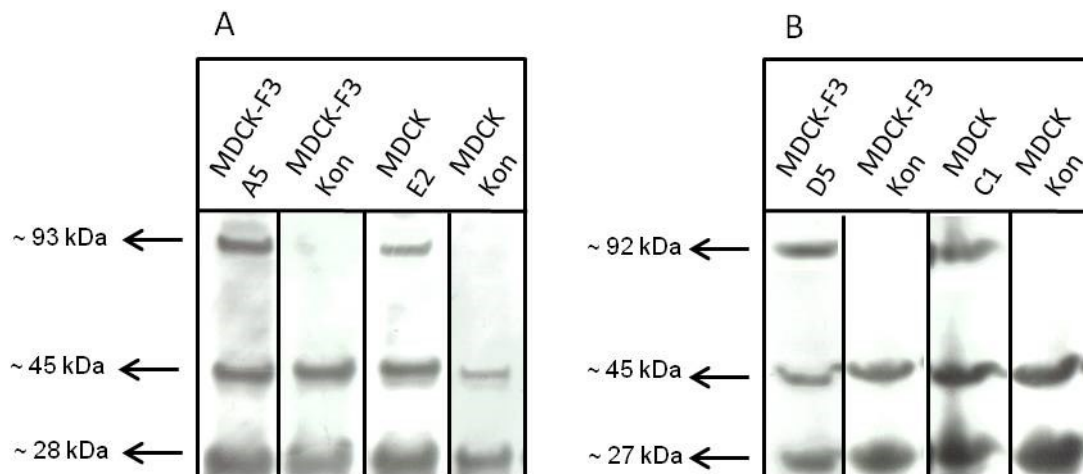


Abb. 14: **Western Blot Ergebnisse zum Nachweis von mCherry (A) und EGFP (B) aus transfizierten MDCK bzw. MDCK-F3 Zellen.** Es wurden Gesamtzellextrakte hergestellt, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die Western Blot Membranen mit mCherry (28 kDa mCherry, 93 kDa cRaf-mCherry) bzw. EGFP (27 kDa EGFP, 92 kDa EGFP-cRaf) spezifischen Antikörpern über Nacht inkubiert. β -Actin-Antikörper (45 kDa) wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Visualisierung erfolgte mittels ECL-Detektion. Als Kontrolle (MDCK-F3 Kon und MDCK Kon) diente das Zelllysate der jeweiligen Zelllinie, welche zuvor mit dem Ausgangsvektor ohne cRaf-Insert transfiziert worden ist. Die Abbildung zeigt nur eine Auswahl der geprüften Klone.

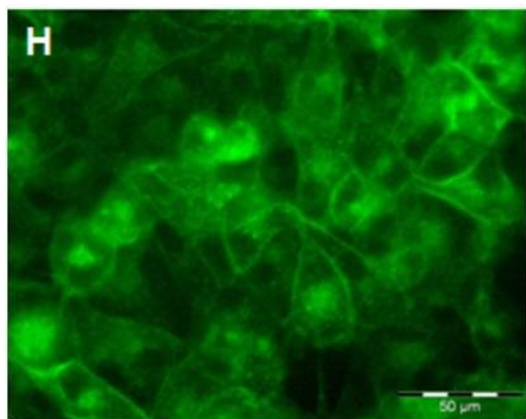
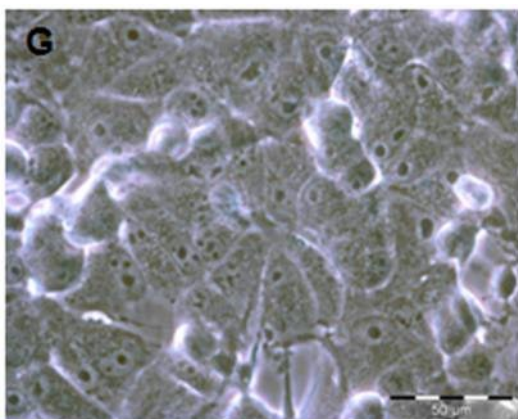
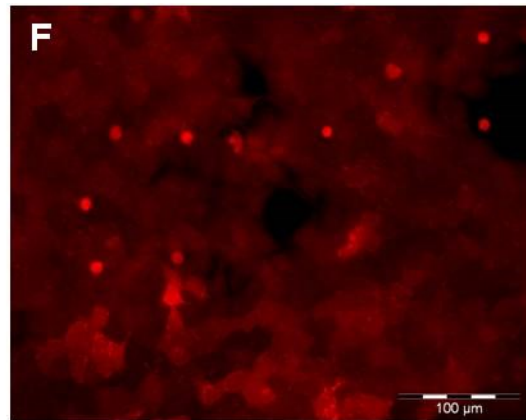
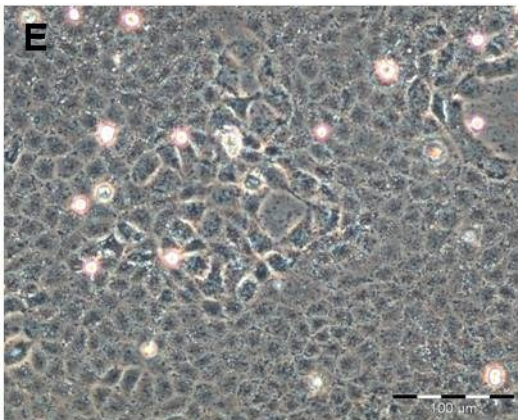
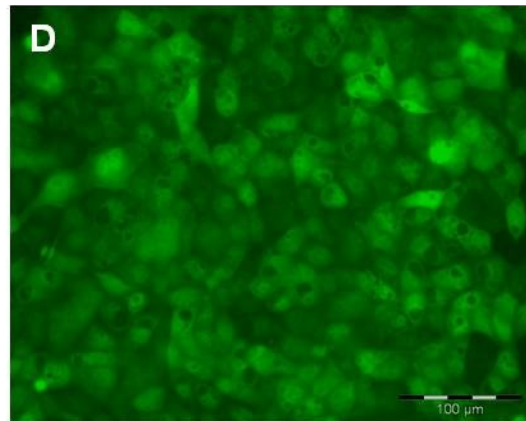
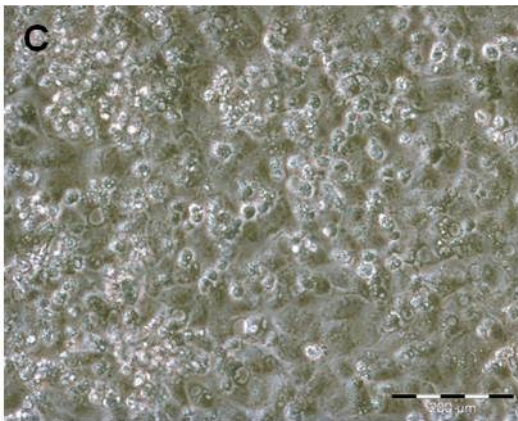
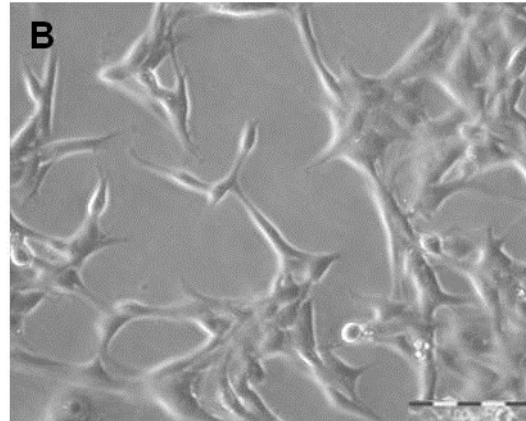
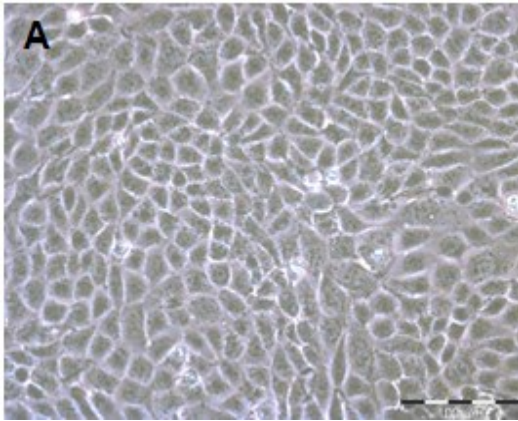
Für die nachfolgenden Charakterisierungen wurden die Klone MDCK-EGFP-cRaf-C1, MDCK-F3-EGFP-cRaf-D5 sowie MDCK-cRaf-mCherry-E2 und MDCK-F3-cRaf-mCherry-A5 verwendet.

4.2.4 Charakterisierung der Raf-detektierbaren Zellklone

Zur Charakterisierung der, mit einem c-Raf-Fluorophor stabil transfizierten, MDCK und MDCK-F3 Zellklone wurde zum einen die Zellmorphologie betrachtet und zum anderen die Wachstumsgeschwindigkeit bestimmt. Für geplante Inhibierungsversuche des Ras/Raf-Signalwegs wurde die zytotoxische Sorafenib-Konzentration für MDCK-F3 Zellen ermittelt. Desweiteren wurden die Zellklone mittels Western Blot-Analyse auf die Aktivier- bzw. Inhibierbarkeit des Ras/Raf-Signalwegs getestet.

4.2.4.1 Vergleich der Zellmorphologie

Untransfizierte MDCK Zellen weisen eine epitheliale, eher rundliche Zellmorphologie auf, sie bilden einen gleichmäßigen, mosaikförmigen Zellrasen durch ihre stark ausgeprägten Zell-Zell-Kontakte. Im Unterschied dazu wächst die, mit dem viralen H-Ras-Onkogen stabil transfizierte, Zelllinie MDCK-F3 eher spindelförmig länglich, mit nur wenigen Zell-Zell-Kontakten. Die MDCK-F3 Zellen wachsen zudem durch Verlust der Kontaktinhibition auch übereinander, wenn noch keine Konfluenz im Kulturgefäß erreicht ist. Sie bilden erst bei sehr hoher Zellzahl einen annähernd mosaikartigen Zellrasen ähnlich wie MDCK Zellen. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, zeigen die mit egfp-CRAF bzw. CRAF-mcherry transfizierten MDCK bzw. MDCK-F3 Zellen keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den untransfizierten Ausgangszelllinien. In den Fluoreszenzaufnahmen kann man erkennen, dass bei den MDCK-cRaf-Klonen (D und F) die grüne bzw. rote Fluoreszenz über die gesamte Zelle verteilt ist. Während bei dem MDCK-F3-EGFP-cRaf Klon (H) die Fluoreszenz vorwiegend an der Zellmembran zu finden ist. Die Fluoreszenz der MDCK-F3-cRaf mCherry Zellen (J) scheint jedoch über die ganze Zelle verteilt zu sein. Die MDCK bzw. MDCK-F3 Kontrollklone (K-N), welche mit dem Ausgangsvektor pmCherry-N1 bzw. pDisplay-EGFP ohne CRAF Insert transfiziert wurden, zeigen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Fluoreszenz über die ganze Zelle hinweg.



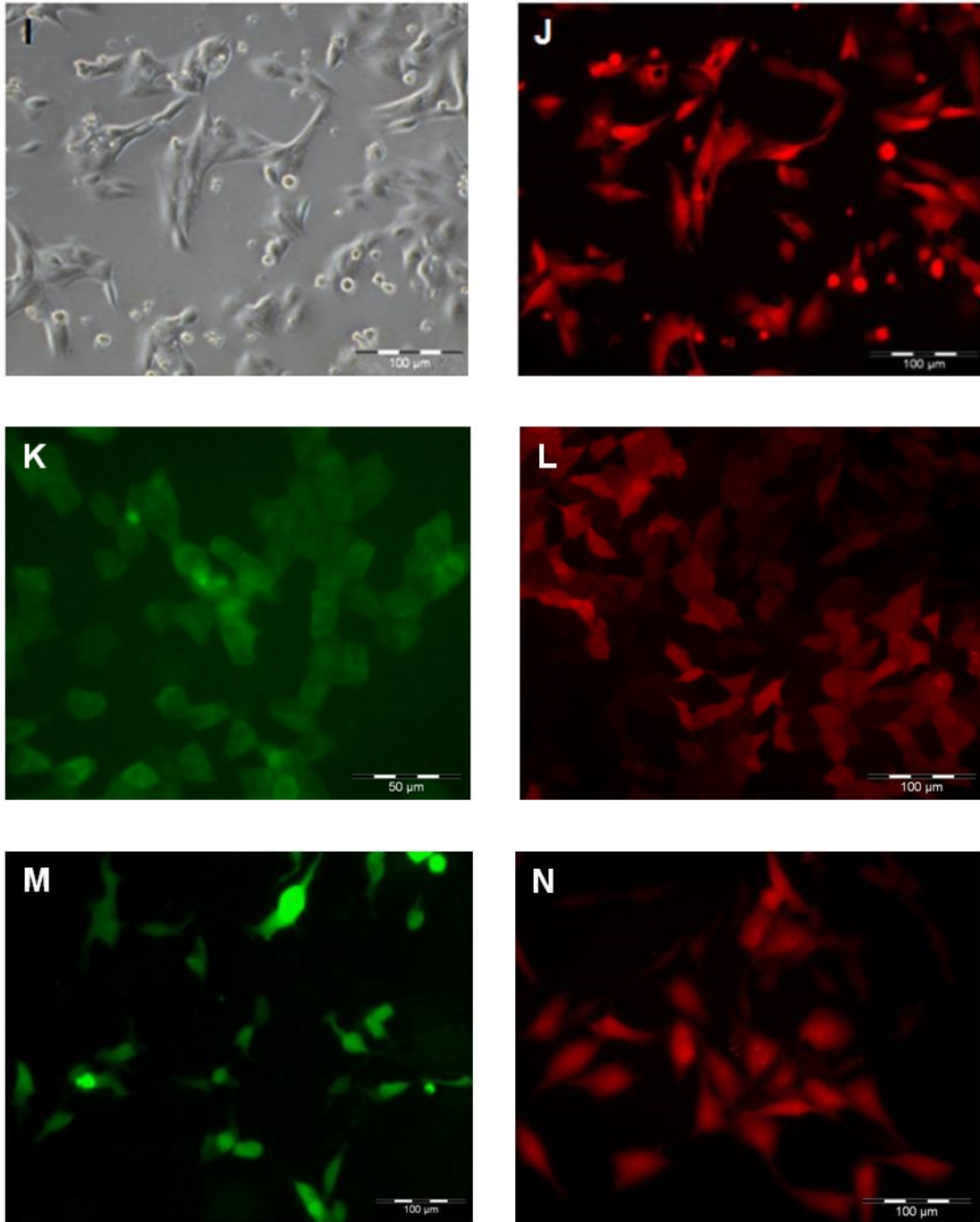


Abb. 15: **Phänotyp von MDCK und MDCK-F3 Zellklonen.** **A:** untransfizierte MDCK Zellen zeigen eine epitheliale Zellform mit starken Zell-Zell-Kontakten; **B:** untransfizierte MDCK-F3 Zellen sind spindelförmig und wachsen übereinander; **C + D:** MDCK-EGFP-cRaf-C1; **E + F:** MDCK-cRaf-mCherry-E2; **G + H:** MDCK-F3-EGFP-cRaf-D5; **I + J:** MDCK-cRaf-mCherry-A5; **K + L:** MDCK-EGFP und MDCK-mCherry; **M + N:** MDCK-F3-EGFP und MDCK-F3-mCherry. Die Bilder wurden mit dem Mikroskop Olympus aufgenommen, die Vergrößerung der einzelnen Aufnahmen ist angegeben.

4.2.4.2 Vergleich des Proliferationsverhaltens

Um die Wachstumsgeschwindigkeit der stabil transfizierten Raf-Fluorophor-Zellen zu untersuchen, wurden Wachstumskurven von den Zellklonen MDCK-EGFP-cRaf-C1, MDCK-cRaf-mCherry-A5, MDCK-mCherry und MDCK-egfp (Kontrollklone) sowie MDCK-F3-EGFP-cRaf-D5, MDCK-F3-cRaf-mCherry-E2, MDCK-F3-mCherry und MDCK-F3-egfp (Kontrollklone) erstellt. Zusätzlich wurden untransfizierte Kontrollgruppen von MDCK und MDCK-F3 Zellen herangezogen. Es wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 6-well-Platten ausgesät und nach 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 und 192 Stunden in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Alle zwei Tage fand ein Mediumwechsel statt. In Abbildung 16 sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung dargestellt.

Man kann erkennen, dass nach 24 Stunden sowohl bei dem MDCK als auch bei dem MDCK-F3 Gruppierungsbild zunächst fast keine Veränderung der Zellzahl zu erkennen ist. Bei der MDCK-Zellreihe (Bild A) hat die untransfizierte Zelllinie nach 120 Stunden die höchste Konfluenz im Kulturgefäß erreicht, während alle transfizierten Zellklone erst 24 Stunden später, nämlich nach 144 Stunden ihr Wachstumsmaximum erreicht haben. Hierbei erreichte jedoch nur der Zellklon MDCK-cRaf-mCherry ungefähr die gleiche Zellzahl im Well, bei allen anderen Klone liegt das Zellzahlmaximum bis zu 30 % niedriger. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Kontrollklone MDCK-mCherry und MDCK-EGFP liegen fast durchgehend niedriger als bei den Vergleichszellen MDCK-EGFP-cRaf und MDCK-cRaf-mCherry. Den größten Abstand zueinander haben dabei MDCK-cRaf-mCherry, mit ca. 2,7-fach mehr Zellen zum Zeitpunkt 96 Stunden, zu MDCK-mCherry Zellen.

Bei der MDCK-F3-Zellreihe (Bild B) hat die untransfizierte Kontrolle die höchste Zellanzahl bis zum Zeitwert von 120 Stunden, danach fällt die Wachstumskurve ab. Das Wachstumsmaximum aller Zellklone ist erst nach 144 Stunden erreicht. Die Wachstumskurven sind aber, abgesehen von dieser 24 Stunden dauernden zeitlichen Verzögerung, mit der Kurve der Kontrolle vergleichbar. Die MDCK-F3-cRaf-mCherry zeigten insgesamt das geringste Wachstum, der Kontrollklon MDCK-F3-mCherry hingegen das größte Wachstum aller transfizierten Zellklone. Die beiden EGFP-Klone wichen nur geringfügig in ihrer Zellzahl voneinander ab.

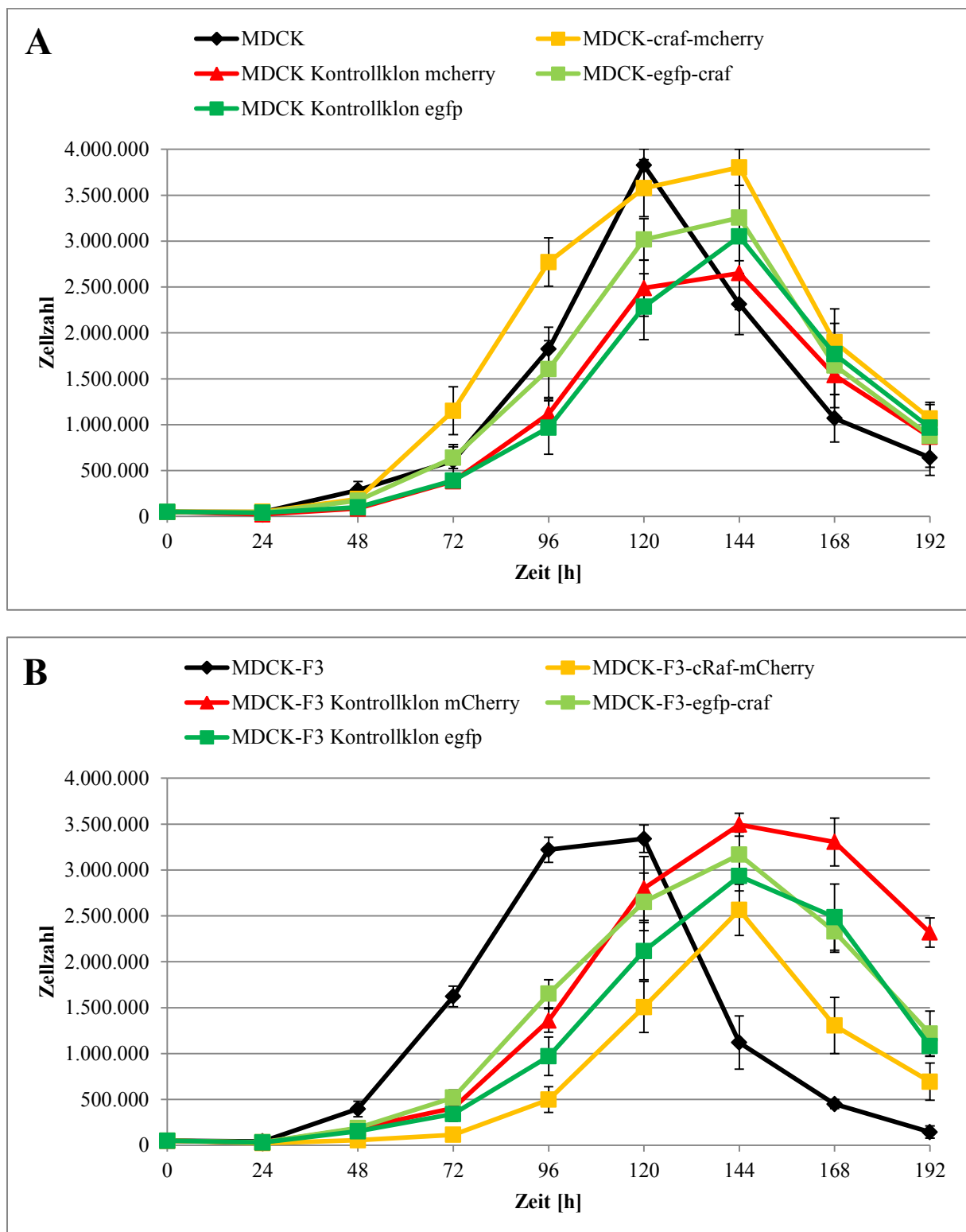


Abb. 16: **Wachstumskurven der MDCK (A) und MDCK-F3 Klone (B).** Die stabilen Klone und untransfizierten Kontrollzellen wurden alle 24 h (acht Tage lang) nach der Aussaat von 5×10^4 Zellen ausgezählt. In der Abbildung wurden die Mittelwerte der Zellanzahl aus min. drei unabhängigen Versuchen sowie deren Standardabweichung bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen.

4.2.4.4 Ermittlung der zytotoxischen Sorafenib-Konzentration für MDCK-F3 Zellen

Für weitere Versuche mit der Zelllinie MDCK-F3 wurde nach einer geeigneten Konzentration des Multikinaseinhibitors Sorafenib ermittelt. Hierzu wurde die Zellviabilität in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz mittels MTT-Assay untersucht. Dieser Test basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes in das dunkelblaue Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen. Da der Wirkstoff Sorafenib in DMSO gelöst und verdünnt wird, wurde auch gleichzeitig ein Zellviabilitätstest mit unterschiedlichen Konzentrationen DMSO durchgeführt. In eine 96-well-Platte wurden 15×10^3 Zellen je Well ausgesät und zum Anwachsen 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde eine Sorafenib- bzw. DMSO-Verdünnungsreihe in DMEM angefertigt, so dass auf den ausgewählten wells 1 - 15,6 $\mu\text{mol/l}$ Sorafenib oder 0,8 – 25 $\mu\text{mol/l}$ DMSO auf den Zellen verteilt war. Nach einer Inkubation von einer bzw. von 24 Stunden wurde die Behandlung abgebrochen und mit dem MTT-Assay Protokoll (Abschnitt 3.1.6) fortgefahren. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, wurde bereits nach einer Stunde mit der Sorafenib-Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ das Zellwachstum um etwa 60 % verringert und bei einer Zugabe von 7,8 $\mu\text{mol/l}$ konnte das Wachstum der Zellen nahezu ganz eingestellt werden. Medium mit einem Zusatz von 6,25 % DMSO bewirkte nach einer Stunde eine Reduktion der Zellproliferation um etwa die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle. Eine geringere DMSO-Konzentration wirkte sich sogar kurzzeitig positiv auf das Zellwachstum aus. Nach 24 Stunden war aber auch bei einer 3 %-igen DMSO Zugabe eine über 50 %-ige Verringerung des Zellwachstums festzustellen. Bei einer Konzentration von 12,5 % DMSO wurde das Zellwachstum fast komplett eingestellt. Für c-Raf-Inhibierungsversuche von MDCK-F3 Zellen wurde aufgrund dieser Ergebnisse Medium mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ Sorafenib verwendet.

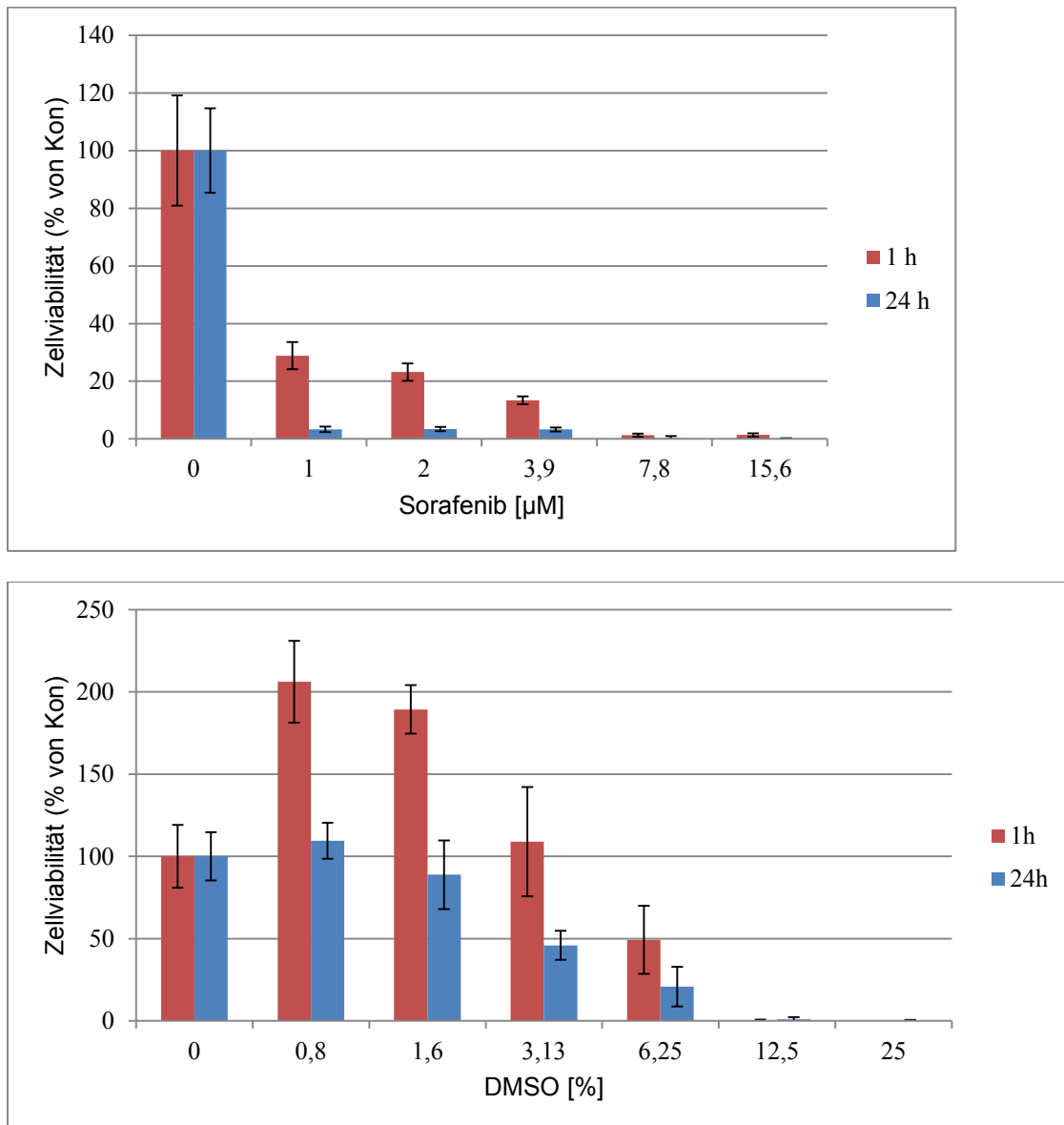


Abb. 17: **Zellviabilitätsanalyse von MDCK-F3 Zellen mittels MTT Assay.** MDCK-F3 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Sorafenib bzw. DMSO behandelt und die Zellviabilität nach 1 h und 24 h ermittelt (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; n=3).

4.2.4.5 Aktivierung und Inhibierung des Ras/Raf-Signalweges

Zur Überprüfung der c-Raf-Aktivier- bzw. Inhibierbarkeit wurde die Proteinexpression von c-Raf untersucht. Hierfür wurden die Zellklone MDCK-EGFP-cRaf-C1 und MDCK-cRaf-mCherry-E2 mit 100 ng/ml EGF behandelt, während die Zelllinien MDCK-F3-EGFP-cRaf-D5 sowie MDCK-F3-cRaf-mCherry-A5 mit dem c-Raf-Inhibitor Sorafenib [1 μM] behandelt wurden. Es wurden SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt und die Membranen mit Antikörper gegen c-Raf und phospho-c-Raf inkubiert. Anschließend wurden die Proteinbanden mithilfe des ECL-Reagenz auf entsprechenden Filmen sichtbar gemacht. Die

phosphorylierte Form von c-Raf spiegelt dabei die Aktivität des Enzyms wieder, während die unphosphorylierte Form sowie β -Actin der Ladekontrolle dient. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, wird die Expression von pc-Raf in den MDCK-cRaf Zellklonen nach EGF-Zugabe induziert. Sowohl MDCK-egfp-cRaf als auch MDCK-cRaf-mcherry zeigen nach drei Stunden eine gesteigerte pc-Raf Expression, welche sich nach sechs Stunden noch mehr intensiviert. Für MDCK-F3-egfp-cRaf und MDCK-F3-cRaf-mcherry ergibt sich ein anderes Expressionsmuster, hier ist pc-Raf schon basal stark aktiviert. Diese Aktivierung schwächt sich nach Zugabe von Sorafenib in beiden Zellklonen gleichermaßen ab, wobei nach drei Stunden weniger pc-Raf vorhanden scheint als nach sechs Stunden.

MDCK- egfp-cRaf			MDCK- cRaf-mcherry			Zeit (h)	MDCK-F3- egfp-cRaf			MDCK-F3- cRaf-mcherry		
0	3	6	0	3	6		0	3	6	0	3	6
						pc-Raf						
						c-Raf						
						β -Actin						

Abb. 18: **Detektion des Aktivitätslevels von c-Raf.** Die MDCK-Zellklone wurden mit EGF (100 ng/ml), die MDCK-F3 Zellklone mit Sorafenib (1 μ M) behandelt und nach 3 bzw. 6 h geerntet. Die Zellen der Kontrollen wurden nicht behandelt. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und Western Blots angefertigt. Die Membranen wurden mit pc-Raf (ca. 102 kDa pcRaf-mCherry bzw. EGFP-pcRaf) und c-Raf (ca. 92 kDa cRaf-mCherry bzw. EGFP-cRaf) spezifischen Antikörpern über Nacht inkubiert. β -Actin-Antikörper (45 kDa) wurde als Ladekontrolle verwendet.

4.3 Mikroskopie-Testsystem für die Detektion des Ras/Raf-Signalweges in stabil transfizierten Zellen

Um zu testen, ob der Ras/Raf-Signalweg in den stabil transfizierten MDCK-cRaf-mCherry bzw. MDCK-EGFP-cRaf Zellen durch die fluoreszierenden Proteine mikroskopisch nachverfolgbar ist, wurde EGF als Aktivator oder Sorafenib als Inhibitor des Ras/Raf-Signalwegs zu den Zellen gegeben. Hierzu wurden zunächst expressionskinetische Studien mittels Live-Cell Imaging betrieben. Die Zellen wurden in Cellview 4-Kompartimentschalen ausgesät und nach 48 Stunden wurde der Wirkstoff direkt im Cell Observer dazu pipettiert, so dass die Zellobservierung direkt gestartet werden konnte. Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, konnte bei einigen MDCK-cRaf-mCherry und MDCK-EGFP-cRaf Zellen unter EGF-

Einfluss nach kurzer Zeit eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität Richtung Zellmembran beobachtet werden. Nach zehn Minuten EGF-Behandlung war die höchstmögliche Fluoreszenzintensitätsverschiebung zu beobachten. Die Fluoreszenz im Zytosol der Zellen nimmt dabei leicht ab oder bleibt bestehen, während die äußere Zellgrenze deutlicher wird.

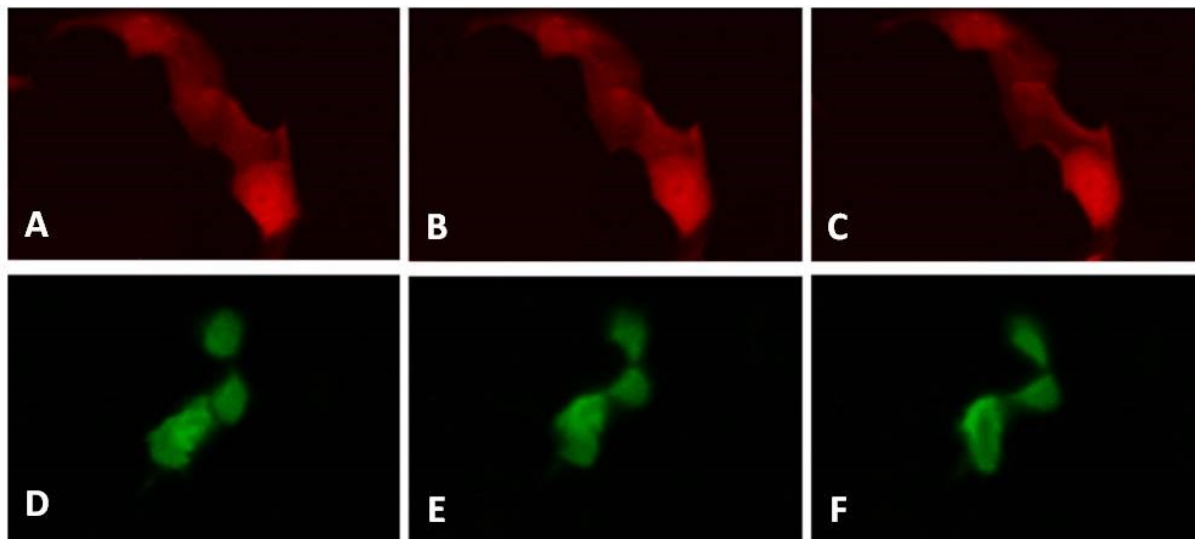


Abb. 19: Live-Cell-Imaging von stabil transfizierten MDCK Zellen mit cRaf-mCherry (A-C) oder EGFP-cRaf (D-F). Zellen wurden mit EGF (100 ng/ml) behandelt. **A:** direkt nach der Zugabe **B:** nach 5 min **C:** nach 10 min **D:** direkt nach Zugabe **E:** nach 5 min **F:** nach 10 min. Vergrößerung: 200x

Da die Fluoreszenzunterschiede zur Lokalisation der Raf-Proteine innerhalb der stabil transfizierten Zellen bei 200-400-facher Vergrößerung im Zeiss Observer Z1 nur schwer zu erkennen waren, wurden Aufnahmen höherer Vergrößerung mithilfe eines konfokalen Mikroskops angestrebt. Das Institut für physikalische und theoretische Chemie in Frankfurt ermöglichte die Nutzung ihres LSM710 der Firma Zeiss für diese Arbeit. Da die EGFP-cRaf-Klone aus ungeklärter Ursache inzwischen nicht mehr fluoreszierten (Amplifikation des EGFP-Gens der Zellklone war positiv - Daten nicht gezeigt), wurde nur mit den c-Raf-mCherry-Klonen weitergearbeitet. Hierzu wurden 5×10^4 MDCK-cRaf-mCherry bzw. MDCK-F3-cRaf-mCherry Zellen auf Coverslips in 24-well-Platten ausgesät, nach 48 Stunden mit EGF bzw. Sorafenib behandelt und anschließend fixiert. Die konfokalen Mikroskopieaufnahmen sind in Abbildung 20 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass in den MDCK-cRaf-mCherry-Zellen die rote Fluoreszenz gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt ist, während sie sich nach EGF-Behandlung eher an die Zellmembran zurückzieht. Es erscheinen außerdem viele stark fluoreszierende, kugelförmige Ansammlungen in der Zelle. Bei den

MDCK-F3-cRaf-mCherry Zellen ist in der unbehandelten Aufnahme auch die gesamte Zelle rot fluoreszierend, jedoch ist der äußere Zellrand definierter erkennbar, es scheint eine ganz leichte Verstärkung der Fluoreszenz im Zellmembranbereich zu geben. Nach Sorafenib-Behandlung ändert sich das Fluoreszenzbild der Zelle, die Färbung scheint nun weniger an der Zellmembran, sondern insgesamt eher schwächer mit zahlreichen stark fluoreszierenden, kugelförmigen Anhäufungen im Zytoplasmabereich.

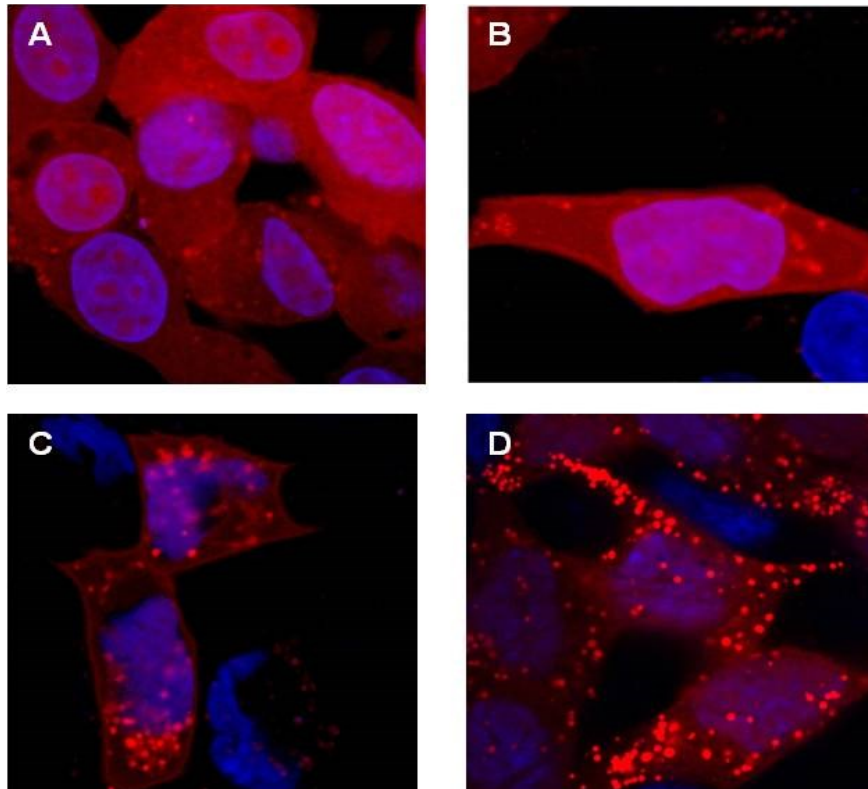


Abb. 20: Konfokale Mikroskopie der stabil transfizierten MDCK (A, C) und MDCK-F3 Zellen (B, D) mit cRaf-mCherry. Auf Coverslips gezüchtete MDCK Zellen wurden mit EGF (100 ng/ml), MDCK-F3 Zellen mit Sorafenib (1 μ M) behandelt und anschließend zum Mikroskopieren fixiert, Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. **A:** MDCK unbehandelt **B:** MDCK-F3 unbehandelt **C:** 10 min nach EGF-Zugabe **D:** 10 min nach Sorafenib-Zugabe. Vergrößerung: 630x

4.4 Simultane Visualisierung des Ras/Raf- und des Wnt-Signalweges

Um in Zellen nicht nur den Aktivierungsverlauf des Ras/Raf-Signalweges, sondern auch noch zusätzlich den des Wnt-Signalweges nachverfolgen zu können, wurden Vorversuche unternommen mit dem Ziel Raf- und Wnt-detektierbare Zellen herzustellen, da innerhalb der Arbeitsgruppe auch parallel an der Visualisierung des Wnt-Signalweges gearbeitet wurde. Hierzu wurde mir der Reportergenvektor „pDisplay-SuperTop-EGFP-neu4“ zur Verfügung gestellt. Dieser Vektor verfügt über sechs hintereinanderliegende TOP- (5'-CCCTTTGATC-

3')-Sequenzen (TCF/LEF-Bindemotive), welche als Promotoren vor das Gen egfp geschaltet sind. Der bereits stabil transfizierte Zellklon MDCK-F3-cRaf-mCherry, welcher den Ras/Raf-Weg visualisiert, wurde in eine 24-well-Platte zu je 3×10^4 Zellen ausgesät und bei einer optischen Konfluenz von ca. 70 % mit dem Vektor pDisplay-STE-neu4 mithilfe des Lipofektionskits *Effectene* (Qiagen) transfiziert. Der (transiente) Transfektionserfolg wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop nach 24 bis 72 Stunden überprüft. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, konnten dabei doppelfluoreszierende Zellen detektiert werden, wobei sich durch Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz eine gelb-orangene Zellfärbung ergibt.

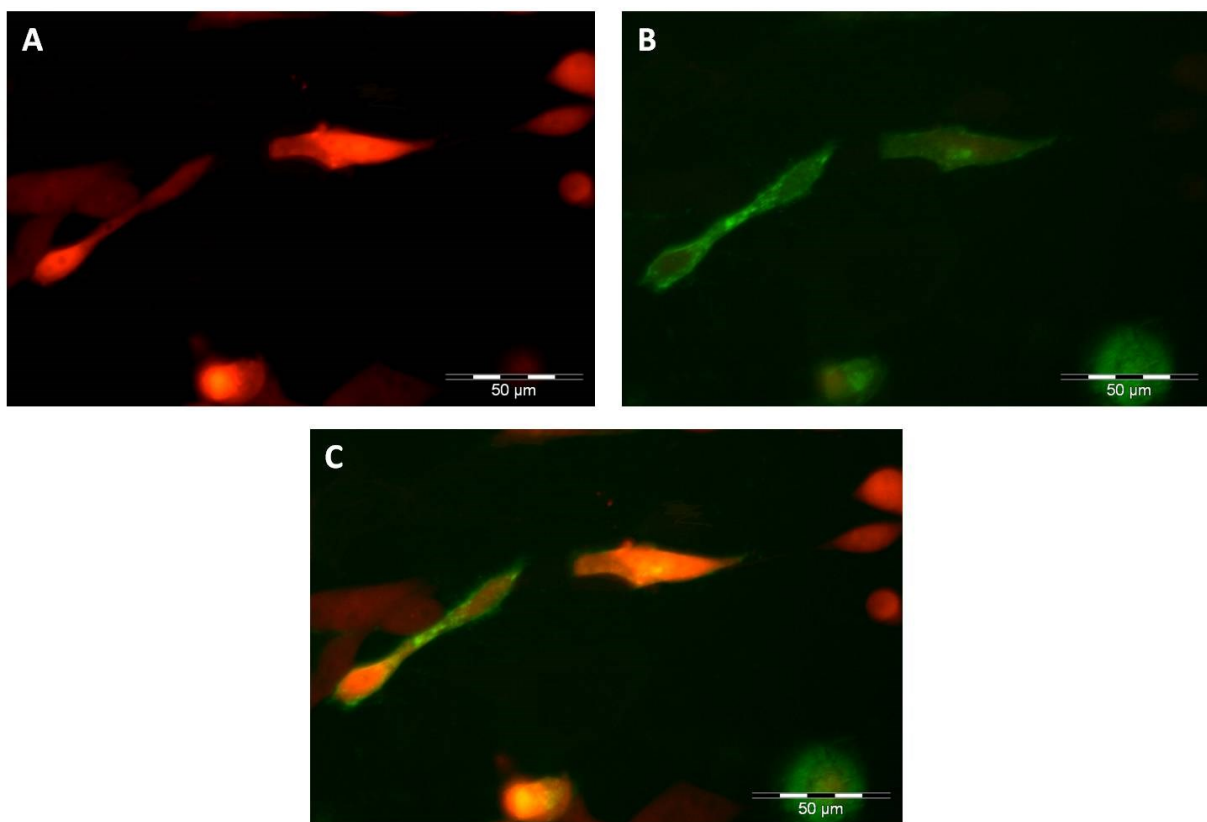


Abb. 21: **Kotransfektionsexperimente in MDCK-F3 Zellen.** Die MDCK-F3-cRaf-mCherry Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt pDisplay-STEnu4 transfiziert um fluoreszenzmikroskopisch den Ras/Raf- und Wnt-Signalweg zu beobachten. **A:** Rote Fluoreszenz der mit pcRaf-shift-mCherry-N1 stabil transfizierten MDCK-F3 Zellen; **B:** Grüne Fluoreszenz der mit pDisplay-STEnu4 transient transfizierten MDCK-F3-cRaf-mCherry Zellen; **C:** Übereinandergelegte Fluoreszenzen der Bilder A und B. Vergrößerung: 400x

4.5 Analyse Wnt-induzierter HEK293T Zellen

In der vorliegenden Arbeit sollten außerdem die proliferativen Auswirkungen von Wnt Proteinen auf HEK293T Zellen getestet werden, um anschließend die erhaltenen Parameter für die induzierbare, fluoreszenzbasierte zelluläre Visualisierung des Wnt-Signalweges nutzen zu können.

4.5.1 Auswirkungen von Wnt3a auf die Induktion von β -Catenin und typischen Wnt Zielgenen

Um die Aktivität des Wnt-Signalweges in HEK293T Zellen zu überprüfen, wurde die Proteinkonzentration von β -Catenin nach Wnt-3a Behandlung im Western Blot gemessen. Hierfür wurden die HEK293T Zellen im Hinblick auf eine dosis- und zeitabhängige β -Catenin Induktion mit 10-200 ng/ml Wnt-3a behandelt und nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit geerntet. Wie man in Abbildung 22 erkennen kann, konnte eine Induktion von β -Catenin bereits nach 24 Stunden mit steigender Wnt-3a Konzentration erreicht werden.

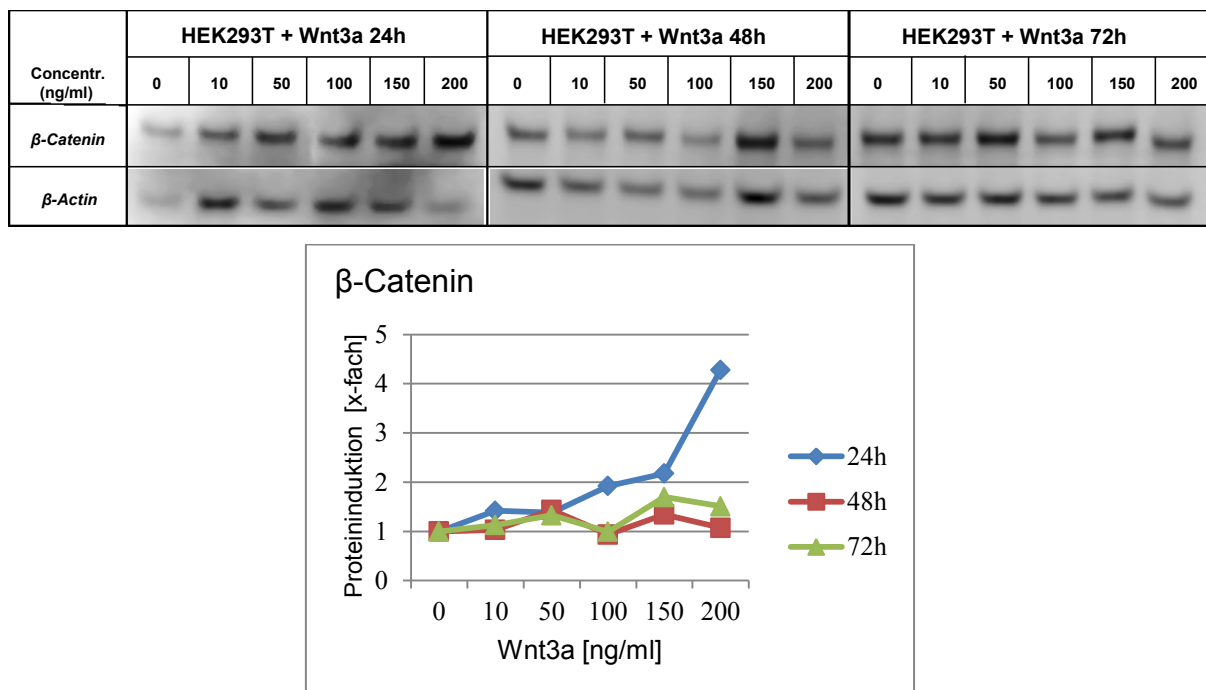


Abb. 22: Expression von β -Catenin in HEK293T-Zellen nach Wnt-3a-Behandlung. Die Zellen wurden mit 0-200 ng/ml Wnt-3a für 24, 48 oder 72 h behandelt. Die durch den β -Catenin spezifischen Antikörper detektierten Banden wiesen eine Größe von 92 kDa auf, die Banden von β -Actin lagen bei 45 kDa. Die β -Catenin-Konzentration erhöhte sich 24 h nach Behandlung. Der Antikörper β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. Für die Quantifizierung wurden die Proteinlevel auf β -Actin normalisiert und die unbehandelte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt.

Die maximale Proteinkonzentration wurde dabei nach 24 Stunden mit einer Konzentration von 200 ng/ml Wnt-3a festgestellt. Hierbei zeigte die Quantifikation der erhaltenen Banden eine vierfache Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieser Effekt der β -Catenin Induktion konnte bereits nach 48 und 72 Stunden nach Wnt-3a Behandlung nicht mehr genau beobachtet werden.

Um die Regelung der Wnt-Zielgene CCND1 und C-MYC in Wnt-3a-behandelten HEK293T Zellen zu analysieren, wurden sowohl semi-quantitative RT-PCR als auch Western-Blots durchgeführt. Die Zellen wurden dazu wie oben bereits beschrieben mit 0-200 ng/ml Wnt-3a behandelt, um dann nach 24, 48 und 72 Stunden zum einen die RNA zu isolieren und zum anderen Gesamtzellextrakte herzustellen.

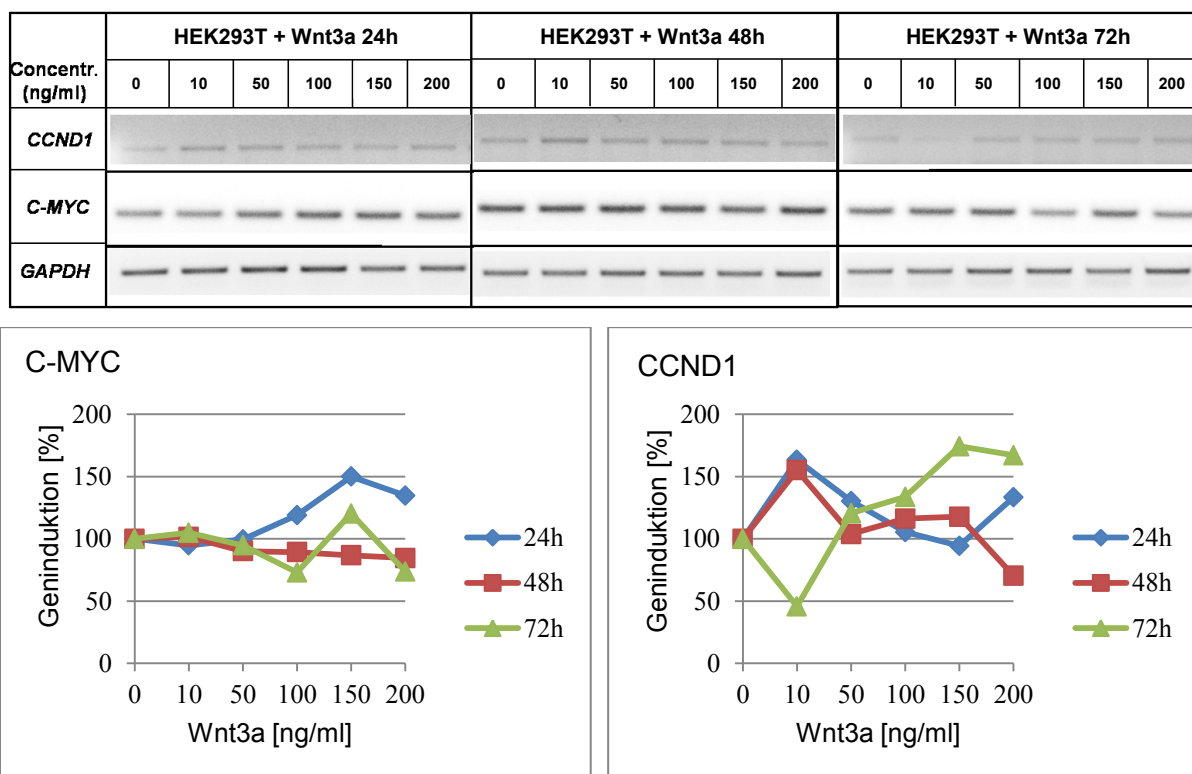


Abb. 23: PCR-Ergebnisse der Expression von CCND1 und C-MYC in HEK293T-Zellen nach Wnt-3a-Behandlung. Exponentiell wachsende HEK293T-Zellen wurden mit 0-200 ng/ml Wnt-3a 24, 48 oder 72 h behandelt. Nach diesen Zeitpunkten wurde die RNA isoliert, in c-DNA umgeschrieben und semi-quantitative RT-PCRs mit den Primern für CCND1 und C-MYC durchgeführt, als Ladekontrolle wurden GAPDH-spezifische Primer verwendet. Für die Quantifizierung wurde die Expression auf GAPDH normalisiert und die unbehandelte Kontrolle auf 100 % gesetzt.

Die Ergebnisse der RT-PCRs sind in Abbildung 23 dargestellt. In den unbehandelten Zellen wurde ein basaler Level von C-MYC und CCND1 nachgewiesen. Das Agarosegelbild zeigte nach 24 Stunden eine leichte C-MYC-Induktion (1,5-fache Steigerung) bei einer Wnt-3a Konzentration von 150 ng/ml, nach 48 und 72 Stunden waren hingegen nur marginale

Veränderungen in der C-MYC cDNA-Menge auszumachen. Eine Geninduktion von CCND1 konnte bei 10 ng/ml Wnt-3a nach 24 und 48 Stunden sowie nach 72 Stunden mit einer Konzentration von 100 ng/ml Wnt-3a beobachtet werden. Die Ergebnisse der Western Blots können der Abbildung 24 entnommen werden. Die Western Blot-Quantifizierung von Cyclin D1 zeigte eine Erhöhung um den Faktor 1,5 mit Wnt-3a Konzentration von 50 bis 200 ng/ml nach 24 Stunden. Der Proteingehalt von c-Myc stieg in der gleichen Weise mit der Konzentration von 50 ng/ml nach 24 Stunden Wnt-3a.

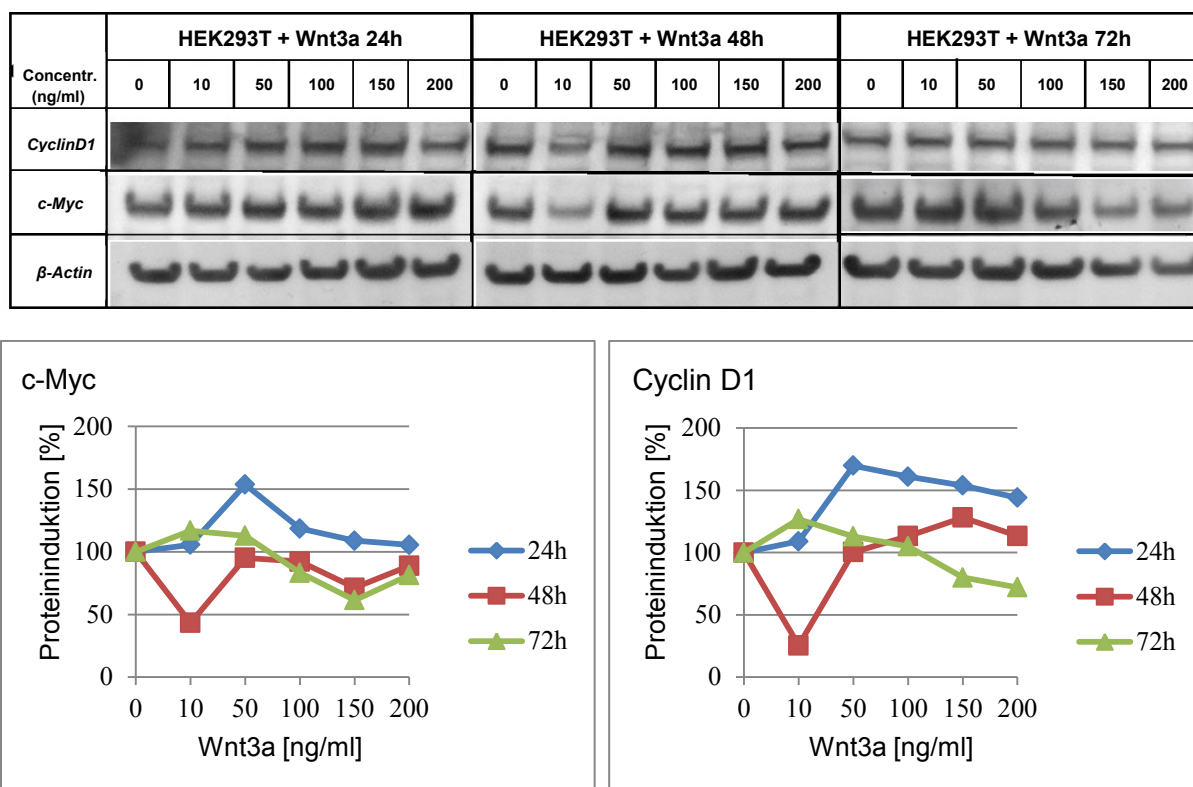


Abb. 24: Western-Blot-Ergebnisse der Expression von CyclinD1 und c-Myc in HEK293T-Zellen nach Wnt-3a-Behandlung. Die Zellen wurden mit 0-200 ng/ml Wnt-3a 24, 48 oder 72 h behandelt. Es wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und die Western Blot Membranen mit Cyclin D1- und c-Myc-spezifischen Antikörpern inkubiert. β-Actin-Antikörper wurde als Ladekontrolle verwendet. Für die Quantifizierung wurde die Expression auf β-Actin normalisiert und die unbehandelte Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt.

4.5.2 Proliferationsstudien

Um die Auswirkungen der Wnt-Proteine auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen in 96-Well-Platten mit Zelldichten von 1×10^4 pro Well für 24 Stunden gezüchtet, bevor sie mit Wnt-3a bzw. Wnt-5a Proteinkonzentrationen von 0, 10, 50, 100, 150 und 200 ng/ml behandelt wurden. Zum Vergleich wurden auch HT29 Kolonkarzinomzellen, welche sich durch eine überregulierte Wnt-3a-Expression charakterisieren, nach gleichem

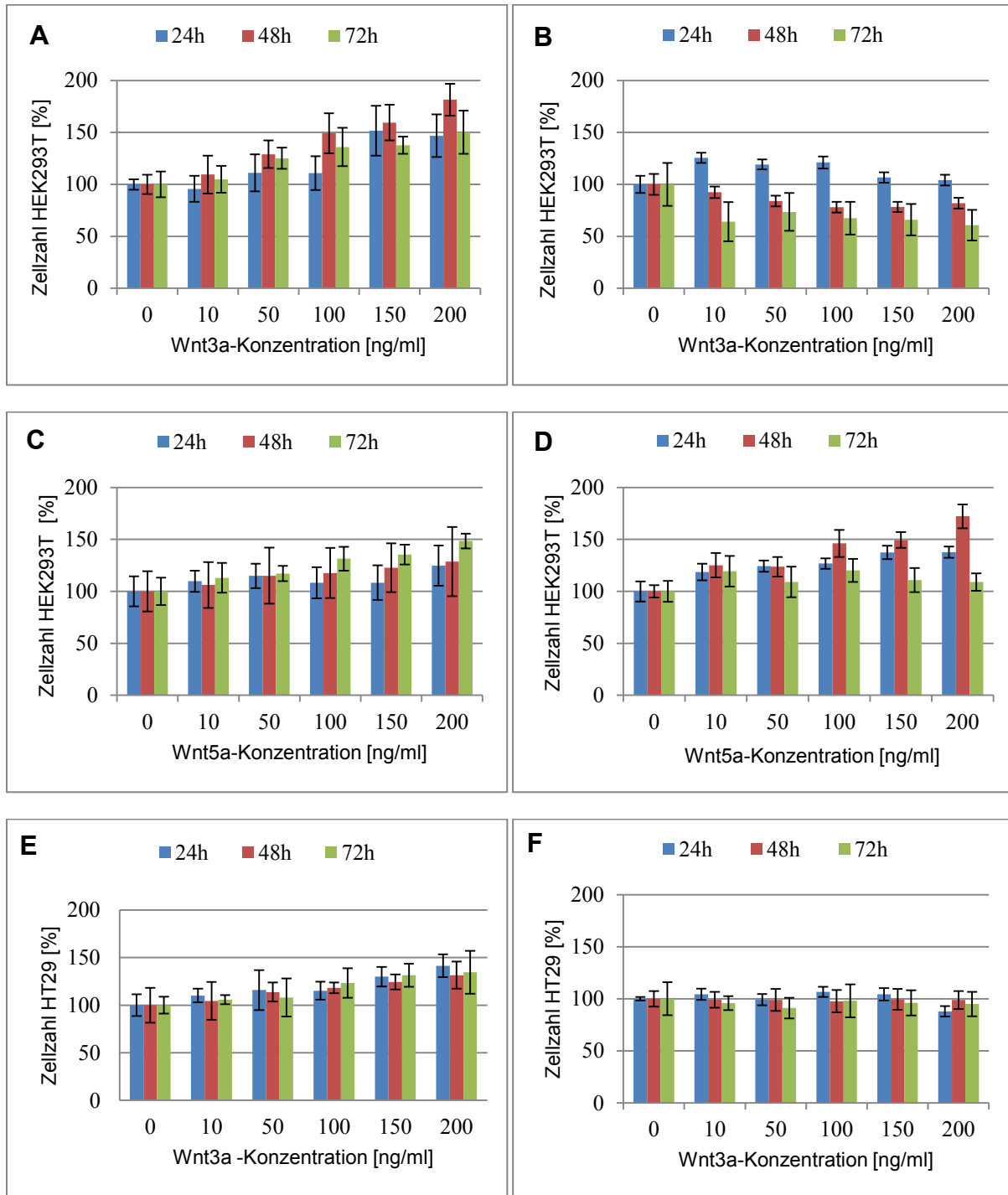
Protokoll behandelt. Nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit wurden die MTT und BrdU-Assays durchgeführt. Die Zellzahlen wurden unter Verwendung separat erstellter Wachstumskurven ausgehend von den gemessenen Absorptionswerten ermittelt (siehe Anhang). Zur Erstellung dieser Kurven wurden unterschiedliche Zellzahlen im Bereich von 1×10^3 bis 3×10^4 pro Well ausgesät. Nach 48 Stunden Inkubation erfolgten der MTT- und der BrdU-Assay zur Bestimmung des Zusammenhangs zwischen Zellzahl und Absorptionswert. Die Ergebnisse der BrdU- und MTT-Assays zur Untersuchung des Einflusses von Wnt-3a bzw. Wnt-5a auf HEK293T sowie HT29 Zellen ist in der Abbildung 25 zusammengefasst.

Die BrdU-Assays zeigen dabei einen offensichtlichen Trend: mit steigender Wnt-3a-Konzentrationen erhöht sich der zugehörige Auslesewert. Die höchste Wachstumsrate liegt bei einer Konzentration von 200 ng/ml Wnt-3a nach 48 Stunden. Die Wnt-3a-Behandlung bei HEK293T Zellen beeinflusst deren Proliferation demnach positiv. Im Gegensatz dazu zeigten die MTT-Assays nicht die gleiche Abhängigkeit zwischen steigenden Konzentrationen und Wnt-Zellzahlen. Die Zellzahl war bei der Kontrolle nach 48 bzw. 72 Stunden am höchsten und fiel mit steigender Wnt-3a Konzentration ab. Nur bei der 24 Stunden-Messreihe konnte eine leichte Zunahme der Zellzahl beobachtet werden. Unter Einwirkung des Liganden Wnt-5a stiegen die Zellzahlen 24 Stunden nach Wnt-Zugabe mit höher werdender Wnt-Konzentration schwach an. Nach 48 Stunden Inkubation mit Wnt-5a stiegen die Zellzahlen mit steigender Wnt-Konzentration weiter an, wobei diese Tendenz deutlicher wurde. Die Zellzahlen stiegen nach 72 Stunden Wnt-5a Einfluss nicht mehr regelmäßig mit steigender Konzentration des Liganden an, sondern blieben nahezu auf gleichem Level.

Bei den Wnt-3a-behandelten HT29 Zellen kann man im MTT-Assay keinen eindeutigen Trend des Verhältnisses zwischen Zellzahl und Wnt-3a Konzentration erkennen, die Zellzahlen zwischen den einzelnen Wnt-Konzentrationen sind zu allen Zeitwerten nahezu gleich bzw. ist eher ein leichter Rückgang zu verzeichnen. Im BrdU-Assay hingegen ist eine schwache Tendenz zu erkennen: Mit steigender Konzentration an Wnt-3a steigen auch die Zellzahlen gleichmäßig an. Diese Entwicklungstendenz ist aber weit weniger ausgeprägt als beim vergleichbaren Assay mit HEK293T Zellen. Die höchste Wachstumsrate liegt bei einer Konzentration von 200 ng/ml Wnt-3a nach 24 Stunden. Die Wnt-5a-behandelten HT29 Zellen zeigen im BrdU-Assay eine ähnliche langsam steigende Zellzahlentwicklung, jedoch ist dieser Trend erst nach 48 und 72 Stunden gut zu beobachten, denn die 24 Stunden-Messreihe fällt durch schwankende Wachstumsraten je Wnt-Dosis aus dieser Entwicklungstendenz raus. Im MTT-Assay der Wnt-5a-behandelten HT29 Zellen ist diese Beobachtung nahezu komplett

Ergebnisse

umgekehrt, hier zeigt die 24 Stunden-Messreihe einen Trend zur leicht gesteigerten Proliferation in Abhängigkeit zur Wnt-Dosis, während die 48 und 72 Stunden-Messreihe eine eher negative Wachstumstendenz mit Zellzahlschwankungen aufweist.



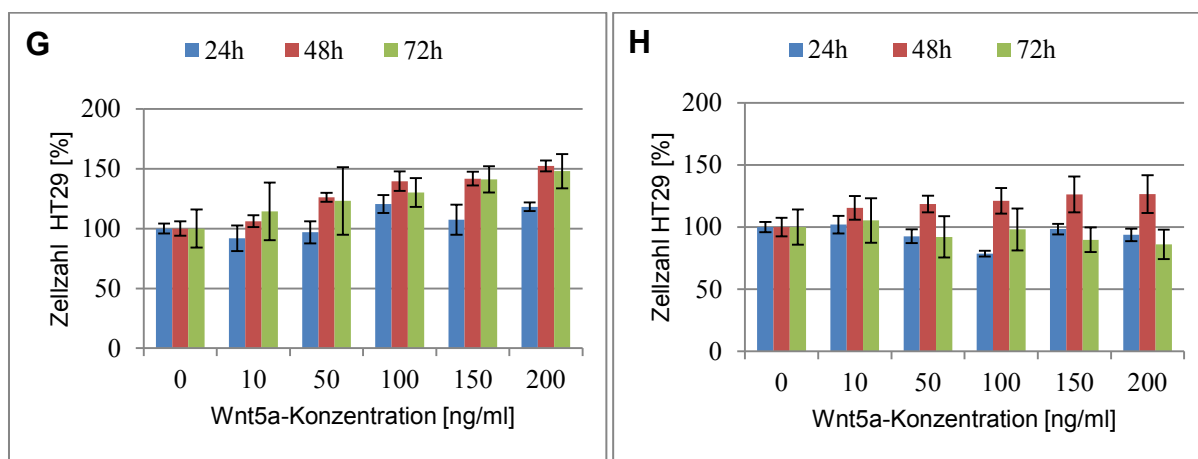


Abb. 25: Ergebnisse der Proliferationsassays. HEK293T- und HT29-Zellen wurden mit Konzentrationen von 0-200 ng/ml Wnt-3a bzw. Wnt-5a behandelt. Die Werte der Versuche wurden jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h gemessen. Die Balken zeigen die Anzahl der Zellen pro Well in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (vertikale Achse), die auf 100 % normiert wurde. Alle Assays wurden dreifach durchgeführt (n=18). **A + C:** HEK293T BrdU-Assay; **B + D:** HEK293T MTT-Assay; **E + G:** HT29 BrdU-Assay; **F + H:** HT29 MTT-Assay.

4.5.3 Mitochondriale Aktivität

Um die Rolle von Wnt-3a in der mitochondrialen Aktivität in HEK293T-Zellen weiter zu untersuchen, wurde die Menge an SDHA-Protein durch Western-Blot als auch durch Immunfluoreszenz-Analyse bestimmt. Die Succinat-Dehydrogenase (SDH) mit ihrer SDHA Untereinheit ist eine Schlüsselkomponente des Zitronensäurezyklus, welcher im Komplex II der mitochondrialen Elektronentransportkette beteiligt und für die Übertragung von Elektronen von Succinat zu Ubichinon verantwortlich ist. Die HEK293T-Zellen wurden entsprechend den Versuchsparametern der Proliferationsexperimente behandelt (siehe Kapitel 4.5.2) und anschließend mit SDHA Antikörper inkubiert. Die Ergebnisse, wie in Abbildung 26 zu sehen, zeigen nach 24 Stunden Wnt-3a Behandlung eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals und auch eine stärkeres Signal beim Western-Blot relativ zur Kontrolle. Nach 48 Stunden gab es keine wesentliche Änderung sowohl im Fluoreszenzsignal als auch auf erfasster Proteinebene durch die Western-Blot-Analyse. Nach 72 Stunden Wnt-3a Behandlung wurde auch ein abnehmendes Signal in beiden Versuchsteilen beobachtet. Das höchste Signal wurde nach 24 Stunden mit 50 ng/ml Wnt-3a (über das Doppelte zur unbehandelten Kontrolle) gemessen.

Ergebnisse

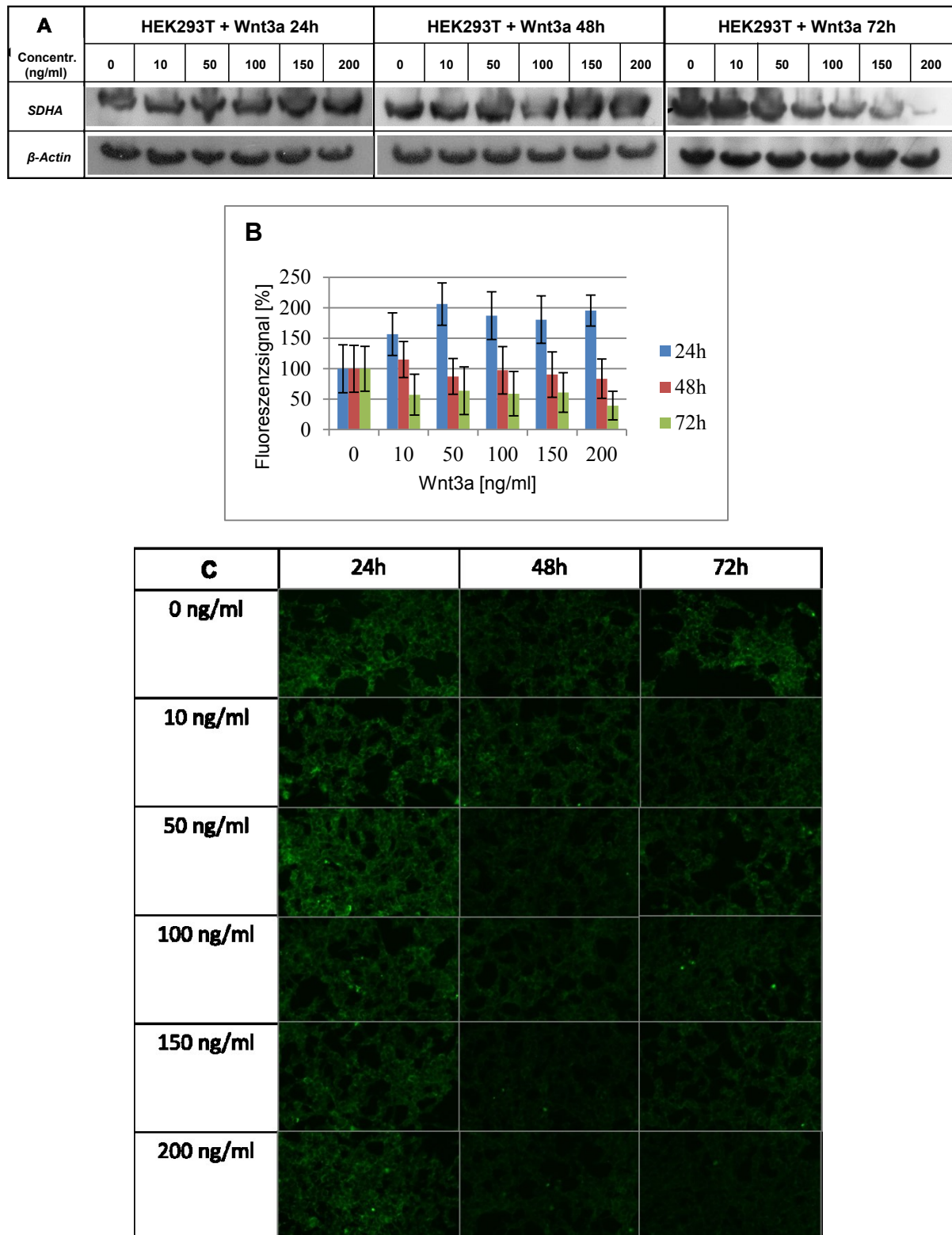


Abb. 26: Mitochondriale Aktivität von Wnt-3a behandelten HEK293T-Zellen. Exponentiell wachsende HEK293T-Zellen wurden verschiedenen Konzentrationen Wnt-3a, 0 bis 200 ng/ml, für die angegebenen Zeiten ausgesetzt. Gesamtzellextrakte wurden hergestellt und für die Western Blot Analyse verwendet. Die Membran wurde mit SDHA sowie β -Actin-Antikörper als Ladekontrolle inkubiert (A). HEK293T-Zellen wurden einer Immunfluoreszenz-Analyse unterworfen. Das SDHA-Protein wurde durch grüne Fluoreszenz über Fluoreszenzmikroskopie mit 200x Vergrößerung detektiert (C). Die Balken des Diagramms zeigen das Fluoreszenzintensitätssignal als Prozentsatz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (vertikale Achse), die auf 100 % normiert wurde (B).

5. Diskussion

Sowohl der Ras/Raf- als auch der Wnt-Signalweg stehen seit Jahren im Brennpunkt der Medikamentenforschung und -entwicklung, weil deregulierte Signalwege in vielen Krankheiten, u. a. Tumorerkrankungen, zu finden sind. Die pharmazeutische Forschung beginnt die Wirkstofffindung oftmals mit Screenings einer großen Anzahl von chemischen Verbindungen im HTS. Dabei reichen jedoch biochemische Assays nicht aus, um die Komplexität der Wechselwirkungen eines möglichen Wirkstoffs auf den Organismus zu verstehen. Um im Medikamentenentdeckungsprozess so früh wie möglich potenzielle Probleme, wie z. B. Toxizität, festzustellen, sind zellbasierte Assays als Screeningmethoden sehr geeignet. Daher benötigen Signalwegforscher mehr Werkzeuge im Sinne von sensitiven, spezifischen Testverfahren, mit welchen man großflächig nach signalwegmodulierenden Wirkstoffen auf zellulärer Ebene suchen kann. Bis heute ist die nützlichste und am weitesten verbreitete Methode zur Untersuchung des Ras/Raf/MEK/ERK-Wegs, die SDS-PAGE gefolgt von Western-Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper. Obwohl diese Methode erfolgreich und reproduzierbar ist, hat sie den Nachteil sehr zeitaufwendig zu sein. Außerdem ist die Western-Blot-Analyse meist nur semi-quantitativ und nicht auf HTS anwendbar. Es gibt auch alternative Techniken, wie beispielsweise RNA- und Microarray-Screens, ELISA-Studien, Chemilumineszenz-Assays und weitere antikörperbasierte Assays (Eishingdrelo and Kongsamut, 2013). Die Entscheidung für eine dieser Methoden geht aber meist aus laboreigenen Kenntnissen und Vorlieben hervor, da jede dieser Techniken auch Nachteile aufweist, wie z. B. hohe Materialkosten, Anforderung spezieller Geräte oder notwendiger Zeitbedarf. In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Ansatz zum zellulären Screening in Bezug auf den Ras/Raf-Signalweg vorgestellt, welcher eine einfache, schnelle und kostengünstige Lösung durch den Einsatz von Fluoreszenzreporterzellen darstellt.

5.1 Das Modellsystem

Als Modellsystem wurde die Epithelzelllinie MDCK verwendet, welche erstmals von Gaush et al. beschrieben worden ist (Gaush et al., 1966). Sie ist über die letzten Jahrzehnte zu einem beliebten Modell u. a. für Untersuchungen zu Proteinwanderungen geworden (Cassio, 2013). Von dieser Zelllinie gibt es eine abgeleitete Variante mit einer v-H-Ras-Mutation namens MDCK-F3, welche einen dauerhaft aktivierten Ras/Raf-Signalweg besitzt. Diese Zellen dienten ursprünglich der Analyse von invasiven Eigenschaften in Abhängigkeit zur Expression von E-Cadherin (Behrens et al., 1989). Später wurde die MDCK-F3 Zelllinie als

Werkzeug in Phänotypassays für die Suche nach Ras/Raf-signalwegmodulierenden Substanzen entdeckt, da diese eine veränderte Zellmorphologie im Vergleich zu untransfizierten MDCK Zellen zeigen. Durch eine stark verminderte Expression von E-Cadherin wachsen MDCK-F3 Zellen spindelförmig, mesenchymal mit wenigen Zell-Zell-Kontakten anstatt einen epithelialen, mosaikartigen, gleichmäßigen Zellrasen mit stark ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten zu bilden. Dieser charakteristisch unterschiedliche, rücktransformierbare Phänotyp der MDCK-F3 Zellen diente bereits zur mikroskopischen Identifikation von Wirkstoffen, welche eine modulierende Eigenschaft auf den durch onkogenes H-Ras aktivierten Ras/Raf-Signalweg haben (Dekker et al., 2010; Karaguni et al., 2002; Knoth et al., 2009; Muller et al., 2004; Rusch et al., 2011). Ein essenzieller Schritt zur Aktivierung des Ras/Raf-Signalwegs ist die Interaktion des membrangebundenen Proteins Ras mit der Serin-Threonin-Kinase Raf, welche an die Innenseite der Zellmembran transloziert, dort aktiviert wird und schließlich die MAPK-Signalkaskade auslöst (siehe Kapitel 1.1.1). In MDCK-F3 Zellen sind demnach Raf-Proteine an der Membran zu finden, während in untransfizierten MDCK Zellen Raf überwiegend im Cytosol vorliegt. Aufgrund der unterschiedlichen Ras/Raf-Signalwegaktivität eignet sich die Kombination aus MDCK und MDCK-F3 Zelllinie bestens als System zur Entwicklung eines zellulären Assays, welcher die direkte Detektion einer Proteininteraktion erlaubt.

5.2 Entwicklung neuer Reporterzellen für die Anzeige von Raf/Ras-Signalwegveränderungen

Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg ist ein wichtiger Vermittler vieler biologischer Prozesse einschließlich zellulärer Proliferation, Apoptose, Angiogenese und Migration. Daher ist eine ordnungsgemäße Regulierung des Weges für die normale Zellfunktion entscheidend. Fehlerhafte Signalgebungen innerhalb der MAPK-Kaskade sind mit einer großen Anzahl von Krankheiten, z. B. vieler Tumorerkrankungen, verknüpft. Raf-Kinasen sind essentiell für die normale Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade, denn sie binden an aktiviertes Ras und übertragen Signale an die nachgeschalteten Kinasen MEK und ERK. Des Weiteren haben sie, von allen Hauptkomponenten dieses Signalwegs, die komplexesten Modulationsmechanismen einschließlich Änderungen in der subzellulären Lokalisierung sowie Proteinwechselwirkungen und Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsereignisse, die entweder positive oder negative regulatorische Effekte haben können (Wellbrock et al., 2004).

Daher kann die membranäre Translokation von Raf als Parameter für die Interaktion mit dem Membranprotein Ras und folglich für die Signalwegaktivierung dienen.

Die natürliche Fluoreszenz erlaubt als Anwendung in Fusionsproteinen faszinierende Untersuchungen, u. a. die Echtzeit-Beobachtung der Lokalisation von Proteinen und deren Wanderung in der lebenden Zelle. GFP und seine Varianten und Homologe dienen dabei als kopplungsfähige Fluorophore, um die Organisation und Funktion von lebenden Systemen zu studieren. Wird ein Gen mit einem Fluoreszenzproteingen im passenden Leserahmen kloniert, erhält man ein genetisches Konstrukt, welches in Zellen und Organismen übertragen werden kann, um dort die Lokalisierung des exprimierten Proteins von Interesse sichtbar zu machen (Wang and Hazelrigg, 1994).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde durch Herstellung von Transfektionsvektoren, die u. a. ein Fluorophor/c-Raf-Fusionsprotein kodieren, Reporterzelllinien gewonnen, welche auf ihre Funktionalität hin untersucht wurden.

5.2.1 Konstruktion der Vektoren

In dieser Arbeit wurden die Vektorkonstrukte pDisplay-EGFP-cRaf-neu2 und pcRaf-shift-mChery-N1 entwickelt. Im Vektor pDisplay-EGFP-cRaf-neu2 befindet sich die kodierende Region des c-Raf-Gens im Leseraster mit EGFP, während im Vektor pcRaf-shift-mChery-N1 die CDS von CRAF in den Leserahmen des mCherry-Gens kloniert wurde. In Publikationen wurde CRAF bzw. Teilabschnitte von CRAF mit GFP bereits erfolgreich fusioniert (Bondeva et al., 2002; Broggi et al., 2013; Trier et al., 1999). In den oben genannten Vektoren wurde das vollständige c-Raf-Gen eingefügt, um mögliche artifizielle Effekte genetischer Modifikationen zu vermeiden. Außerdem wurde sowohl eine N-terminale als auch eine C-terminale Verbindung konstruiert, um erdenkliche Funktions- oder Lokalisierungsprobleme durch die Verschmelzung des Fluoreszenzproteins an ein Ende der c-Raf-Kinase zu vermeiden. Am C-terminalen c-Raf-Ende befindet sich nämlich die Kinase-Domäne, welche spezifisch Phosphatreste von ATP auf Serin- und Threoninreste übertragen kann (Chong et al., 2001) und am N-terminalen Ende befindet sich die RBD, die selektiv nur GTP-gebundene Ras-Proteine bindet und für die Membranlokalisierung notwendig ist (Emerson et al., 1995). Da sowohl EGFP-c-Raf als auch c-Raf-mChery unter Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotor stehen, kann in transfizierten Zellen eine hohe Fluoreszenzintensität erreicht werden, welche nicht erst induziert werden muss. Die konstruierten Vektoren pDisplay-EGFP-cRaf-neu2 und pcRaf-shift-mChery-N1 wurden jeweils, auch nach allen

Zwischenschritten, durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung überprüft, danach wurden sie zur funktionellen Überprüfung in MDCK/MDCK-F3-Zellen eingesetzt.

5.2.2 Etablierung stabiler Reporterzelllinien

Zur Herstellung der Reporterzelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit die Vektorkonstrukte pDisplay-EGFP-cRaf-neu2 und pcRaf-shift-mCherry-N1 durch Lipofektion transient oder stabil in MDCK und MDCK-F3 Zellen transfiziert. MDCK Zellen zeigten sich als schwer transfizierbar, so dass verschiedene Lipofektionskits durchgetestet wurden. Der wichtigste Parameter war hierbei das DNA-Lipidreagenz-Verhältnis. Schließlich konnte das Transfektionsprotokoll von *Effectene* soweit optimiert werden, dass eine Transfektionseffizienz von bis zu 10 % erreicht wurde. Die ermittelte Transfektionsbedingung wurde für die weiteren Experimente beibehalten. Der Vorteil in der Verwendung von stabil transfizierten Zellen liegt in der Kosten- und Zeitersparnis sowie der Möglichkeit langfristige und reproduzierbare Untersuchungen mit einer wahrscheinlich geringeren experimentellen Ergebnisvariabilität durchführen zu können. Hingegen müssen Experimente nach transienter Transfektion sehr schnell und nur über kurze Zeiträume erfolgen, außerdem besteht die Gefahr einer großen Streuung innerhalb der erhaltenen Ergebniswerte aufgrund inhomogener Zellen. Bei der Herstellung stabil transfizierter, EGFP-c-Raf oder c-Raf-mCherry exprimierender Zelllinien, wurden die MDCK bzw. MDCK-F3 Zellen, die den Vektor aufgenommen hatten, durch das Antibiotikum Geneticinsulfat selektiert. Die ermittelte zytotoxische G418-Konzentrationen für MDCK-Zellen entspricht den in der Literatur gefundenen Dosisangaben von 800-1000 µg/ml (Fanning et al., 1998; Wen et al., 2015). Zur Selektion stabil transfizierter MDCK-F3-Zellen gibt es noch keine publizierten Daten, so dass die ermittelte zytotoxische Dosis von 500 µg/ml G418 gewählt wurde. Die relativ stark abweichende zytotoxische G418-Dosis der MDCK-F3-Zellen im Vergleich zu normalen MDCK-Zellen ist vermutlich durch die sehr viel geringere Kohärenz dieser Zellen zu erklären.

Zur stabilen Transfektion muss durch einen zufälligen Strangbruch des Vektors die DNA ins Genom der Zelle integrieren, dies geschieht nur bei ca. einer von 10^4 Zellen (Mortensen et al., 2001). Das Vorhandensein von nicht-fluoreszierenden, aber G418-resistenten Zellklonen kann auf einen möglichen Vektorstrangbruch im Leserahmen des Fluoreszenzgens zurückgeführt werden, infolgedessen kein Fluoreszenzprotein synthetisiert werden kann. Des Weiteren wäre durch die Vektorlinearisierung eine Zerstörung des CMV-Promotors denkbar, welche ebenfalls zu Klonen ohne Fluoreszenzexpression führen kann. Durch die ungerichtete

Integration der transfizierten DNA ins Zellgenom können auch unerwünschte Mutationen entstehen, welche unter Umständen verschiedene zelluläre Prozesse beeinträchtigen oder zelltypische Eigenschaften verändern können. Daher wurden die EGFP-c-Raf oder c-Raf-mCherry exprimierenden Klone nach Identifikation im Fluoreszenzmikroskop so lange expandiert bis anschließende Untersuchungen zur Charakterisierung möglich waren. Zunächst wurde der Erfolg der stabilen Transfektion auf DNA- und Proteinebene nachgeprüft. Aus allen, nach Existenz des Fusionproteins, getesteten Zellklonen wurden einzelne Reporterzelllinien ausgewählt, welche sich durch eine besonders starke Genexpression bzw. Proteinbildung auszeichneten.

Da es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, die genetische Information der c-Raf-gekoppelten Fluoreszenzproteine durch Transfektion in MDCK und MDCK-F3 Zellen zu integrieren und stabil zu exprimieren, stehen jetzt leicht kultivierbare Zelllinien mit entsprechendem Fusionsprotein zur Verfügung, welche in dieser Arbeit weiterführenden Untersuchungen unterworfen wurden.

5.2.3 Charakterisierung stabiler Reporterzelllinien

In alltäglichen Zellkulturarbeiten sind weder morphologische Unterschiede, noch differenzielle Wachstumsraten zwischen den Zelllinien aufgefallen, wobei MDCK-F3-Zellen aufgrund ihrer gering ausgeprägten Haftungseigenschaft insgesamt schwieriger zu handhaben waren als „normale“ MDCK-Zellen. Um das Wachstum der stabil transfizierten Zelllinien zu überprüfen, wurden Wachstumskurven erstellt. Dabei wurden die EGFP-c-Raf oder c-Raf-mCherry-Klone zum einen mit untransfizierten MDCK bzw. MDCK-F3-Zellen verglichen und zum anderen mit Kontrollzellen, die auf gleiche Weise mit dem Transfektionsvektor ohne CRAF-Insert transfiziert waren. Aus den Wachstumskurven, wurde ersichtlich, dass die MDCK-Klone eine ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit wie die untransfizierten MDCK-Kontrollzellen zeigten, wobei eine Tendenz zur zeitlichen Verzögerung im Erreichen des Wachstumsmaximum von ca. 24 Stunden zu bemerken war. Da der MDCK-EGFP-c-Raf- und MDCK-c-Raf-mCherry-Klon im Vergleich zur MDCK-wt-Zelllinie aber annähernd identisches Wachstumsverhalten und nur die transfizierten Kontrollzelllinien eine geringere Zellzahl zeigten, könnte der beobachtete Effekt wohl auf die unterschiedlichen Passagenzahlen der einzelnen Zelllinien zurückzuführen sein und weniger auf einen proliferationsstörenden Einfluss des eingeschleusten Proteins. Die Wachstumskurven der MDCK-F3-Klone zeigten ein recht einheitliches Bild, jedoch lag das Wachstumsmaximum aller Klone etwa 48 Stunden zeitverzögert zur MDCK-F3-Kontrollzelllinie vor. Die stabil

transfizierten Zellklone scheinen eine länger andauernde lag-Phase als die Kontrollzellen zu haben. Da diese Beobachtung jedoch für das weitere Vorhaben dieser Arbeit nicht von Bedeutung war, wurde das langsamere Wachstum nicht nähergehend untersucht.

Aus den Ergebnissen der zellmorphologischen Vergleichsstudie der stabil transfizierten Zellen wurde ersichtlich, dass sich alle untersuchten Zellklone im Lichtmikroskop phänotypisch nicht von ihren Ausgangszelllinien unterscheiden. Dies lässt darauf schließen, dass der zufällige genomische Einbau der Transfektionsvektoren sowie die konstitutive Expression des Fluoreszenzproteins bzw. Fluorophor-Fusionsproteins keinen Effekt auf die zelluläre Gestalt der Zellen haben. Die mikroskopischen Untersuchungen bezüglich des Vorhandenseins der Fluoreszenz und deren Lokalisation innerhalb der Zelle ergaben, dass die EGFP- bzw. mCherry-vermittelte Fluoreszenz in den MDCK-c-Raf-Klonen gleichmäßig über die ganze Zelle, vermutlich überwiegend im Zytoplasma, verteilt ist. Dies lässt sich durch die Annahme eines inaktiven Raf/Ras-Signalwegs erklären. Bei dem MDCK-F3-EGFP-c-Raf-Klon erscheint die Fluoreszenz vorwiegend an der Zellmembran, diese Lokalisation entspricht den Erwartungen, da MDCK-F3-Zellen einen dauerhaft aktiven Raf/Ras-Signalweg besitzen (siehe Kapitel 5.1). Durch die Interaktion des membrangebundenen Proteins Ras mit der Kinase Raf und die damit verbundene Translokation von Raf an die Innenseite der Membran wird der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs aktiviert (Avruch et al., 2001; Leever et al., 1994). Aufgrund der Tatsache, dass die Interaktion zwischen Ras und Raf ausschließlich an der Zellmembran stattfindet, ist die mittels Fluoreszenzmikroskopie detektierbare Färbung der Membran ein Indikator für die Ras-Raf-Proteininteraktion. Hingegen scheint der Zellklon MDCK-F3-cRaf-mCherry eher über die ganze Zelle hinweg zu fluoreszieren. Um ein nicht-funktionelles Fusionsprotein auszuschließen, wurde der Zellklon weiter geprüft.

5.3 Fluoreszenzbasierter Reporterzellassay zur Detektion der Raf/Ras-Proteininteraktion

Zellbasierte Assays spielen eine wichtige Rolle beim Aufspüren potenzieller Kinase-Inhibitoren in krankheitsrelevanten Signalwegen. Jedoch bleibt die Signaldynamik in lebenden Zellen, trotz ihrer grundlegenden Bedeutung, durch Mangel an geeigneten Hilfsmitteln in Zellmodellen schwierig zu untersuchen. Afshari et al. ist es 2014 gelungen eine duale Reporterstrategie zu entwickeln, welche es ermöglicht, die zelluläre Signaltransduktion des NF- κ B-vermittelten Signalwegs in Echtzeit sowohl zeit- als auch quantitativ durch Koexpression von GFP und Luciferase zu überwachen (Afshari et al., 2014). In einer Studie von Johnson et al. wurden *Live-Cell-Photobleaching*-Experimente in NIH

3T3-Fibroblasten durchgeführt, um die Rekrutierung von GFP-markiertem β -Catenin an Membran-Adhäsions-Übergängen (Zelladhäsion) zu bestimmen (Johnson et al., 2009).

Die hergestellten Reporterzellen wurden sowohl unter dem Fluoreszenzmikroskop als auch im *Live-Cell-Imaging* analysiert, da die Live-Visualisierung zusätzlich die Möglichkeit bietet, einzelne Zellreaktionen zeitabhängig aufzudecken. Es ist bekannt, dass der GDP-GTP-Austausch von Ras durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie z. B. EGF-Rezeptoren, stimuliert wird (Buday and Downward, 1993), ebenso ist bekannt, dass Sorafenib als Multikinaseninhibitor die Raf-Aktivität hemmt (Liu et al., 2006; Lowinger et al., 2002). Daher wurden die MDCK-cRaf-Fluorophor-Zellklone mit dem Wachstumsfaktor EGF [100 ng/ml] stimuliert und MDCK-F3-cRaf-Fluorophor-Klone mit dem c-Raf-Inhibitor Sorafenib [1 μ mol/l] inhibiert. Die verwendeten Effektor-Konzentrationen orientierten sich sowohl an den Ergebnissen aus der vorhandenen Literatur (Bondeva et al., 2002; Freeman et al., 2013; Lagas et al., 2010) als auch an selbst durchgeführten Tests, da für die Zelllinie MDCK-F3 noch keine publizierten Sorafenib-Daten vorlagen. Die Western-Blot-Ergebnisse verdeutlichen die Induzierbarkeit von pc-Raf in MDCK-cRaf-Fluorophor-Zellklonen nach EGF-Zugabe und die Inhibierung von pc-Raf in MDCK-F3-cRaf-Fluorophor-Zellklonen nach Sorafenib-Behandlung. In den Live-Cell-Studien konnte in MDCK-cRaf-Fluorophor-Zellklonen nach zehnminütiger EGF-Behandlung die höchstmögliche Fluoreszenzintensitätsverschiebung Richtung Zellmembran beobachtet werden. Vermutlich bleibt die Fluoreszenz im Zytoplasma dabei größtenteils noch bestehen, weil durch den konstitutiven CMV-Promotor mehr Raf Proteine in der Zelle vorlagen als eingesetzt werden konnten. Live-Cell-Imaging von MDCK-F3-cRaf-Fluorophor-Zellklonen nach Sorafenib-Behandlung wurde durch Eintrübung des Mediums beeinträchtigt. Störende Hintergrundfluoreszenz konnte am besten durch den Einsatz von Glasboden-Platten mit schwarzen Wänden sowie farblosen Medium reduziert werden. Aufnahmen mit höherer Vergrößerung und fixierten Proben wurden schließlich mithilfe eines konfokalen Mikroskops am Institut für physikalische und theoretische Chemie in Frankfurt erstellt. Hier konnte in den EGF-behandelten MDCK-EGFP-cRaf Zellklonen die gleiche Beobachtung gemacht werden wie in den Live-Cell-Aufnahmen, nämlich eine leichte Fluoreszenzverschiebung zur Zellmembran hin. Während in MDCK-F3-cRaf-mCherry-Zellklonen sich nach Sorafenib-Behandlung ein entgegengesetztes Bild abzeichnete, hier nimmt die definierte Fluoreszenzfärbung der Membran ab. In Abbildung 27 sind die oben beschriebenen Zellmodelle zur Analyse von Substanzwirkungen auf die Ras/Raf-Interaktion als Schema zusammengefasst dargestellt.

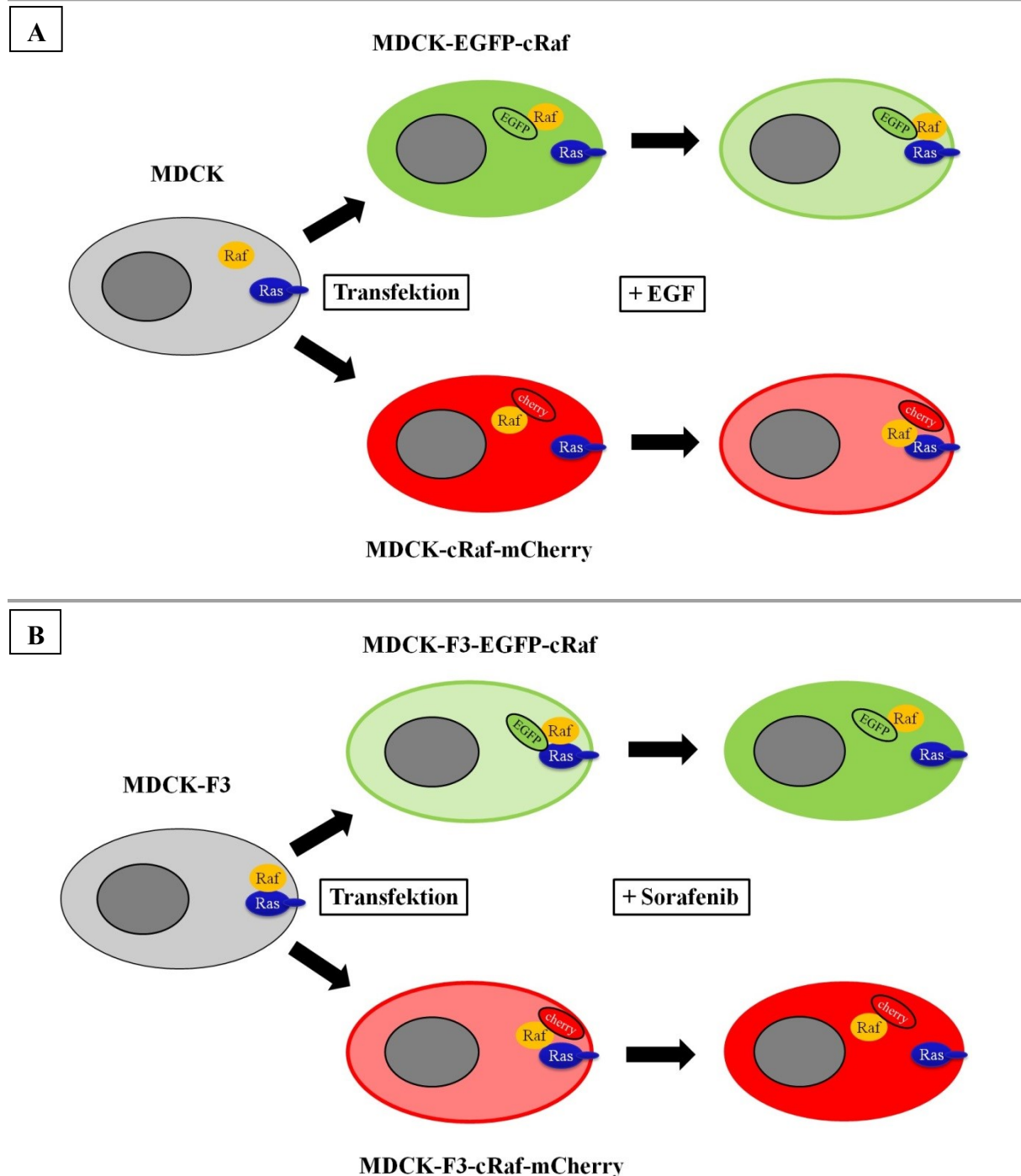


Abb. 27: Schematisierte Zellmodelle zur Analyse von Substanzwirkungen auf die Ras/Raf-Interaktion anhand ihrer Lokalisation. Nach Transfektion der MDCK bzw. MDCK-F3 Zellen entstehen MDCK/MDCK-F3-cRaf-mCherry und MDCK/MDCK-F3-EGFP-cRaf Zellen. In diesen Zellen wird das Protein c-Raf fusioniert mit dem grün fluoreszierenden Reporterprotein EGFP bzw. dem rot fluoreszierenden mCherry exprimiert. **A:** In MDCK Zellen mit inaktivem MAPK-Signalweg interagieren Raf und Ras nicht miteinander, die Zellen zeigen Cytosolfärbung. Die Aktivierung durch EGF führt zur Wanderung von cRaf-Fusionsprotein an die Membran und damit zur Membranfärbung. **B:** Die beiden Proteine Raf und Ras interagieren in MDCK-F3 Zellen dauerhaft an der Zellmembran. Die Membran zeigt stärkere Fluoreszenz als das Cytosol. Nach Inhibition der Interaktion wandert das Fusionsprotein EGFP-cRaf/cRaf-mCherry ins Cytosol, das daraufhin intensiver gefärbt ist.

Die zahlreichen kugelförmigen Anhäufungen, welche man in den Zellen sehen konnte, könnten vermutlich Aggregatbildungen sein, welche beispielsweise von falsch gefalteten Proteinen stammen oder der Tatsache geschuldet sind, dass EGFP und mCherry doch nicht nur als reine Monomere vorkommen, sondern evtl. wie andere GFP-ähnliche Proteine eine mehr oder weniger ausgeprägte Neigung zur Oligomerisierung haben. Die häufig beobachtete Abnahme bzw. gänzliches Verschwinden, vor allem der grünen Fluoreszenz nach einigen Zellpassagen könnte durch einen allmählichen Verlust des Gens oder dessen Promotor erklärt werden. Allerdings konnte das EGFP-Gen in den nicht-fluoreszierenden Klonen immer noch durch PCR nachgewiesen werden. Da die verminderte Expression des EGFP nur im Phänotyp und nicht im Genotyp beobachtet werden konnte, ist diese möglicherweise durch epigenetische Veränderungen begründet.

Die Zellen eignen sich aufgrund der geringen Reaktivitätsausbeute im Moment noch nicht zur Hochdurchsatzanalyse, jedoch kann die Reaktivität sowie Signalstärke der Reporterzellen wahrscheinlich durch Modifikationen des Transfektionsvektors noch dahingehend verbessert werden. So könnte die CRAF Sequenz im Fusionskonstrukt auf die Ras-Bindedomäne einschließlich cysteinreicher Domäne verkürzt werden, wie es beispielsweise auch Bondeva et al. mit einem c-Raf-GFP Fusionsprotein in einer Fibroblasten-Live-Cell-Studie vorgeschlagen hat. Die Membranlokalisierung von vollständigen c-Raf-GFP war, trotz starker Bindung an Ras und der darauffolgenden Aktivierung des MAPK-Signalwegs, fluoreszenzmikroskopisch weniger erkennbar als die Bindung der gekürzten c-Raf-GFP-Variante (Bondeva et al., 2002). Ein anderes mögliches Problem, welches zur ungenauen Lokalisation oder Funktionsbeeinträchtigung des fluoreszenzmarkierten c-Raf führen kann, ist eine zu lange Aminosäure-Linkersequenz, die das Fluoreszenzprotein mit c-Raf verbindet. In der Literatur wird empfohlen den Linker nicht länger als zehn Aminosäuren lang zu konstruieren, um eine korrekte Faltung sowohl des Fluoreszenzproteins als auch des c-Raf-Proteins sicherzustellen (Chen et al., 2013). Da sich insbesondere die Aminosäure Glycin, mit der kleinsten Seitenkette und größtmöglichen Flexibilität, im Bereich des Linkers anbietet, könnte man diesen wesentlich glycinreicher gestalten, um mögliche sterische Probleme zu vermeiden (Argos, 1990). Vor einigen Jahren wurde erkannt, dass die Raf-Kinasen, unter rasabhängiger Aktivierung an der Plasmamembran, Dimere bilden können (Garnett et al., 2005; Rushworth et al., 2006). Dieser Dimerisierung sollte das Fusionsprotein nicht im Wege stehen. Da in der Raf-Kinase sowohl der N- als auch der C-Terminus zur Lokalisierung und Interaktion benötigt werden, könnte auch versucht werden das Fluoreszenzprotein in der Mitte der Sequenz z. B. in eine Seitenkette oder flexible Schleife des Zielproteins zu insertieren

(Chudakov et al., 2010). Auch die Austestung der Transfektionsvektoren in anderen Zelllinien, vor allem in humanen, könnte sich lohnen, da die Ras-Isoformen zwischen Mensch und Hund mit 98-100 % Homologie in der Aminosäuresequenz zwar hoch konserviert sind (Mochizuki and Breen, 2016), aber ein humanes c-Raf-Konstrukt möglicherweise spezifischer mit einem humanen Ras-Protein interagieren könnte.

5.4 Simultane Visualisierung des Ras/Raf- und des Wnt-Signalweges

Da Signalwege nicht als isolierte Einheit sondern vielmehr als Netzwerke anzusehen sind, welche untereinander kommunizieren und sich gegenseitig beeinflussen, sollte die grundlegende Idee getestet werden, mehrere Signalwege parallel innerhalb einer Zelle visualisieren zu können. Interaktionen zwischen dem Ras/Raf- und dem Wnt-Signalweg werden erst seit einigen Jahren erforscht. Anhand verschiedener experimenteller Ansätze und Modellsysteme wurde eine Vielzahl von molekularen Mechanismen identifiziert, durch die die Signaltransduktion von Wnt/ β -Catenin und Ras/Raf entweder synergistisch oder antagonistisch wechselwirken, wobei die *Crosstalk*-Interaktionen sowohl auf der Ebene von Liganden und Rezeptoren als auch auf zytosolischer Ebene durch Wechselwirkung von Kinasen oder auf nukleärer Ebene durch gemeinsame Regulation der Zielgen-Transkription stattfinden können (Zeller et al., 2013). Beispielsweise führt in Melanomen ein hyperaktiviertes MAPK-Signal zu einem reduzierten Wnt/ β -Catenin-Signalweg, während in Kolonkarzinomen ein aktivierter Wnt-Signalweg zu einer Ras-Stabilisierung und folglich zur Aktivierung der Ras/Raf-Signalkaskade führt (Guardavaccaro and Clevers, 2012). Wang et al. demonstrierten die Bedeutung des *Crosstalks* zwischen Signalwegen in ihren Untersuchungen, welche darauf hinweisen, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg den Ras/MAPK- sowie PI3K/Akt-Signalweg durch Regulierung des Phosphorylierungszustands von ERK1/2, JNK/SAPK und Akt1-Protein in Hepatokarzinomzellen HepG2 regulieren kann (Wang et al., 2011). Desweiteren stellten Li et al. fest, dass onkogenes K-Ras die Wnt-Signalisierung bei Darmkrebs durch Hemmung von GSK-3 β stimuliert (Li et al., 2005). Diese Stimulierung des Wnt/ β -Catenin-Weg in kolorektalen Karzinomen durch die onkogene KRAS/BRAF-Signalaktivierung wurde auch durch Lemieux et al. belegt (Lemieux et al., 2015). In MDCK-Zellen wurden bislang noch keine *Crosstalk*-Untersuchungen zwischen Ras/Raf- und Wnt-Signalweg durchgeführt.

Die Arbeitsgruppe um Korinek publizierte vor 20 Jahren das DNA-Bindemotiv namens TOP (*TCF optimal binding site*), an das der β -Catenin/TCF/LEF-Transkriptionskomplex bei Aktivierung des Wnt-Signalwegs bindet (Korinek et al., 1997). Dieses TOP-Motiv befindet

sich als Promotor sechsmal hintereinanderliegend vor dem Gen egfp im Reportergenkonstrukt „pDisplay-SuperTop-EGFP-neu4“ (Fiebeck, 2014). Die bereits gewonnene, stabil transfizierte Zelllinie MDCK-F3-cRaf-mCherry wurde mit diesem Reportergenkonstrukt zusätzlich transfiziert. Durch das Doppeltransfektionsexperiment (siehe Kapitel 4.4) konnte gezeigt werden, dass eine gleichzeitige fluoreszenzbasierte Detektion des Ras/Raf- und des Wnt-Signalwegs grundsätzlich möglich ist. Da jedoch mit dieser nur kurzandauernden transienten Transfektion keine funktionellen Untersuchungen, wie Aktivierungs- und Inhibierungsversuche, durchgeführt werden können, müsste eine stabile Doppeltransfektante angestrebt werden.

5.5 Effekte von Wnt-Proteinen auf die Proliferation von HEK293T Zellen

Wnt-Proteine sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt, unter anderem auch in der Genexpressionsregulation von Genen des Zellzyklus und der Proliferation (Rao and Kuhl, 2010). Das Wnt-Protein Wnt-3a fördert die Proliferation und Migration von humanen Epithelzellen der Linse (Bao et al., 2012) und die Proliferation von Fibroblasten (Yun et al., 2005). Desweiteren fungiert Wnt-3a z. B. auch als Regulator der Proliferation von Pankreas NIT-1-beta Zellen (Gui et al., 2013).

In dieser Arbeit sollten die proliferativen Auswirkungen von Wnt-Proteinen auf HEK293T Zellen bestimmt werden. Hierzu wurde die Aktivierung des Signalwegs extrazellulär durch rekombinante Liganden bewirkt. Es gibt eine Vielzahl an Methoden, die zur Erfassung der Proliferation eukaryotischer Zellen eingesetzt werden können. Ausgewählt wurden zwei Methoden, die für die Analyse der Proliferationsraten von kultivierten Zellen sehr verbreitet sind, nämlich der MTT- und der BrdU-Assay.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass MYC und CCND1 Zielgene des Wnt-Signalwegs in Säugetierzellen sind. Beispielsweise entdeckte Yoon et al. mittels RNAi-Screen, dass der Wnt-Signalweg die mitochondriale Biogenese aktiviert, denn es wurden Gene identifiziert, welche die mitochondriale Funktion beeinflussen, u. a. MYC (Yoon et al., 2010). Um die Wirkung von Wnt-3a auf den Wnt-Signalweg in HEK293T-Zellen zu beweisen, wurde nach 24 Stunden Wnt-3a-Behandlung die Induktion von β -Catenin nachgewiesen und die Expressionslevels von MYC und CCND1 analysiert. Das Niveau der beiden Zielgene erhöhte sich ebenfalls nach 24 Stunden Wnt-3a-Exposition. C-Myc spielt eine Schlüsselrolle im Fortschreiten der G1-Phase des Zellzyklus, denn es reguliert Cyclin D1 (Daksis et al., 1994) und unterdrückt p21 und p27 (Gartel et al., 2001; Yang et al., 2001). Cyclin D1 fördert wiederum die Phosphorylierung und Inhibierung des Retinoblastom-

Komplexes, welcher selbst den Cyclin-E-Spiegel reguliert (Malumbres and Barbacid, 2009; Niehrs and Acebron, 2012). Die Anreicherung von Cyclin E führt dann zum Übergang des G1/S-Phase-Kontrollpunktes (Dulic et al., 1992). Während der G1-Phase müssen Mitochondrien eine hohe Energiemenge für die Biosynthese von zahlreichen zellulären Komponenten bereitzustellen (Antico Arciuch et al., 2012). Auf diese oxidative Phase folgt ein reduktiver Abschnitt während der S-/G2-/M-Phase des Zellzyklus, in welcher die Replikation von DNA und Proliferation von Mitochondrien stattfindet (Martinez-Diez et al., 2006).

Die Proliferationsraten von Wnt-3a behandelten HEK293T Zellen waren ungleich, wenn sie durch die beiden, in dieser Studie verwendeten, Assays gemessen wurden. Zu erklären ist dieser Unterschied durch die verschiedenen Detektionsmechanismen dieser Methoden. Der MTT-Assay misst die Aktivität der Mitochondrien, der BrdU-Assay hingegen detektiert die relative Menge an neu synthetisierter DNA. Eine Studie von Wagner et al. bezieht sich auf eine hoch signifikante Beziehung zwischen BrdU- und MTT-Assay in ihren Ergebnissen in Bezug auf die Proliferation von caninen Lymphozyten, obwohl der BrdU-Assay nachweislich sensitiver als der MTT-Assay ist (Wagner et al., 1999). Denn der zelluläre DNA-Gehalt sollte, im Gegensatz zur Zellmasse bzw. dem Proteingehalt der Zellen, im gleichen Maß wie die Zellzahl ansteigen. Es wäre hingegen vorstellbar, dass während der exponentiellen Wachstumsphase die Zellteilungen schneller als die Proteinbiosynthese stattfinden, so dass viele kleine Zellen mit weniger Mitochondrien vorhanden sind.

Der scheinbar negative Effekt von Wnt-3a auf die HEK293T Zellanzahl im MTT-Assay konnte durch einen Rückgang der Mitochondrienaktivität erklärt werden. Der BrdU-Assay, im gleichen Versuchsansatz, zeigte hingegen einen fördernden Effekt auf die DNA-Synthese in diesen Zellen. Die Experimente zur Feststellung der Mitochondrienaktivität wiesen darauf hin, dass nach 24 Stunden Wnt-3a-Behandlung das SDHA-Level anstieg. SDH ist als Marker für mitochondriale Aktivität bekannt, denn das Protein spielt eine Schlüsselrolle im Elektronentransport des Komplex II der Atmungskette (Antonicka et al., 2013; Jo et al., 2015; Sullivan et al., 2013). Die Aktivierung mit rekombinantem Wnt-3a hat nach 48 Stunden oder später wahrscheinlich keine Wirkung mehr auf die mitochondriale Aktivität. Die abnehmende Wachstumsrate während des MTT-Assays nach 48 und 72 Stunden entspricht dieser zeitlich begrenzten Wirkung. Dies wird auch durch die abnehmende Akkumulation von β -Catenin nach 24 Stunden Wnt-3a-Behandlung bestätigt. Andere Publikationen unterstützen diese Annahme, dass Wnt-3a-behandelte Zellen nur während eines Zeitraums von 24 Stunden einen erhöhten β -Catenin-Spiegel anzeigen (Gujral and MacBeath, 2010; Macaulay et al., 2013).

Man kann die Ergebnisse, die teilweise gegensätzlich zur publizierten proliferativen Wirkung von Wnt-3a stehen, durch die Tatsache erklären, dass die meisten Studien Wnt-3a-überexprimierte Zellen, Wnt-3a-konditioniertes Medium oder serumausgehungerte Zellen mit rekombinanten Wnt-Proteinen zur Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs verwenden. Nach Voruntersuchungen (Daten nicht gezeigt) hat sich herausgestellt, dass sich HEK293T Zellen in serumfreiem Medium sehr schlecht kultivieren lassen, da sich die Zellen vom Kulturgefäßboden ablösen. Der Serummangel ist vermutlich ein Stressfaktor für die Zellen. Desweiteren hat sich in diesen Voruntersuchungen, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Chen et al., gezeigt, dass FCS allein nicht in der Lage ist den Wnt-Signalweg durch β -Catenin-Anreicherung zu aktivieren (Chen et al., 2000b), weshalb in dieser Studie auf serumreduziertes Medium verzichtet wurde.

Zum Vergleich der erhaltenen Proliferationsresultate wurden die HEK293T Zellen unter denselben Versuchsbedingungen mit dem Liganden Wnt-5a behandelt. Wnt5a ist beispielsweise als Regulator der Proliferation und Apoptoseresistenz in Fibroblasten (Vuga et al., 2009) sowie als Regulator der Endothelzellproliferation und -migration bekannt (Cheng et al., 2008). Aus BrdU- und MTT-Assay wurde ersichtlich, dass Wnt-5a in HEK293T Zellen sowohl die DNA-Synthese als auch die mitochondriale Aktivität in ähnlicher Weise, nämlich durch eine geringe Erhöhung der Proliferation, beeinflusst. Diese Proliferationssteigerung durch Wnt-5a wurde auch von Jia et al. bestätigt (Jia et al., 2008). Die Ergebnisse der HEK293T-Proliferation kann man im Vergleich zu den Ergebnissen, welche durch den Liganden Wnt-3a erhalten wurden, dadurch erklären, dass Wnt-5a als Mitglied des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs bekannt ist, während der Ligand Wnt-3a dem β -Catenin-abhängigen (kanonischen) Wnt-Signalweg zugeordnet ist und die Zellen bzw. Wnt-Zielgene dadurch auf unterschiedliche Weise reguliert werden. Andere Arbeiten haben aber auch gezeigt, dass bestimmte Wnt-Liganden, wie Wnt-5a, in der Lage sind, mehr als nur einen Wnt-Signalweg zu aktivieren, so dass diese alte, binäre Klassifikation nach heutigem Forschungsstand nicht mehr sinnvoll erscheint (McDonald and Silver, 2009; Mikels and Nusse, 2006). Die Aktivierung der unterschiedlichen Wnt-Signalwege hängt somit vermutlich eher vom zellulären Kontext und weniger von der Wnt-Proteinsequenz selbst ab (Willert and Nusse, 2012).

Als zusätzlichen Vergleich der Proliferationsergebnisse von BrdU- und MTT-Assay in HEK293T Zellen wurde die humane Kolonkrebszelllinie HT29, welche einen durch APC-Mutation dauerhaft aktiven kanonischen Wnt-Signalweg besitzt (Ilyas et al., 1997), herangezogen. Eine zusätzliche Aktivierung dieses Signalwegs durch Zugabe von Wnt-3a

ergab laut MTT-Assay keinen weiteren Einfluss auf das Zellwachstum bzw. die Aktivität der Mitochondrien. Zusätzliche Wnt-3a-Zugabe wirkte gering stimulierend auf die DNA-Synthese. Der Effekt ist aber im Vergleich zur HEK293T-Zelllinie weit weniger ausgeprägt. Die Zugabe von Wnt-5a auf HT29 Zellen zeigte nach 24 Stunden weder eine gesteigerte Mitochondrienaktivität noch DNA-Neusynthese. Eine Korrelation zwischen Zellzahl und Wnt-Konzentration konnte jedoch nach 48 Stunden festgestellt werden. Diese Korrelation trat im Fall der DNA-Neusynthese auch nach 72 Stunden noch auf, wohingegen der Einfluss von Wnt-5a auf die Mitochondrienaktivität nachließ. Voloshanenko et al. zeigte, dass auch Darmkrebszelllinien exogene Wnt-Liganden für die vollständige Signalwegaktivierung und das Zellüberleben benötigen, unabhängig von der Anwesenheit von APC- oder β -Catenin-Mutationen, diese senken lediglich die Schwelle der Signalwegaktivierung durch die Wnt-Proteine (Voloshanenko et al., 2013).

Insgesamt beeinflussen die verschiedenen Isoformen der Wnt-Moleküle die Mitochondrienaktivität und DNA-Neusynthese der Zellen in unterschiedlichem Maße. Im Hinblick auf die Feststellung des Zellwachstums kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass es nicht ausreicht nur eine Methode zur Proliferationsbestimmung zu verwenden, um definitive Klarheit über die zelluläre Wachstumsrate zu bekommen. Da die Ergebnisse des BrdU-Assays in HEK293T Zellen bei Wnt-3a-Behandlung eine insgesamt größere Zellzahlsteigerung zeigten als im Vergleich mit Wnt-5a-Zugabe, wurde der Ligand Wnt-3a für weitere Arbeiten gewählt. Zudem ist Wnt-3a als Aktivator des Wnt/ β -Catenin-Signalweg bekannt, welcher u. a. die Zellproliferation reguliert.

Die Wnt-3a-Proliferationsstudie diente zur Aufklärung der dosis- und zeitabhängigen Wnt/ β -Catenin-Signalweginduzierung. Die dabei erhaltenen Parameter konnten für weitere Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe, u. a. für die induzierbare, fluoreszenzbasierte zelluläre Visualisierung des Wnt-Signalweges verwendet werden.

5.6 Ausblick

5.6.1 Reporterzellassay für die Anzeige von Raf/Ras-Signalwegveränderungen

Die zunehmende Zahl wissenschaftlich publizierter zellbasierter Assays und High-Content-Screenings in den letzten Jahren dokumentiert das damit einhergehende Potential neue Wirkstoffe gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Krankheiten zu entdecken. Nicht zuletzt der demographische Wandel unserer Gesellschaft und die damit verbundene Zunahme an altersbedingten Erkrankungen in den kommenden Jahrzehnten werden das Gesundheitssystem

vor große Anforderungen stellen. Auch bei der Mehrzahl der Krebsarten, wie Darm- oder Prostatakrebs, steigt das Erkrankungsrisiko mit dem Alter an. In Deutschland sind Krebserkrankungen nach Herz-Kreislauferkrankungen bereits die zweithäufigste Todesursache. Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts Berlin sind im Jahr 2012 in Deutschland etwa 252.000 Männer und 225.000 Frauen an Krebs erkrankt, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 69 Jahren, bei Männern bei 70 Jahren liegt (RKI and GEKID, 2015). Daher ist es notwendig neue Wirkstoffe zur effektiven Behandlung mit gleichzeitiger Sicherstellung der Lebensqualität zu finden. Seit Ende des letzten Jahrtausends stehen bereits einige zielgerichtet wirkende Medikamente zur Verfügung, welche sich gegen spezielle Angriffspunkte auf oder in der Tumorzelle richten. Somit können gezielt Signalwege, welche in Tumorzellen überexprimiert sind und zum unkontrollierten Wachstum führen, inhibiert und gleichzeitig unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden. Aber die Entwicklung neuer Medikamente bis hin zur Marktzulassung ist ein langwieriger Prozess mit enormen Kosten. Deshalb müssen pharmazeutische Unternehmen die ungeeigneten Wirkstoffkandidaten so früh wie möglich aus dem Entwicklungsprozess entfernen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Zelllinien können hierbei ein Hilfsmittel in der frühen Wirkstofffindung sein. Sie können zur Erforschung möglicher Inhibitoren des Raf/Ras-Signalwegs innerhalb eines zellbasierten Therapeutika-Screenings bzw. der Wirkstoffentwicklung eingesetzt werden, da sie die direkte Detektion der Raf/Ras-Interaktion unter dem Fluoreszenzmikroskop ermöglichen. Ein denkbarer nächster Schritt in Richtung realitätsgetreue Zellkulturmodelle wären beispielsweise 3D-Zellkulturen, welche die *in vivo*-Situation besser wiedergeben als ein zweidimensionaler Zellrasen. So werden bei der 3D-Zellkultur die Zellen möglichst wirklichkeitsgetreu zum dreidimensionalen Wachstum angeregt. Dies spielt für die Überprüfung von neuen Krebsmedikamenten eine immer bedeutsamere Rolle. Desweiteren können die erzeugten Zelllinien natürlich auch der allgemeinen Signalweg-Grundlagenforschung, z. B. zur Identifikation neuer Gene, die einen Einfluss auf die Raf/Ras Proteininteraktionen haben, dienen.

Hinsichtlich der simultanen Visualisierung sowohl des Raf/Ras- als auch des Wnt-Signalwegs in derselben Zelle, wurde der Weg zur Etablierung einer stabilen Doppeltransfektanten vorbereitet, welche beispielsweise in Inhibierungsversuchen nicht nur die Aktivität der Raf/Ras-Proteininteraktion, sondern gleichzeitig auch die Aktivität des Wnt-Signalwegs sichtbar macht. Mit Hilfe dieser Verknüpfung könnte erstens viel Zeit bei der Wirkstofffindung gespart werden und zweitens mögliche *Crosstalks* der beiden Signalkaskaden aufgedeckt werden, welche man im Anschluss genauer untersuchen könnte.

5.6.2 Proliferationsstudien Wnt-induzierter HEK293T-Zellen

Die Zellzahl ist ein sehr beliebter Parameter, um die Proliferation von Zellen zu beschreiben. Es gibt viele unterschiedliche Methoden diese zu bestimmen z. B. durch die direkte Zellauszählung in einer Neubauer-Zählkammer kann man relativ schnell und kostengünstig eine Zu- oder Abnahme der Zellzahl ermitteln. Aber auch andere, indirekte Methoden zur Zellzahlbestimmung haben sich in der Forschung seit vielen Jahren etabliert. Da im direkten Ergebnisvergleich der Methoden BrdU und MTT, im Bezug auf die Fragestellung der Wnt3a induzierten proliferativen Wirkung auf Zellen, Diskrepanzen festgestellt wurden, sollten diese durch weitere Versuche genauer überprüft werden. So wird es für die zukünftige Aufklärung wichtig sein, die zellulären Bedingungen im Detail näher zu untersuchen, zum Beispiel könnten *Crosstalks* mit anderen mitogenen Signalwegen eine Rolle spielen. Eine wichtige Voraussetzung für die Erfassung des DNA-Gehalts im BrdU-Assay ist ein gleichbleibender Ploidiegrad der Zellen, deshalb könnte man diesen in den verwendeten, zahlreich passagierten HEK293T Zellen untersuchen. Desweiteren könnte man mithilfe der Durchflusszytometrie die SubG1-Fraktion der Zellen bestimmen, um so weitere Aufklärung über den DNA-Gehalt der Zellen zu erhalten. Zur Auswertung der Zellproliferation würde das direkte Zählen von Zellen durch optische Methoden vermutlich am besten die reale Situation spiegeln und sollte daher parallel mitgetestet werden. Es wäre interessant, dann die entsprechenden Resultate mit den Ergebnissen der indirekten Assays wie BrdU und MTT zu vergleichen. Für zukünftige Zellproliferationsexperimente kann man festhalten, dass es nicht ausreicht sich auf nur eine Methode zu verlassen, sondern man sollte um definitive Gewissheit über die zelluläre Proliferationsrate zu bekommen, auf unterschiedliche Methoden zurückgreifen. Im Umkehrschluss sollte man Veröffentlichungen mit Zellwachstumsergebnissen, welche sich nur auf eine einzige Proliferationsmethode stützen, sehr kritisch betrachten und die publizierten Ergebnisse versuchen zu verifizieren, bevor man diese als Grundlage für weitere Experimente heranzieht.

5.7 Zusammenfassung

Der MAPK-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der Zellproliferation. Die Signaltransduktionskette reguliert Rezeptorsignale von der äußeren Zellmembran zum Zellkern, wo schließlich die Genexpression durch signalwegaktivierte Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Mutationen in diesem Signalweg führen zu unkontrollierter Proliferation und sind in vielen Tumoren zu finden. Mutiertes Ras-Protein, welches die aktivierte Form, Ras-GTP, stabilisiert, führt zu kontinuierlicher Stimulation des Signalweges und damit zu unkontrolliertem Zellwachstum und ist in 30 % aller Tumoren zu finden. Um möglichst schnell potentielle, neue Medikamente zur Krebstherapie zu finden, ist es daher sinnvoll, diesen Signalweg in Zellen zu visualisieren. Deshalb sollte in dieser Arbeit ein fluoreszenzbasierter Zellassay entwickelt werden, welcher die Aktivität des Ras/Raf-Signalwegs direkt detektieren kann. Hierzu wurden Transfektionsvektoren erstellt, in denen die CRAF-cDNA mit dem Gen für EGFP bzw. mCherry gekoppelt wurde. Durch Transfektion von MDCK und MDCK-F3 Zellen mit den erstellten c-Raf-Fluorophor-Konstrukten konnten mehrere, stabil exprimierende Klone selektiert und kultiviert werden. Der Nachweis der c-Raf-Fluorophorexpression wurde mittels Western-Blot-Analyse und PCR durchgeführt. Die jeweils am besten geeigneten Klone wurden für anschließende Charakterisierungen herangezogen. Die so gewonnen Zelllinien wurden für fluoreszenzmikroskopische Aktivierungs- bzw. Inhibierungsversuche verwendet. Die Fusion eines Fluoreszenzproteins an das Ras-Effektorprotein c-Raf verhilft somit zur direkten mikroskopischen Detektion eines aktivierten Ras/Raf-Signalwegs in Zellen. Dieses Detektionssystem kann in Zukunft zur Wirkstofffindung beitragen.

Auch der Wnt-Signalweg, welcher in vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose involviert ist, kann bei Fehlregulation zur Tumorentstehung führen. Daher wurde die prinzipielle Möglichkeit der Herstellung einer sowohl Raf/Ras- als auch Wnt-Signalwegaktivität anzeigenden Doppeltransfektanten verifiziert. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass Proliferationsergebnisse von BrdU und MTT-Assays in Wnt-3a-stimulierten HEK293T-Zellen wenig vergleichbar sind. Die Differenzen der beiden Proliferationsassays lassen sich durch die unterschiedlichen Anwendungspunkte erklären, nämlich einerseits die mitochondriale Aktivität (MTT) und andererseits die Synthese von DNA (BrdU). Um endgültige Beweise für die zelluläre Proliferationsrate zu bekommen, könnte die Interpretation der Ergebnisse einer einzigen Methode irreführend sein. In Anbetracht dessen ist es zu empfehlen stets mehrere Methoden zu verwenden.

6. Literatur

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO journal* *16*, 3797-3804.
- Abraham, V.C., Taylor, D.L., and Haskins, J.R. (2004). High content screening applied to large-scale cell biology. *Trends in biotechnology* *22*, 15-22.
- Afshari, A., Uhde-Stone, C., and Lu, B. (2014). Live visualization and quantification of pathway signaling with dual fluorescent and bioluminescent reporters. *Biochemical and biophysical research communications* *448*, 281-286.
- Almeida, M., Han, L., Bellido, T., Manolagas, S.C., and Kousteni, S. (2005). Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *The Journal of biological chemistry* *280*, 41342-41351.
- An, W.F. (2009). Fluorescence-based assays. In *Cell-based assays for high-throughput screening* (Humana Press), pp. 97-107.
- An, W.F., and Tolliday, N.J. (2009). Introduction: cell-based assays for high-throughput screening. *Methods in molecular biology* *486*, 1-12.
- Antico Arciuch, V.G., Elguero, M.E., Poderoso, J.J., and Carreras, M.C. (2012). Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxidants & redox signaling* *16*, 1150-1180.
- Antonicka, H., Sasarman, F., Nishimura, T., Paupe, V., and Shoubbridge, E.A. (2013). The mitochondrial RNA-binding protein GRSF1 localizes to RNA granules and is required for posttranscriptional mitochondrial gene expression. *Cell metabolism* *17*, 386-398.
- Araki, Y., Okamura, S., Hussain, S.P., Nagashima, M., He, P., Shiseki, M., Miura, K., and Harris, C.C. (2003). Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer research* *63*, 728-734.
- Argos, P. (1990). An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *Journal of molecular biology* *211*, 943-958.
- Aronov, A.M., Tang, Q., Martinez-Botella, G., Bemis, G.W., Cao, J., Chen, G., Ewing, N.P., Ford, P.J., Germann, U.A., Green, J., *et al.* (2009). Structure-guided design of potent and selective pyrimidylpyrrole inhibitors of extracellular signal-regulated kinase (ERK) using conformational control. *Journal of medicinal chemistry* *52*, 6362-6368.
- Auld, D.S., Thorne, N., Nguyen, D.T., and Inglese, J. (2008). A specific mechanism for nonspecific activation in reporter-gene assays. *ACS chemical biology* *3*, 463-470.
- Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J.M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D., and Zhang, X.F. (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent progress in hormone research* *56*, 127-155.
- Avruch, J., Zhang, X.F., and Kyriakis, J.M. (1994). Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends in biochemical sciences* *19*, 279-283.

- Bao, X.L., Song, H., Chen, Z., and Tang, X. (2012). Wnt3a promotes epithelial-mesenchymal transition, migration, and proliferation of lens epithelial cells. *Molecular vision* 18, 1983-1990.
- Behrens, J., Mareel, M.M., Van Roy, F.M., and Birchmeier, W. (1989). Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *The Journal of cell biology* 108, 2435-2447.
- Beroud, C., and Soussi, T. (1996). APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic acids research* 24, 121-124.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., and Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225-230.
- Biechele, T.L., Kulikauskas, R.M., Toroni, R.A., Lucero, O.M., Swift, R.D., James, R.G., Robin, N.C., Dawson, D.W., Moon, R.T., and Chien, A.J. (2012). Wnt/beta-catenin signaling and AXIN1 regulate apoptosis triggered by inhibition of the mutant kinase BRAFV600E in human melanoma. *Science signaling* 5, ra3.
- Bikkavilli, R.K., Feigin, M.E., and Malbon, C.C. (2008). G alpha o mediates WNT-JNK signaling through dishevelled 1 and 3, RhoA family members, and MEKK 1 and 4 in mammalian cells. *Journal of cell science* 121, 234-245.
- Bikkavilli, R.K., and Malbon, C.C. (2009). Mitogen-activated protein kinases and Wnt/beta-catenin signaling: Molecular conversations among signaling pathways. *Communicative & integrative biology* 2, 46-49.
- Bondeva, T., Balla, A., Varnai, P., and Balla, T. (2002). Structural determinants of Ras-Raf interaction analyzed in live cells. *Molecular biology of the cell* 13, 2323-2333.
- Boon, E.M., Keller, J.J., Wormhoudt, T.A., Giardiello, F.M., Offerhaus, G.J., van der Neut, R., and Pals, S.T. (2004). Sulindac targets nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signalling in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis and in human colorectal cancer cell lines. *British journal of cancer* 90, 224-229.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D.I., and Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94, 109-118.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brembeck, F.H., Schwarz-Romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M., and Birchmeier, W. (2004). Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes & development* 18, 2225-2230.
- Broggi, S., Martegani, E., and Colombo, S. (2013). Live-cell imaging of endogenous Ras-GTP shows predominant Ras activation at the plasma membrane and in the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 384-394.

- Buday, L., and Downward, J. (1993). Epidermal growth factor regulates the exchange rate of guanine nucleotides on p21ras in fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 13, 1903-1910.
- Cadigan, K.M., and Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & development* 11, 3286-3305.
- Canalis, E. (2013). Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches. *Nature reviews Endocrinology* 9, 575-583.
- Cassio, D. (2013). Long term culture of MDCK strains alters chromosome content. *BMC research notes* 6, 162.
- Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., and Bejsovec, A. (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395, 604-608.
- Caverzasio, J., and Manen, D. (2007). Essential role of Wnt3a-mediated activation of mitogen-activated protein kinase p38 for the stimulation of alkaline phosphatase activity and matrix mineralization in C3H10T1/2 mesenchymal cells. *Endocrinology* 148, 5323-5330.
- Chaikuad, A., Tacconi, E.M., Zimmer, J., Liang, Y., Gray, N.S., Tarsounas, M., and Knapp, S. (2014). A unique inhibitor binding site in ERK1/2 is associated with slow binding kinetics. *Nature chemical biology* 10, 853-860.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Chardin, P., Camonis, J.H., Gale, N.W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M.H., and Bar-Sagi, D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260, 1338-1343.
- Chen, B., Dodge, M.E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C.W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N.S., *et al.* (2009a). Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nature chemical biology* 5, 100-107.
- Chen, J.Y., Oliveri, P., Li, C.W., Zhou, G.Q., Gao, F., Hagadorn, J.W., Peterson, K.J., and Davidson, E.H. (2000a). Precambrian animal diversity: putative phosphatized embryos from the Doushantuo Formation of China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4457-4462.
- Chen, R.H., Ding, W.V., and McCormick, F. (2000b). Wnt signaling to beta-catenin involves two interactive components. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition and activation of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 275, 17894-17899.
- Chen, X., Zaro, J.L., and Shen, W.C. (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews* 65, 1357-1369.
- Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M.H. (2001). MAP kinases. *Chemical reviews* 101, 2449-2476.
- Chen, Z., Venkatesan, A.M., Dehnhardt, C.M., Dos Santos, O., Delos Santos, E., Ayrall-Kaloustian, S., Chen, L., Geng, Y., Arndt, K.T., Lucas, J., *et al.* (2009b). 2,4-Diamino-

quinazolines as inhibitors of beta-catenin/Tcf-4 pathway: Potential treatment for colorectal cancer. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19, 4980-4983.

Cheng, C.W., Yeh, J.C., Fan, T.P., Smith, S.K., and Charnock-Jones, D.S. (2008). Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration. *Biochemical and biophysical research communications* 365, 285-290.

Chinnadurai, G. (2002). CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Molecular cell* 9, 213-224.

Chong, H., Lee, J., and Guan, K.L. (2001). Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *The EMBO journal* 20, 3716-3727.

Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological reviews* 90, 1103-1163.

Clarke, D.C., and Liu, X. (2008). Decoding the quantitative nature of TGF-beta/Smad signaling. *Trends in cell biology* 18, 430-442.

Clemons, P.A. (2004). Complex phenotypic assays in high-throughput screening. *Current opinion in chemical biology* 8, 334-338.

Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.

Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004, RE13.

Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.

Crespi, C.L., Miller, V.P., and Penman, B.W. (1997). Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. *Analytical biochemistry* 248, 188-190.

Cutler, R.E., Jr., Stephens, R.M., Saracino, M.R., and Morrison, D.K. (1998). Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9214-9219.

Daksis, J.I., Lu, R.Y., Facchini, L.M., Marhin, W.W., and Penn, L.J. (1994). Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* 9, 3635-3645.

Daniels, D.L., and Weis, W.I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature structural & molecular biology* 12, 364-371.

Daub, M., Jockel, J., Quack, T., Weber, C.K., Schmitz, F., Rapp, U.R., Wittinghofer, A., and Block, C. (1998). The RafC1 cysteine-rich domain contains multiple distinct regulatory epitopes which control Ras-dependent Raf activation. *Molecular and cellular biology* 18, 6698-6710.

- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* *417*, 949-954.
- Davies, R.J., Miller, R., and Coleman, N. (2005). Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nature reviews Cancer* *5*, 199-209.
- Dekker, F.J., Rocks, O., Vartak, N., Menninger, S., Hedberg, C., Balamurugan, R., Wetzel, S., Renner, S., Gerauer, M., Scholermann, B., *et al.* (2010). Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling. *Nature chemical biology* *6*, 449-456.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* *26*, 3279-3290.
- Dhillon, A.S., Meikle, S., Yazici, Z., Eulitz, M., and Kolch, W. (2002). Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *The EMBO journal* *21*, 64-71.
- Dhomen, N., and Marais, R. (2007). New insight into BRAF mutations in cancer. *Current opinion in genetics & development* *17*, 31-39.
- Dickson, M.A., Gordon, M.S., Edelman, G., Bendell, J.C., Kudchadkar, R.R., LoRusso, P.M., Johnston, S.H., Clary, D.O., and Schwartz, G.K. (2015). Phase I study of XL281 (BMS-908662), a potent oral RAF kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs* *33*, 349-356.
- Dihlmann, S., Siemann, A., and von Knebel Doeberitz, M. (2001). The nonsteroidal anti-inflammatory drugs aspirin and indomethacin attenuate beta-catenin/TCF-4 signaling. *Oncogene* *20*, 645-653.
- Dong, Q., Dougan, D.R., Gong, X., Halkowycz, P., Jin, B., Kanouni, T., O'Connell, S.M., Scoria, N., Shi, L., Wallace, M.B., *et al.* (2011). Discovery of TAK-733, a potent and selective MEK allosteric site inhibitor for the treatment of cancer. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* *21*, 1315-1319.
- Du, S.J., Purcell, S.M., Christian, J.L., McGrew, L.L., and Moon, R.T. (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Molecular and cellular biology* *15*, 2625-2634.
- Dulic, V., Lees, E., and Reed, S.I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* *257*, 1958-1961.
- Duncia, J.V., Santella, J.B., 3rd, Higley, C.A., Pitts, W.J., Wityak, J., Fietze, W.E., Rankin, F.W., Sun, J.H., Earl, R.A., Tabaka, A.C., *et al.* (1998). MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* *8*, 2839-2844.
- Durko, L., and Malecka-Panas, E. (2014). Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. *Current colorectal cancer reports* *10*, 45-54.
- Eilers, M. (1999). Control of cell proliferation by Myc family genes. *Molecules and cells* *9*, 1-6.

- Eishingdrelo, H., and Kongsamut, S. (2013). Minireview: Targeting GPCR Activated ERK Pathways for Drug Discovery. *Current chemical genomics and translational medicine* 7, 9-15.
- Emami, K.H., Nguyen, C., Ma, H., Kim, D.H., Jeong, K.W., Eguchi, M., Moon, R.T., Teo, J.L., Kim, H.Y., Moon, S.H., *et al.* (2004). A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12682-12687.
- Emerson, S.D., Madison, V.S., Palermo, R.E., Waugh, D.S., Scheffler, J.E., Tsao, K.L., Kiefer, S.E., Liu, S.P., and Fry, D.C. (1995). Solution structure of the Ras-binding domain of c-Raf-1 and identification of its Ras interaction surface. *Biochemistry* 34, 6911-6918.
- Emuss, V., Garnett, M., Mason, C., and Marais, R. (2005). Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer research* 65, 9719-9726.
- Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., and Anderson, J.M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 273, 29745-29753.
- Fearnhead, N.S., Britton, M.P., and Bodmer, W.F. (2001). The ABC of APC. *Human molecular genetics* 10, 721-733.
- Fiebeck, J. (2014). Etablierung eines fluoreszenzbasierten Zellassays zum Screening potentieller Krebstherapeutika des Wnt-Signalwegs. In Dissertation an der Fakultät für Biologie (Universität Würzburg).
- Fiorucci, G., and Hall, A. (1988). All three human ras genes are expressed in a wide range of tissues. *Biochimica et biophysica acta* 950, 81-83.
- Fischer, A., Baljuls, A., Reinders, J., Nekhoroshkova, E., Sibilski, C., Metz, R., Albert, S., Rajalingam, K., Hekman, M., and Rapp, U.R. (2009). Regulation of RAF activity by 14-3-3 proteins: RAF kinases associate functionally with both homo- and heterodimeric forms of 14-3-3 proteins. *The Journal of biological chemistry* 284, 3183-3194.
- Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M., and Kolodner, R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027-1038.
- Fraga, H. (2008). Firefly luminescence: a historical perspective and recent developments. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 7, 146-158.
- Freeman, A.K., Ritt, D.A., and Morrison, D.K. (2013). Effects of Raf dimerization and its inhibition on normal and disease-associated Raf signaling. *Molecular cell* 49, 751-758.
- Fuerer, C., Nusse, R., and Ten Berge, D. (2008). Wnt signalling in development and disease. Max Delbrück Center for Molecular Medicine meeting on Wnt signaling in Development and Disease. *EMBO reports* 9, 134-138.
- Fujii, N., You, L., Xu, Z., Uematsu, K., Shan, J., He, B., Mikami, I., Edmondson, L.R., Neale, G., Zheng, J., *et al.* (2007). An antagonist of dishevelled protein-protein interaction suppresses beta-catenin-dependent tumor cell growth. *Cancer research* 67, 573-579.

- Garnett, M.J., Rana, S., Paterson, H., Barford, D., and Marais, R. (2005). Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Molecular cell* 20, 963-969.
- Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A.L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4510-4515.
- Gaush, C.R., Hard, W.L., and Smith, T.F. (1966). Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 122, 931-935.
- Geyer, M., and Wittinghofer, A. (1997). GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Current opinion in structural biology* 7, 786-792.
- Giles, R.H., van Es, J.H., and Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1653, 1-24.
- Gilmartin, A.G., Bleam, M.R., Groy, A., Moss, K.G., Minthorn, E.A., Kulkarni, S.G., Rominger, C.M., Erskine, S., Fisher, K.E., Yang, J., *et al.* (2011). GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 989-1000.
- Gonsalves, F.C., Klein, K., Carson, B.B., Katz, S., Ekas, L.A., Evans, S., Nagourney, R., Cardozo, T., Brown, A.M., and DasGupta, R. (2011). An RNAi-based chemical genetic screen identifies three small-molecule inhibitors of the Wnt/wingless signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5954-5963.
- Goumans, M.J., Liu, Z., and ten Dijke, P. (2009). TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell research* 19, 116-127.
- Grandy, D., Shan, J., Zhang, X., Rao, S., Akunuru, S., Li, H., Zhang, Y., Alpatov, I., Zhang, X.A., Lang, R.A., *et al.* (2009). Discovery and characterization of a small molecule inhibitor of the PDZ domain of dishevelled. *The Journal of biological chemistry* 284, 16256-16263.
- Guardavaccaro, D., and Clevers, H. (2012). Wnt/beta-catenin and MAPK signaling: allies and enemies in different battlefields. *Science signaling* 5, pe15.
- Gui, S., Yuan, G., Wang, L., Zhou, L., Xue, Y., Yu, Y., Zhang, J., Zhang, M., Yang, Y., and Wang, D.W. (2013). Wnt3a regulates proliferation, apoptosis and function of pancreatic NIT-1 beta cells via activation of IRS2/PI3K signaling. *Journal of cellular biochemistry* 114, 1488-1497.
- Gujral, T.S., and MacBeath, G. (2010). A system-wide investigation of the dynamics of Wnt signaling reveals novel phases of transcriptional regulation. *PloS one* 5, e10024.
- Gurney, A., Axelrod, F., Bond, C.J., Cain, J., Chartier, C., Donigan, L., Fischer, M., Chaudhari, A., Ji, M., Kapoun, A.M., *et al.* (2012). Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, 11717-11722.

Handeli, S., and Simon, J.A. (2008). A small-molecule inhibitor of Tcf/beta-catenin signaling down-regulates PPARgamma and PPARdelta activities. *Molecular cancer therapeutics* *7*, 521-529.

Haney, S.A., LaPan, P., Pan, J., and Zhang, J. (2006). High-content screening moves to the front of the line. *Drug discovery today* *11*, 889-894.

Harada, N., Oshima, H., Katoh, M., Tamai, Y., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2004). Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Ha-ras gene mutations. *Cancer research* *64*, 48-54.

Hart, M., Concordet, J.P., Lassot, I., Albert, I., del los Santos, R., Durand, H., Perret, C., Rubinfeld, B., Margottin, F., Benarous, R., *et al.* (1999). The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Current biology : CB* *9*, 207-210.

Hatzivassiliou, G., Liu, B., O'Brien, C., Spoerke, J.M., Hoeflich, K.P., Haverty, P.M., Soriano, R., Forrest, W.F., Heldens, S., Chen, H., *et al.* (2012). ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK inhibitors. *Molecular cancer therapeutics* *11*, 1143-1154.

He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* *281*, 1509-1512.

Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 12501-12504.

Hekman, M., Wiese, S., Metz, R., Albert, S., Troppmair, J., Nickel, J., Sendtner, M., and Rapp, U.R. (2004). Dynamic changes in C-Raf phosphorylation and 14-3-3 protein binding in response to growth factor stimulation: differential roles of 14-3-3 protein binding sites. *The Journal of biological chemistry* *279*, 14074-14086.

Heldin, C.H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* *80*, 213-223.

Hermanson, M., Funa, K., Hartman, M., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H., Westermark, B., and Nister, M. (1992). Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer research* *52*, 3213-3219.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* *77*, 51-59.

Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C.M., von Laue, C.C., Snyder, P., Rothbacher, U., and Holstein, T.W. (2000). WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* *407*, 186-189.

- Huang, S.M., Mishina, Y.M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G.A., Charlat, O., Wiellette, E., Zhang, Y., Wiessner, S., *et al.* (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* *461*, 614-620.
- Hüser, J.L., E.; Kalthof, B.; Burkhardt, N.; Brüggemeier, U. and Bechem, M. (2006). High-throughput Screening for Targeted Lead Discovery. In *High-Throughput Screening in Drug Discovery* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KG), pp. 15-36.
- Ilyas, M., Tomlinson, I.P., Rowan, A., Pignatelli, M., and Bodmer, W.F. (1997). Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 10330-10334.
- Inestrosa, N.C., Montecinos-Oliva, C., and Fuenzalida, M. (2012). Wnt signaling: role in Alzheimer disease and schizophrenia. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* *7*, 788-807.
- Isshiki, Y., Kohchi, Y., Iikura, H., Matsubara, Y., Asoh, K., Murata, T., Kohchi, M., Mizuguchi, E., Tsujii, S., Hattori, K., *et al.* (2011). Design and synthesis of novel allosteric MEK inhibitor CH4987655 as an orally available anticancer agent. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* *21*, 1795-1801.
- Iverson, C., Larson, G., Lai, C., Yeh, L.T., Dadson, C., Weingarten, P., Appleby, T., Vo, T., Maderna, A., Vernier, J.M., *et al.* (2009). RDEA119/BAY 869766: a potent, selective, allosteric inhibitor of MEK1/2 for the treatment of cancer. *Cancer research* *69*, 6839-6847.
- Janssen, K.P. (2003). Murine models of colorectal cancer: studying the role of oncogenic K-ras. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *60*, 495-506.
- Janssens, N., Janicot, M., and Perera, T. (2006). The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery. *Investigational new drugs* *24*, 263-280.
- Jeong, W.J., Yoon, J., Park, J.C., Lee, S.H., Lee, S.H., Kaduwal, S., Kim, H., Yoon, J.B., and Choi, K.Y. (2012). Ras stabilization through aberrant activation of Wnt/beta-catenin signaling promotes intestinal tumorigenesis. *Science signaling* *5*, ra30.
- Jia, L., Miao, C., Cao, Y., and Duan, E.K. (2008). Effects of Wnt proteins on cell proliferation and apoptosis in HEK293 cells. *Cell biology international* *32*, 807-813.
- Jo, A., Ham, S., Lee, G.H., Lee, Y.I., Kim, S., Lee, Y.S., Shin, J.H., and Lee, Y. (2015). Efficient Mitochondrial Genome Editing by CRISPR/Cas9. *BioMed research international* *2015*, 305716.
- Johnson, M., Sharma, M., Jamieson, C., Henderson, J.M., Mok, M.T., Bendall, L., and Henderson, B.R. (2009). Regulation of beta-catenin trafficking to the membrane in living cells. *Cellular signalling* *21*, 339-348.
- Kaler, P., Augenlicht, L., and Klampfer, L. (2012). Activating mutations in beta-catenin in colon cancer cells alter their interaction with macrophages; the role of snail. *PloS one* *7*, e45462.
- Karaguni, I.M., Herter, P., Debruyne, P., Chtarbova, S., Kasprzyński, A., Herbrand, U., Ahmadian, M.R., Glusenka, K.H., Winde, G., Mareel, M., *et al.* (2002). The new sulindac derivative IND 12 reverses Ras-induced cell transformation. *Cancer research* *62*, 1718-1723.

- Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 517-531.
- Kerkhoff, E., Houben, R., Löffler, S., Troppmair, J., Lee, J.E., and Rapp, U.R. (1998). Regulation of c-myc expression by Ras/Raf signalling. *Oncogene* 16, 211-216.
- Kim, S.E., and Choi, K.Y. (2007). EGF receptor is involved in WNT3a-mediated proliferation and motility of NIH3T3 cells via ERK pathway activation. *Cellular signalling* 19, 1554-1564.
- Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hamilton, S.R., Hedge, P., Markham, A., *et al.* (1991). Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251, 1366-1370.
- Klaus, A., and Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature reviews Cancer* 8, 387-398.
- Knoth, T., Warburg, K., Katzka, C., Rai, A., Wolf, A., Brockmeyer, A., Janning, P., Reubold, T.F., Eschenburg, S., Manstein, D.J., *et al.* (2009). The Ras pathway modulator melophlin A targets dynamins. *Angewandte Chemie* 48, 7240-7245.
- Kolch, W., Kotwaliwale, A., Vass, K., and Janosch, P. (2002). The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert reviews in molecular medicine* 4, 1-18.
- Kolibaba, K.S., and Druker, B.J. (1997). Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1333, F217-248.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275, 1784-1787.
- Kuhl, M. (2004). The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, 967-974.
- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., and Moon, R.T. (2000). The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends in genetics : TIG* 16, 279-283.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagas, J.S., van Waterschoot, R.A., Sparidans, R.W., Wagenaar, E., Beijnen, J.H., and Schinkel, A.H. (2010). Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein limit sorafenib brain accumulation. *Molecular cancer therapeutics* 9, 319-326.
- Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
- Lee, J.C., Vivanco, I., Beroukhi, R., Huang, J.H., Feng, W.L., DeBiasi, R.M., Yoshimoto, K., King, J.C., Nghiemphu, P., Yuza, Y., *et al.* (2006). Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS medicine* 3, e485.

- Leevers, S.J., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369, 411-414.
- Lemieux, E., Cagnol, S., Beaudry, K., Carrier, J., and Rivard, N. (2015). Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/beta-catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. *Oncogene* 34, 4914-4927.
- Lenz, H.J., and Kahn, M. (2014). Safely targeting cancer stem cells via selective catenin coactivator antagonism. *Cancer science* 105, 1087-1092.
- Lepourcelet, M., Chen, Y.N., France, D.S., Wang, H., Crews, P., Petersen, F., Bruseo, C., Wood, A.W., and Shivdasani, R.A. (2004). Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer cell* 5, 91-102.
- Li, J., Mizukami, Y., Zhang, X., Jo, W.S., and Chung, D.C. (2005). Oncogenic K-ras stimulates Wnt signaling in colon cancer through inhibition of GSK-3beta. *Gastroenterology* 128, 1907-1918.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837-847.
- Liu, J., Pan, S., Hsieh, M.H., Ng, N., Sun, F., Wang, T., Kasibhatla, S., Schuller, A.G., Li, A.G., Cheng, D., *et al.* (2013). Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 20224-20229.
- Liu, L., Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., McNabola, A., Wilkie, D., Wilhelm, S., Lynch, M., and Carter, C. (2006). Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer research* 66, 11851-11858.
- Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R.S., Taniguchi, K., Krishnadath, K.K., Halling, K.C., Cunningham, J.M., Boardman, L.A., Qian, C., *et al.* (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nature genetics* 26, 146-147.
- Liu, Y., and Gray, N.S. (2006). Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nature chemical biology* 2, 358-364.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 781-810.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431-442.
- Lowinger, T.B., Riedl, B., Dumas, J., and Smith, R.A. (2002). Design and discovery of small molecules targeting raf-1 kinase. *Current pharmaceutical design* 8, 2269-2278.
- Luckett, J.C., Huser, M.B., Giagtzoglou, N., Brown, J.E., and Pritchard, C.A. (2000). Expression of the A-raf proto-oncogene in the normal adult and embryonic mouse. *Cell*

growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research *11*, 163-171.

Luo, J., Chen, J., Deng, Z.L., Luo, X., Song, W.X., Sharff, K.A., Tang, N., Haydon, R.C., Luu, H.H., and He, T.C. (2007). Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications? Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology *87*, 97-103.

Macaulay, I.C., Thon, J.N., Tijssen, M.R., Steele, B.M., MacDonald, B.T., Meade, G., Burns, P., Rendon, A., Salunkhe, V., Murphy, R.P., *et al.* (2013). Canonical Wnt signaling in megakaryocytes regulates proplatelet formation. Blood *121*, 188-196.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature reviews Cancer *9*, 153-166.

Marshall, C.J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. Curr Opin Genet Dev *4*, 82-89.

Marshall, C.J. (1999). Small GTPases and cell cycle regulation. Biochemical Society transactions *27*, 363-370.

Martinez-Diez, M., Santamaria, G., Ortega, A.D., and Cuezva, J.M. (2006). Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'UTRs. PloS one *1*, e107.

Mason, J.M., Morrison, D.J., Basson, M.A., and Licht, J.D. (2006). Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. Trends in cell biology *16*, 45-54.

Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A., and Kolch, W. (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. Genes & cancer *2*, 232-260.

McDonald, S.L., and Silver, A. (2009). The opposing roles of Wnt-5a in cancer. British journal of cancer *101*, 209-214.

Mehlen, P., and Fearon, E.R. (2004). Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *22*, 3420-3428.

Mercer, K.E., and Pritchard, C.A. (2003). Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. Biochimica et biophysica acta *1653*, 25-40.

Mikels, A.J., and Nusse, R. (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. PLoS biology *4*, e115.

Miller, J.R. (2002). The Wnts. Genome biology *3*, REVIEWS3001.

Mitchison, T.J. (2005). Small-molecule screening and profiling by using automated microscopy. Chembiochem : a European journal of chemical biology *6*, 33-39.

Mochizuki, H., and Breen, M. (2016). Sequence analysis of RAS and RAF mutation hot spots in canine carcinoma. Veterinary and comparative oncology.

- Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., and Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nature reviews Genetics* 5, 691-701.
- Morata, G., and Lawrence, P.A. (1977). The development of wingless, a homeotic mutation of *Drosophila*. *Developmental biology* 56, 227-240.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.
- Morin, J.G., and Hastings, J.W. (1971). Energy transfer in a bioluminescent system. *Journal of cellular physiology* 77, 313-318.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H., and Winant, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13, 2656-2662.
- Mortensen, R., Chestnut, J.D., Hoeffler, J.P., and Kingston, R.E. (2001). Selection of transfected mammalian cells. *Current protocols in neuroscience Chapter 4*, Unit 4 6.
- Mott, H.R., Carpenter, J.W., Zhong, S., Ghosh, S., Bell, R.M., and Campbell, S.L. (1996). The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8312-8317.
- Muller, O., Gourzoulidou, E., Carpintero, M., Karaguni, I.M., Langerak, A., Herrmann, C., Moroy, T., Klein-Hitpass, L., and Waldmann, H. (2004). Identification of potent Ras signaling inhibitors by pathway-selective phenotype-based screening. *Angewandte Chemie* 43, 450-454.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, 263-273.
- Nagase, H., and Nakamura, Y. (1993). Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Human mutation* 2, 425-434.
- Neel, B.G., and Tonks, N.K. (1997). Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 9, 193-204.
- Niehrs, C., and Acebron, S.P. (2012). Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *The EMBO journal* 31, 2705-2713.
- Niswender, K.D., Blackman, S.M., Rohde, L., Magnuson, M.A., and Piston, D.W. (1995). Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *Journal of microscopy* 180, 109-116.
- Nusse, R. (2005). Wnt signaling in disease and in development. *Cell research* 15, 28-32.
- Nusse, R., van Ooyen, A., Cox, D., Fung, Y.K., and Varmus, H. (1984). Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* 307, 131-136.
- Nusslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.

- Ohori, M., Kinoshita, T., Okubo, M., Sato, K., Yamazaki, A., Arakawa, H., Nishimura, S., Inamura, N., Nakajima, H., Neya, M., *et al.* (2005). Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex. *Biochemical and biophysical research communications* 336, 357-363.
- Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-1395.
- Pan, M.G., Wang, Y.H., Hirsch, D.D., Labudda, K., and Stork, P.J. (1995). The Wnt-1 proto-oncogene regulates MAP kinase activation by multiple growth factors in PC12 cells. *Oncogene* 11, 2005-2012.
- Pandit, B., Sarkozy, A., Pennacchio, L.A., Carta, C., Oishi, K., Martinelli, S., Pogna, E.A., Schackwitz, W., Ustaszewska, A., Landstrom, A., *et al.* (2007). Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature genetics* 39, 1007-1012.
- Pawson, T. (2002). Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *European journal of cancer* 38 Suppl 5, S3-10.
- Pelengaris, S., and Khan, M. (2003). The many faces of c-MYC. *Archives of biochemistry and biophysics* 416, 129-136.
- Pinson, K.I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B.J., and Skarnes, W.C. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407, 535-538.
- Pinto, D., and Clevers, H. (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Experimental cell research* 306, 357-363.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes & development* 17, 1709-1713.
- Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Current opinion in genetics & development* 17, 45-51.
- Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- Polakis, P., Hart, M., and Rubinfeld, B. (1999). Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Advances in experimental medicine and biology* 470, 23-32.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233.
- Pratilas, C.A., and Solit, D.B. (2010). Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 3329-3334.
- Price, M.A. (2006). CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes & development* 20, 399-410.
- Prigent, S.A., and Lemoine, N.R. (1992). The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Progress in growth factor research* 4, 1-24.

- Rao, T.P., and Kuhl, M. (2010). An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circulation research* 106, 1798-1806.
- Rapp, U.R., Goldsborough, M.D., Mark, G.E., Bonner, T.I., Groffen, J., Reynolds, F.H., Jr., and Stephenson, J.R. (1983). Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 4218-4222.
- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 3116-3120.
- Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50, 649-657.
- RKI, and GEKID (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012, <http://krebsdaten.rki.de>, ed. (Berlin, 2015: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.).
- Rodenhuis, S. (1992). ras and human tumors. *Seminars in cancer biology* 3, 241-247.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1996). Binding of GSK3 β to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272, 1023-1026.
- Rusch, M., Zimmermann, T.J., Burger, M., Dekker, F.J., Gormer, K., Triola, G., Brockmeyer, A., Janning, P., Bottcher, T., Sieber, S.A., *et al.* (2011). Identification of acyl protein thioesterases 1 and 2 as the cellular targets of the Ras-signaling modulators palmostatin B and M. *Angewandte Chemie* 50, 9838-9842.
- Rusconi, P., Caiola, E., and Brogini, M. (2012). RAS/RAF/MEK inhibitors in oncology. *Current medicinal chemistry* 19, 1164-1176.
- Rushworth, L.K., Hindley, A.D., O'Neill, E., and Kolch, W. (2006). Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Molecular and cellular biology* 26, 2262-2272.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sala, E., Mologni, L., Truffa, S., Gaetano, C., Bollag, G.E., and Gambacorti-Passerini, C. (2008). BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Molecular cancer research : MCR* 6, 751-759.
- Salahshor, S., and Woodgett, J.R. (2005). The links between axin and carcinogenesis. *Journal of clinical pathology* 58, 225-236.

- Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Current opinion in cell biology* 15, 763-770.
- Sandler, R.S., Halabi, S., Baron, J.A., Budinger, S., Paskett, E., Keresztes, R., Petrelli, N., Pipas, J.M., Karp, D.D., Loprinzi, C.L., *et al.* (2003). A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 348, 883-890.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Sebolt-Leopold, J.S., Dudley, D.T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R.C., Tecle, H., Barrett, S.D., Bridges, A., Przybranowski, S., *et al.* (1999). Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nature medicine* 5, 810-816.
- Sebolt-Leopold, J.S., and Herrera, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature reviews Cancer* 4, 937-947.
- Shan, J., Shi, D.L., Wang, J., and Zheng, J. (2005). Identification of a specific inhibitor of the dishevelled PDZ domain. *Biochemistry* 44, 15495-15503.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology* 22, 1567-1572.
- Sharma, A., Trivedi, N.R., Zimmerman, M.A., Tuveson, D.A., Smith, C.D., and Robertson, G.P. (2005). Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer research* 65, 2412-2421.
- Sharma, R.P., and Chopra, V.L. (1976). Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* 48, 461-465.
- Shimizu, H., Julius, M.A., Giarre, M., Zheng, Z., Brown, A.M., and Kitajewski, J. (1997). Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 8, 1349-1358.
- Shimomura, O. (2005). The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of microscopy* 217, 1-15.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology* 59, 223-239.
- Shin, S.Y., Rath, O., Choo, S.M., Fee, F., McFerran, B., Kolch, W., and Cho, K.H. (2009). Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *Journal of cell science* 122, 425-435.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 5522-5527.

Silfies J. S., S.S.A.a.D.M.W. (2016). Optical Highlighter Fluorescent Proteins for Single-Molecule Super-Resolution Imaging, www.microscopyu.com/techniques/super-resolution/single-molecule-super-resolution-imaging, ed. (WorldWideWeb: Nikon Instruments Inc. and the Florida State University (FSU) in Tallahassee).

Smalley, M.J., and Dale, T.C. (1999). Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer metastasis reviews* *18*, 215-230.

Smith, R.A., Barbosa, J., Blum, C.L., Bobko, M.A., Caringal, Y.V., Dally, R., Johnson, J.S., Katz, M.E., Kennure, N., Kingery-Wood, J., *et al.* (2001). Discovery of heterocyclic ureas as a new class of raf kinase inhibitors: identification of a second generation lead by a combinatorial chemistry approach. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* *11*, 2775-2778.

Stiewe, T. (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature reviews Cancer* *7*, 165-168.

Storm, S.M., Cleveland, J.L., and Rapp, U.R. (1990). Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* *5*, 345-351.

Sullivan, L.B., Martinez-Garcia, E., Nguyen, H., Mullen, A.R., Dufour, E., Sudarshan, S., Licht, J.D., Deberardinis, R.J., and Chandel, N.S. (2013). The proto-oncometabolite fumarate binds glutathione to amplify ROS-dependent signaling. *Molecular cell* *51*, 236-248.

Takahashi, R.H., Choo, E.F., Ma, S., Wong, S., Halladay, J., Deng, Y., Rooney, I., Gates, M., Hop, C.E., Khojasteh, S.C., *et al.* (2016). Absorption, Metabolism, Excretion, and the Contribution of Intestinal Metabolism to the Oral Disposition of [¹⁴C]Cobimetinib, a MEK Inhibitor, in Humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* *44*, 28-39.

Takemaru, K.I., and Moon, R.T. (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *The Journal of cell biology* *149*, 249-254.

Takle, A.K., Brown, M.J., Davies, S., Dean, D.K., Francis, G., Gaiba, A., Hird, A.W., King, F.D., Lovell, P.J., Naylor, A., *et al.* (2006). The identification of potent and selective imidazole-based inhibitors of B-Raf kinase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* *16*, 378-381.

Tammariello, A.E., and Milner, J.A. (2010). Mouse models for unraveling the importance of diet in colon cancer prevention. *The Journal of nutritional biochemistry* *21*, 77-88.

Tateishi, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., Kaneko, S., and Sugimachi, K. (1990). Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer research* *50*, 7077-7080.

Taylor, D.L. (2007). Past, present, and future of high content screening and the field of cellomics. *Methods in molecular biology* *356*, 3-18.

Terai, K., and Matsuda, M. (2005). Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase. *EMBO reports* *6*, 251-255.

- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.
- Thorne, C.A., Hanson, A.J., Schneider, J., Tahinci, E., Orton, D., Cselenyi, C.S., Jernigan, K.K., Meyers, K.C., Hang, B.I., Waterson, A.G., *et al.* (2010). Small-molecule inhibition of Wnt signaling through activation of casein kinase 1alpha. *Nature chemical biology* 6, 829-836.
- Thun, M.J., Henley, S.J., and Patrono, C. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 252-266.
- Tolwinski, N.S., and Wieschaus, E. (2004). A nuclear function for armadillo/beta-catenin. *PLoS biology* 2, E95.
- Tomlinson, I., Ilyas, M., and Novelli, M. (1997). Molecular genetics of colon cancer. *Cancer metastasis reviews* 16, 67-79.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Trier, U., Olah, Z., Kleuser, B., and Schafer-Korting, M. (1999). Fusion of the binding domain of Raf-1 kinase with green fluorescent protein for activated Ras detection by fluorescence correlation spectroscopy. *Die Pharmazie* 54, 263-268.
- Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N.K., *et al.* (2008). Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3041-3046.
- Tsavachidou, D., Coleman, M.L., Athanasiadis, G., Li, S., Licht, J.D., Olson, M.F., and Weber, B.L. (2004). SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant. *Cancer research* 64, 5556-5559.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., *et al.* (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418-425.
- van Amerongen, R., Fuerer, C., Mizutani, M., and Nusse, R. (2012). Wnt5a can both activate and repress Wnt/beta-catenin signaling during mouse embryonic development. *Developmental biology* 369, 101-114.
- Veeman, M.T., Axelrod, J.D., and Moon, R.T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Developmental cell* 5, 367-377.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine* 319, 525-532.

- Voloshanencko, O., Erdmann, G., Dubash, T.D., Augustin, I., Metzger, M., Moffa, G., Hundsruker, C., Kerr, G., Sandmann, T., Anchang, B., *et al.* (2013). Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. *Nature communications* 4, 2610.
- Vousden, K.H., and Lane, D.P. (2007). p53 in health and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 275-283.
- Vuga, L.J., Ben-Yehudah, A., Kovkarova-Naumovski, E., Oriss, T., Gibson, K.F., Feghali-Bostwick, C., and Kaminski, N. (2009). WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 41, 583-589.
- Wagener, C., and Müller, O. (2010). Signalwege in der Tumorentstehung. In *Molekulare Onkologie* (Georg Thieme Verlag KG), pp. 225-251.
- Wagner, U., Burkhardt, E., and Failing, K. (1999). Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the 3H-thymidine incorporation assay. *Veterinary immunology and immunopathology* 70, 151-159.
- Wallingford, J.B., and Habas, R. (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132, 4421-4436.
- Wang, S., and Hazelrigg, T. (1994). Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369, 400-403.
- Wang, X.H., Meng, X.W., Sun, X., Liu, B.R., Han, M.Z., Du, Y.J., Song, Y.Y., and Xu, W. (2011). Wnt/beta-catenin signaling regulates MAPK and Akt1 expression and growth of hepatocellular carcinoma cells. *Neoplasia* 58, 239-244.
- Wasan, H.S., Novelli, M., Bee, J., and Bodmer, W.F. (1997). Dietary fat influences on polyp phenotype in multiple intestinal neoplasia mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3308-3313.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 875-885.
- Wen, Z., Wu, C., Chen, W., Zeng, X., Shi, J., Ge, J., Chen, H., and Bu, Z. (2015). Establishment of MDCK Stable Cell Lines Expressing TMPRSS2 and MSPL and Their Applications in Propagating Influenza Vaccine Viruses in Absence of Exogenous Trypsin. *Biotechnology research international* 2015, 402628.
- Wilhelm, S., and Chien, D.S. (2002). BAY 43-9006: preclinical data. *Current pharmaceutical design* 8, 2255-2257.
- Wilhelm, S.M., Adnane, L., Newell, P., Villanueva, A., Llovet, J.M., and Lynch, M. (2008). Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular cancer therapeutics* 7, 3129-3140.
- Wilhelm, S.M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., *et al.* (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer research* 64, 7099-7109.

- Wilhelm, S.M., Dumas, J., Adnane, L., Lynch, M., Carter, C.A., Schutz, G., Thierauch, K.H., and Zopf, D. (2011). Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *International journal of cancer Journal international du cancer* 129, 245-255.
- Willert, K., and Nusse, R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, a007864.
- Williams, D.H., Wilkinson, S.E., Purton, T., Lamont, A., Flotow, H., and Murray, E.J. (1998). Ro 09-2210 exhibits potent anti-proliferative effects on activated T cells by selectively blocking MKK activity. *Biochemistry* 37, 9579-9585.
- Wodarz, A., and Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual review of cell and developmental biology* 14, 59-88.
- Wong, G.T., Gavin, B.J., and McMahon, A.P. (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Molecular and cellular biology* 14, 6278-6286.
- Wong, H.C., Bourdelas, A., Krauss, A., Lee, H.J., Shao, Y., Wu, D., Mlodzik, M., Shi, D.L., and Zheng, J. (2003). Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Molecular cell* 12, 1251-1260.
- Wong, K.K. (2009). Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 4, 28-35.
- Xia, X., and Wong, S.T. (2012). Concise review: a high-content screening approach to stem cell research and drug discovery. *Stem cells* 30, 1800-1807.
- Yang, F., Moss, L.G., and Phillips, G.N., Jr. (1996a). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature biotechnology* 14, 1246-1251.
- Yang, S.H., Sharrocks, A.D., and Whitmarsh, A.J. (2003). Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320, 3-21.
- Yang, T.T., Cheng, L., and Kain, S.R. (1996b). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic acids research* 24, 4592-4593.
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsura, M., FitzGerald, M., Suldán, Z., Kim, D.W., Hofmann, C.S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., *et al.* (2001). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* 20, 1688-1702.
- Yeh, T.C., Marsh, V., Bernat, B.A., Ballard, J., Colwell, H., Evans, R.J., Parry, J., Smith, D., Brandhuber, B.J., Gross, S., *et al.* (2007). Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 1576-1583.
- Yoon, J.C., Ng, A., Kim, B.H., Bianco, A., Xavier, R.J., and Elledge, S.J. (2010). Wnt signaling regulates mitochondrial physiology and insulin sensitivity. *Genes & development* 24, 1507-1518.

- Young, A., Lyons, J., Miller, A.L., Phan, V.T., Alarcon, I.R., and McCormick, F. (2009). Ras signaling and therapies. *Advances in cancer research* 102, 1-17.
- Yu, C., Bruzek, L.M., Meng, X.W., Gores, G.J., Carter, C.A., Kaufmann, S.H., and Adjei, A.A. (2005). The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene* 24, 6861-6869.
- Yun, M.S., Kim, S.E., Jeon, S.H., Lee, J.S., and Choi, K.Y. (2005). Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. *Journal of cell science* 118, 313-322.
- Zanella, F., Lorens, J.B., and Link, W. (2010). High content screening: seeing is believing. *Trends in biotechnology* 28, 237-245.
- Zebisch, A., and Troppmair, J. (2006). Back to the roots: the remarkable RAF oncogene story. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 1314-1330.
- Zeller, E., Hammer, K., Kirschnick, M., and Braeuning, A. (2013). Mechanisms of RAS/beta-catenin interactions. *Archives of toxicology* 87, 611-632.
- Zwick, E., Bange, J., and Ullrich, A. (2001). Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-related cancer* 8, 161-173.

7. Anhang

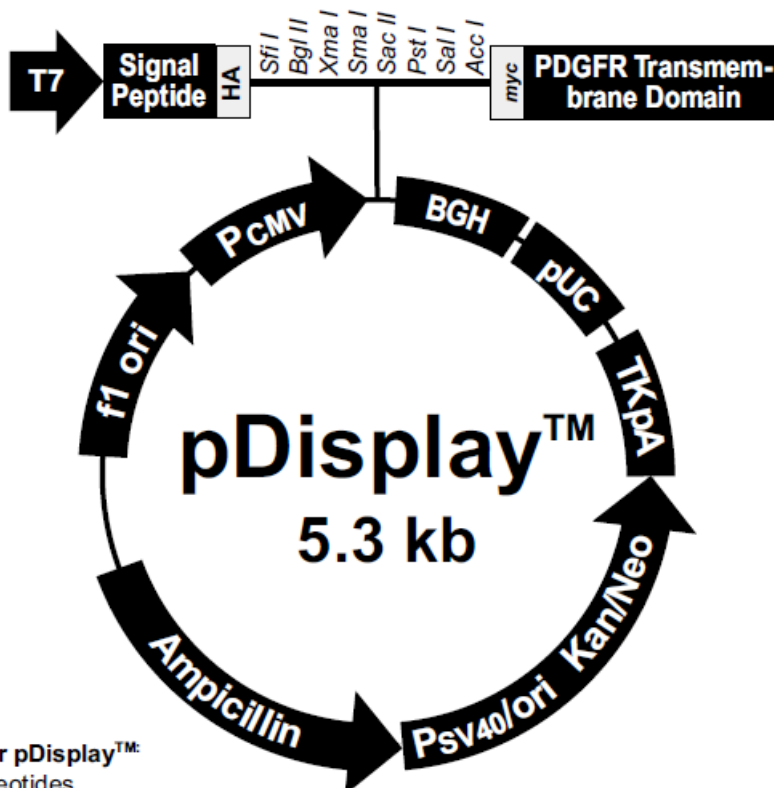
7.1 Vektorkarten

7.1.1 Technische Daten des Vektors pDisplay

pDisplay™ Vector, Continued

Map of pDisplay™

The figure below shows the features of pDisplay™. The complete sequence of pDisplay™ is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (see page 9). Details of the multiple cloning site are shown on page 5.



Comments for pDisplay™

5325 nucleotides

CMV promoter: bases 1-596
 T7 promoter: bases 638-657
 Murine Ig kappa-chain V-J2-C signal peptide: bases 737-799
 Hemagglutinin A epitope: bases 800-826
 Multiple Cloning Site: bases 827-873
 myc epitope: bases 874-903
 PDGFR transmembrane domain: bases 907-1056
 Bovine growth hormone polyadenylation signal: bases 1069-1288
 pUC origin: bases 1378-2051
 Thymidine kinase polyadenylation site: bases 2458-2187
 Neomycin/Kanamycin resistance gene: bases 3421-2366
 SV40 origin and promoter: bases 3797-3456

Cloning into pDisplay™, Continued

Multiple Cloning Site of pDisplay™

Below is the multiple cloning site for pDisplay™. Restriction sites are labeled to indicate the cleavage site. The multiple cloning site has been confirmed by sequencing and functional testing.

```

      ↓ 5' end of hCMV promoter/enhancer
1   GCGCGCGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG
61  TTCATAGCCC ATATATGGAG TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAATGGC CCGCCTGGCT
      enhancer region (5' end)
121 GACCGCCCAA CGACCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC
181 CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGACTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG
241 CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT
301 GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA
361 TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC
      API
421 GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTC CAAGTCTCCA CCCCATTTGAC GTCAATGGGA
      enhancer region (3' end)
481 GTTTGTTTTG GCACCAAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCAT
      CAAT
541 TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTCGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTCTCTGGC
      Putative transcriptional start
601 TAACTAGAGA ACCCACTGCT TACTGGCTTA TCGAAATTAA TACGACTCAC TATAGGGAGA
      T7 promoter/priming site
661 CCCAAGCTTG GTACCGAGCT CGGATCCACT AGTAACGGCC GCCAGTGTGC TGGAAATTCGG
      Ig k-chain leader sequence
721 CTTGGGGATA TCCACC ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG
      Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu
      hemagglutinin A epitope
773 CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT
      Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp
      Sfi I Bgl II Xma I Sma I Sac II Pst I Sal I Acc I
821 TAT GCT GGG GCC CAGCCGGCCA GATCTCCCGG GATCCGCGG CTGCAGGTC GAC
      Tyr Ala
      myc epitope
874 GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AATGCTGTGG GCCAGGACAC
      Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu ...
924 GCAGGAGGTC ATCGTGGTGC CACACTCCTT GCCCTTTAAG GTGGTGGTGA TCTCAGCCAT
984 CCTGGCCCTG GTGGTGCTCA CCATCATCTC CCTTATCATC CTCATCATGC TTTGGCAGAA
      PDGFR (3' end)
1044 GAAGCCACGT TAGGCGGCCG CTCGAGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA
1104 TCTGTTGTTT GCCCCTCCCC CGTGCCTTCC TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCACTGTC
      BGH poly (A) addition site
1164 CTTTCCTAAT AAAATGAGGA

```

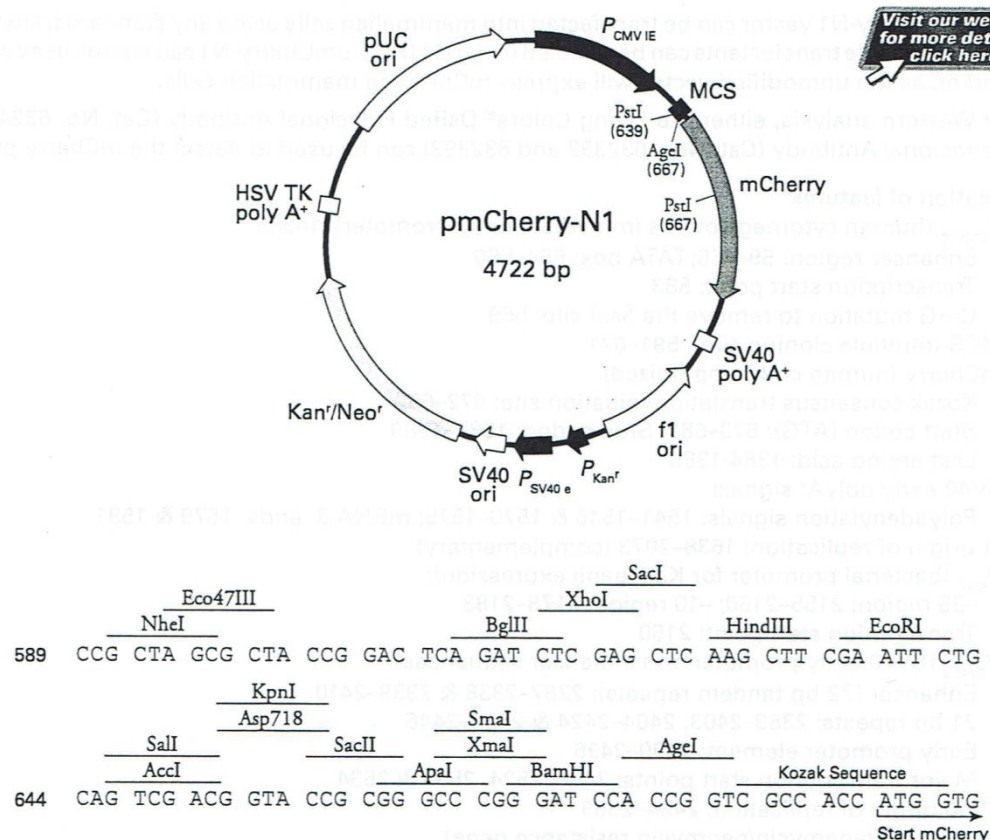
Anhang 1: Technische Daten aus dem Application Data Sheet „pDisplay Cloning“ von Invitrogen.

7.1.2 Technische Daten des Vektors pmCherry-N1

pmCherry-N1 Vector Information

PT3974-5

Cat. No. 632523



pmCherry-N1 Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS).

Description

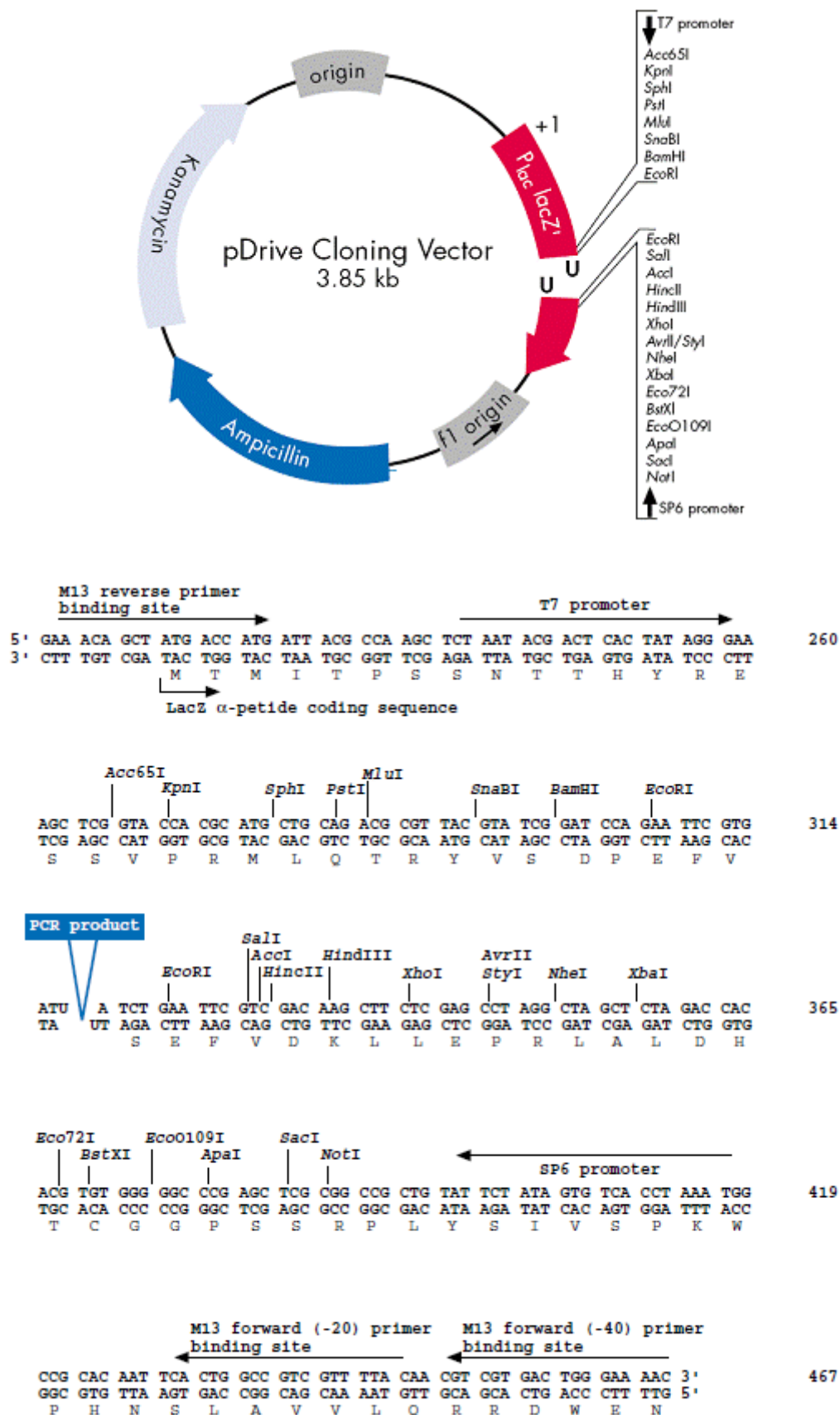
pmCherry-N1 is a mammalian expression vector designed to express a protein of interest fused to the N-terminus of mCherry, a mutant fluorescent protein derived from the tetrameric *Discosoma sp.* red fluorescent protein, DsRed (1). The excitation and emission maxima of the native mCherry protein are 587 nm and 610 nm, respectively. Expression of fusion proteins that retain the fluorescent properties of the unmodified mCherry protein can be monitored by flow cytometry and their localization *in vivo* can be determined by fluorescence microscopy.

The multiple cloning site (MCS) in pmCherry is positioned between the cytomegalovirus immediate early promoter ($P_{CMV IE}$) and the mCherry coding sequence. A Kozak consensus sequence is located immediately upstream of the mCherry gene to enhance translational efficiency in eukaryotic systems (2). SV40 polyadenylation signals downstream of the mCherry gene direct proper processing of the 3' end of the mCherry mRNA.

The vector backbone contains an SV40 origin for replication in mammalian cells expressing the SV40 large T antigen, a pUC origin of replication for propagation in *E. coli*, and an f1 origin for single-stranded DNA production. A neomycin-resistance cassette (Neo^r) allows stably transfected eukaryotic cells to be selected using G418. This cassette consists of the SV40 early promoter ($P_{SV40 e}$), the Tn5 neomycin/kanamycin resistance gene, and polyadenylation signals from the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV TK) gene. A bacterial promoter (P_{Kan^r}) upstream of the cassette confers kanamycin resistance in *E. coli*.

(PR882571; published 2 September 2008)

7.1.3 Technische Daten des Vektors pdrive



7.2 DNA-Sequenzausschnitt des Vektors pDisplay-EGFP-cRaf-neu2

```

... CCG GCC AGA TCT ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CT < 420
   P   A   R   S   M   V   S   K   G   E   E   L   F   T   G   V   V   P   I   L
                               370             380             390             400             410

G GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GG < 480
   V   E   L   D   G   D   V   N   G   H   K   F   S   V   S   G   E   G   E   G
                               430             440             450             460             470

C GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GT < 540
   D   A   T   Y   G   K   L   T   L   K   F   I   C   T   T   G   K   L   P   V
                               490             500             510             520             530

G CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC CTG ACC TAC GGC GTG CAG TGC TTC AGC CGC TAC CC < 600
   P   W   P   T   L   V   T   T   L   T   Y   G   V   Q   C   F   S   R   Y   P
                               550             560             570             580             590

C GAC CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG CCC GAA GGC TAC GTC CAG GA < 660
   D   H   M   K   Q   H   D   F   F   K   S   A   M   P   E   G   Y   V   Q   E
                               610             620             630             640             650

G CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC AAG ACC CGC GCC GAG GTG AAG TTC GA < 720
   R   T   I   F   F   K   D   D   G   N   Y   K   T   R   A   E   V   K   F   E
                               670             680             690             700             710

G GGC GAC ACC CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG AAG GGC ATC GAC TTC AAG GAG GAC GGC AA < 780
   G   D   T   L   V   N   R   I   E   L   K   G   I   D   F   K   E   D   G   N
                               730             740             750             760             770

C ATC CTG GGG CAC AAG CTG GAG TAC AAC TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT ATC ATG GCC GA < 840
   I   L   G   H   K   L   E   Y   N   Y   N   S   H   N   V   Y   I   M   A   D
                               790             800             810             820             830

C AAG CAG AAG AAC GGC ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC GGC AG < 900
   K   Q   K   N   G   I   K   V   N   F   K   I   R   H   N   I   E   D   G   S
                               850             860             870             880             890

C GTG CAG CTC GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC GAC GGC CCC GTG CTG CT < 960
   V   Q   L   A   D   H   Y   Q   Q   N   T   P   I   G   D   G   P   V   L   L
                               910             920             930             940             950

G CCC GAC AAC CAC TAC CTG AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG CG < 1020
   P   D   N   H   Y   L   S   T   Q   S   A   L   S   K   D   P   N   E   K   R
                               970             980             990             1000             1010

C GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GA < 1080
   D   H   M   V   L   L   E   F   V   T   A   A   G   I   T   L   G   M   D   E
                               1030             1040             1050             1060             1070

G CTG TAC AAG CCG CGG CTG CAG ACG CGT TAC GTA TCG GAT CCA GAA TTC GTG ATT CGC CA < 1140
   L   Y   K   P   R   L   Q   T   R   Y   V   S   D   P   E   F   V   I   R   H
                               1090             1100             1110             1120             1130

C CAT GGG ATC ATG GAG CAC ATA CAG GGA GCT TGG AAG ACG ATC AGC AAT GGT TTT GGA TT < 1200
   H   G   I   M   E   H   I   Q   G   A   W   K   T   I   S   N   G   F   G   F
                               1150             1160             1170             1180             1190

C AAA GAT GCC GTG TTT GAT GGC TCC AGC TGC ATC TCT CCT ACA ATA GTT CAG CAG TTT GG < 1260
   K   D   A   V   F   D   G   S   S   C   I   S   P   T   I   V   Q   Q   F   G
                               1210             1220             1230             1240             1250

C TAT CAG CGC CGG GCA TCA GAT GAT GGC AAA CTC ACA GAC CCG AGT AAG ACA AAC AAC AC < 1320
   Y   Q   R   R   A   S   D   D   G   K   L   T   D   P   S   K   T   N   N   T
                               1270             1280             1290             1300             1310

T ATC CGT GTT TTC TTG CCG AAC AAG CAA AGA ACA GTG GTC AAT GTG CGA AAT GGA ATG AG < 1380
   I   R   V   F   L   P   N   K   Q   R   T   V   V   N   V   R   N   G   M   S
                               1330             1340             1350             1360             1370

```

Anhang

C	TTG	CAT	GAC	TGC	CTT	ATG	AAA	GCA	CTC	AAG	GTG	AGG	GGC	CTG	CAA	CCA	GAG	TGC	TGT	GC	< 1440
L	H	D	C	L	M	K	A	L	K	V	R	G	L	Q	P	E	C	C	A		
			1390			1400			1410				1420			1430					
A	GTG	TTC	AGA	CTT	CTC	CAC	GAA	CAC	AAA	GGT	AAA	AAA	GCA	CGC	TTA	GAT	TGG	AAT	ACT	GA	< 1500
V	F	R	L	L	H	E	H	K	G	K	K	A	R	L	D	W	N	T	D		
			1450			1460			1470				1480			1490					
T	GCT	GCG	TCT	TTG	ATT	GGA	GAA	GAA	CTT	CAA	GTA	GAT	TTT	CTA	GAC	CAT	GTT	CCC	CTC	AC	< 1560
A	A	S	L	I	G	E	E	L	Q	V	D	F	L	D	H	V	P	L	T		
			1510			1520			1530				1540			1550					
A	ACA	CAC	AAC	TTT	GCT	CGG	AAG	ACG	TTC	CTG	AAG	CTT	GCC	TTC	TGT	GAC	ATC	TGT	CAG	AA	< 1620
T	H	N	F	A	R	K	T	F	L	K	L	A	F	C	D	I	C	Q	K		
			1570			1580			1590				1600			1610					
A	TTC	CTG	CTC	AAT	GGA	TTT	CGA	TGT	CAG	ACT	TGT	GGC	TAC	AAA	TTT	CAT	GAG	CAC	TGT	AG	< 1680
F	L	L	N	G	F	R	C	Q	T	C	G	Y	K	F	H	E	H	C	S		
			1630			1640			1650				1660			1670					
C	ACC	AAA	GTA	CCT	ACT	ATG	TGT	GTG	GAC	TGG	AGT	AAC	ATC	AGA	CAA	TTG	TTA	TTG	TTT	CC	< 1740
T	K	V	P	T	M	C	V	D	W	S	N	I	R	Q	L	L	L	F	P		
			1690			1700			1710				1720			1730					
A	AAT	TCC	ACT	ATT	GGT	GAT	AGT	GGA	GTC	CCA	GCA	CTA	CCT	TCT	TTG	ACT	ATG	CGT	CGT	AT	< 1800
N	S	T	I	G	D	S	G	V	P	A	L	P	S	L	T	M	R	R	M		
			1750			1760			1770				1780			1790					
G	CGA	GAG	TCT	GTT	TCC	AGG	ATG	CCT	GTT	AGT	TCT	CAG	CAC	AGA	TAT	TCT	ACA	CCT	CAC	GC	< 1860
R	E	S	V	S	R	M	P	V	S	S	Q	H	R	Y	S	T	P	H	A		
			1810			1820			1830				1840			1850					
C	TTC	ACC	TTT	AAC	ACC	TCC	AGT	CCC	TCA	TCT	GAA	GGT	TCC	CTC	TCC	CAG	AGG	CAG	AGG	TC	< 1920
F	T	F	N	T	S	S	P	S	S	E	G	S	L	S	Q	R	Q	R	S		
			1870			1880			1890				1900			1910					
C	ACA	TCC	ACA	CCT	AAT	GTC	CAC	ATG	GTC	AGC	ACC	ACG	CTA	CCG	GTG	GAC	AGC	AGG	ATG	AT	< 1980
T	S	T	P	N	V	H	M	V	S	T	T	L	P	V	D	S	R	M	I		
			1930			1940			1950				1960			1970					
T	GAG	GAT	GCA	ATT	CGA	AGT	CAC	AGC	GAA	TCA	GCC	TCA	CCT	TCA	GCC	CTG	TCC	AGT	AGC	CC	< 2040
E	D	A	I	R	S	H	S	E	S	A	S	P	S	A	L	S	S	S	P		
			1990			2000			2010				2020			2030					
C	AAC	AAT	CTG	AGC	CCA	ACA	GGC	TGG	TCA	CAG	CCG	AAA	ACC	CCC	GTG	CCA	GCT	CAG	CGA	GA	< 2100
N	N	L	S	P	T	G	W	S	Q	P	K	T	P	V	P	A	Q	R	E		
			2050			2060			2070				2080			2090					
G	CGG	GCA	CCA	GTA	TCT	GGG	ACC	CAG	GAG	AAA	AAC	AAA	ATT	AGG	CCT	CGT	GGA	CAG	AGA	GA	< 2160
R	A	P	V	S	G	T	Q	E	K	N	K	I	R	P	R	G	Q	R	D		
			2110			2120			2130				2140			2150					
T	TCA	AGC	TAT	TAT	TGG	GAA	ATA	GAA	GCC	AGT	GAA	GTG	ATG	CTG	TCC	ACT	CGG	ATT	GGG	TC	< 2220
S	S	Y	Y	W	E	I	E	A	S	E	V	M	L	S	T	R	I	G	S		
			2170			2180			2190				2200			2210					
A	GGC	TCT	TTT	GGA	ACT	GTT	TAT	AAG	GGT	AAA	TGG	CAC	GGA	GAT	GTT	GCA	GTA	AAG	ATC	CT	< 2280
G	S	F	G	T	V	Y	K	G	K	W	H	G	D	V	A	V	K	I	L		
			2230			2240			2250				2260			2270					
A	AAG	GTT	GTA	GAC	CCA	ACT	CCG	GAG	CAA	TTC	CAG	GCC	TTC	AGG	AAT	GAG	GTG	GCT	GTT	CT	< 2340
K	V	V	D	P	T	P	E	Q	F	Q	A	F	R	N	E	V	A	V	L		
			2290			2300			2310				2320			2330					
G	CGC	AAA	ACA	CGG	CAT	GTG	AAC	ATT	CTG	CTT	TTC	ATG	GGG	TAC	ATG	ACA	AAG	GAC	AAC	CT	< 2400
R	K	T	R	H	V	N	I	L	L	F	M	G	Y	M	T	K	D	N	L		
			2350			2360			2370				2380			2390					
G	GCG	ATT	GTG	ACC	CAG	TGG	TGC	GAG	GGC	AGC	AGC	CTC	TAC	AAA	CAC	CTG	CGT	GTA	CAG	GA	< 2460
A	I	V	T	Q	W	C	E	G	S	S	L	Y	K	H	L	R	V	Q	E		
			2410			2420			2430				2440			2450					

Anhang

```
G ACC AAG TTT CAG ATG TTC CAG CTA ATT GAC ATT GCC CGG CAG ACG GCT CAG GGA ATG GA < 2520
  T  K  F  Q  M  F  Q  L  I  D  I  A  R  Q  T  A  Q  G  M  D
                2470                2480                2490                2500                2510

C TAT TTG CAT GCA AAG AAC ATC ATC CAT AGA GAC ATG AAA TCC AAC AAT ATA TTT CTC CA < 2580
  Y  L  H  A  K  N  I  I  H  R  D  M  K  S  N  N  I  F  L  H
                2530                2540                2550                2560                2570

T GAA GGC TTA ACA GTG AAA ATT GGA GAT TTT GGT TTG GCA ACA GTA AAG TCA CGC TGG AG < 2640
  E  G  L  T  V  K  I  G  D  F  G  L  A  T  V  K  S  R  W  S
                2590                2600                2610                2620                2630

T GGT TCT CAG CAG GTT GAA CAA CCT ACT GGC TCT GTC CTC TGG ATG GCC CCA GAG GTG AT < 2700
  G  S  Q  Q  V  E  Q  P  T  G  S  V  L  W  M  A  P  E  V  I
                2650                2660                2670                2680                2690

C CGA ATG CAG GAT AAC AAC CCA TTC AGT TTC CAG TCG GAT GTC TAC TCC TAT GGC ATC GT < 2760
  R  M  Q  D  N  N  P  F  S  F  Q  S  D  V  Y  S  Y  G  I  V
                2710                2720                2730                2740                2750

A TTG TAT GAA CTG ATG ACG GGG GAG CTT CCT TAT TCT CAC ATC AAC AAC CGA GAT CAG AT < 2820
  L  Y  E  L  M  T  G  E  L  P  Y  S  H  I  N  N  R  D  Q  I
                2770                2780                2790                2800                2810

C TTC TTC ATG GTG GAC CGA GGA TAT GCC TCC CCA GAT CTT AGT AAG CTA TAT AAG AAC TG < 2880
  F  F  M  V  D  R  G  Y  A  S  P  D  L  S  K  L  Y  K  N  C
                2830                2840                2850                2860                2870

C CCC AAA GCA ATG AAG AGG CTG GTA GCT GAC TGT GTG AAG AAA GTA AAG GAA GAG AGG CC < 2940
  P  K  A  M  K  R  L  V  A  D  C  V  K  K  V  K  E  E  R  P
                2890                2900                2910                2920                2930

T CTT TTT CCC GAG ATC CTG TCT TCC AAT GAG CTG CTC CAA CAC TCT CTA CCG AAG ATC AA < 3000
  L  F  P  Q  I  L  S  S  N  E  L  L  Q  H  S  L  P  K  I  N
                2950                2960                2970                2980                2990

C CGG AGC GCT TCC GAG CCA TCT TTG CAT CGG GCA GCC CAC ACT GAG GAT ATC AAT GCT TG < 3060
  R  S  A  S  E  P  S  L  H  R  A  A  H  T  E  D  I  N  A  C
                3010                3020                3030                3040                3050

C ACG CTG ACC ACG TCC CCA AGG CTG CCT GTC TTC GTT CGG ACA TAG AAT CTG AAT TCG TC < 3120
  T  L  T  T  S  P  R  L  P  V  F  V  R  T  *  N  L  N  S  S
                3070                3080                3090                3100                3110
```

Anhang 4: Farblich hervorgehoben ist die Sequenz von EGFP (grün) und von c-Raf (rosa)

7.3 DNA-Sequenzausschnitt des Vektors pcRaf-shift-mCherry-N1

```
... GGA CTC AGA TCT CGA GAA GCT TGT CGA CGA ATT CAG ATT CGC CAC CAT GGG ATC ATG G < 660
  G  L  R  S  R  E  A  C  R  R  I  Q  I  R  H  H  L  G  I  M  E
                610                620                630                640                650

AG CAC ATA CAG GGA GCT TGG AAG ACG ATC AGC AAT GGT TTT GGA TTC AAA GAT GCC GTG T < 720
  H  I  Q  G  A  W  K  T  I  S  N  G  F  G  F  K  D  A  V  F
                670                680                690                700                710

TT GAT GGC TCC AGC TGC ATC TCT CCT ACA ATA GTT CAG CAG TTT GGC TAT CAG CGC CGG G < 780
  D  G  S  S  C  I  S  P  T  I  V  Q  Q  F  G  Y  Q  R  R  A
                730                740                750                760                770

CA TCA GAT GAT GGC AAA CTC ACA GAC CCG AGT AAG ACA AGC AAC ACT ATC CGT GTT TTC T < 840
  S  D  D  G  K  L  T  D  P  S  K  T  S  N  T  I  R  V  F  L
                790                800                810                820                830

TG CCG AAC AAG CAA AGA ACA GTG GTC AAT GTG CGA AAT GGA ATG AGC TTG CAT GAC TGC C < 900
  P  N  K  Q  R  T  V  V  N  V  R  N  G  M  S  L  H  D  C  L
                850                860                870                880                890
```

Anhang

TT	ATG	AAA	GCA	CTC	AAG	GTG	AGG	GGC	CTG	CAA	CCA	GAG	TGC	TGT	GCA	GTG	TTC	AGA	CTT	C	<	960
M	K	A	L	K	V	R	G	L	Q	P	E	C	C	A	V	F	R	L	L			
		910			920				930				940			950						
TC	CAC	GAA	CAC	AAA	GGT	AAA	AAA	GCA	CGC	TTA	GAT	TGG	AAT	ACT	GAT	GCT	GCG	TCT	TTG	A	<	1020
H	E	H	K	G	K	K	A	R	L	D	W	N	T	D	A	A	S	L	I			
		970			980				990				1000			1010						
TT	GGA	GAA	GAA	CTT	CAA	GTA	GAT	TTT	CTA	GAC	CAT	GTT	CCC	CTC	ACA	ACA	CAC	AAC	TTT	G	<	1080
G	E	E	L	Q	V	D	F	L	D	H	V	P	L	T	T	H	N	F	A			
		1030			1040				1050				1060			1070						
CT	CGG	AAG	ACG	TTC	CTG	AAG	CTT	GCC	TTC	TGT	GAC	ATC	TGT	CAG	AAA	TTC	CTG	CTC	AAT	G	<	1140
R	K	T	F	L	K	L	A	F	C	D	I	C	Q	K	F	L	L	N	G			
		1090			1100				1110				1120			1130						
GA	TTT	CGA	TGT	CAG	ACT	TGT	GGC	TAC	AAA	TTT	CAT	GAG	CAC	TGT	AGC	ACC	AAA	GTA	CCT	A	<	1200
F	R	C	Q	T	C	G	Y	K	F	H	E	H	C	S	T	K	V	P	T			
		1150			1160				1170				1180			1190						
CT	ATG	TGT	GTG	GAC	TGG	AGT	AAC	ATC	AGA	CAA	TTG	TTA	TTG	TTT	CCA	AAT	TCC	ACT	ATT	G	<	1260
M	C	V	D	W	S	N	I	R	Q	L	L	L	F	P	N	S	T	I	G			
		1210			1220				1230				1240			1250						
GT	GAT	AGT	GGA	GTC	CCA	GCA	CTA	CCT	TCT	TTG	ACT	ATG	CGT	CGT	ATG	CGA	GAG	TCT	GTT	T	<	1320
D	S	G	V	P	A	L	P	S	L	T	M	R	R	M	R	E	S	V	S			
		1270			1280				1290				1300			1310						
CC	AGG	ATG	CCT	GTT	AGT	TCT	CAG	CAC	AGA	TAT	TCT	ACA	CCT	CAC	GCC	TTC	ACC	TTT	AAC	A	<	1380
R	M	P	V	S	S	Q	H	R	Y	S	T	P	H	A	F	T	F	N	T			
		1330			1340				1350				1360			1370						
CC	TCC	AGT	CCC	TCA	TCT	GAA	GGT	TCC	CTC	TCC	CAG	AGG	CAG	AGG	TCC	ACA	TCC	ACA	CCT	A	<	1440
S	S	P	S	S	E	G	S	L	S	Q	R	Q	R	S	T	S	T	P	N			
		1390			1400				1410				1420			1430						
AT	GTC	CAC	ATG	GTC	AGC	ACC	ACG	CTA	CCG	GTG	GAC	AGC	AGG	ATG	ATT	GAG	GAT	GCA	ATT	C	<	1500
V	H	M	V	S	T	T	L	P	V	D	S	R	M	I	E	D	A	I	R			
		1450			1460				1470				1480			1490						
GA	AGT	CAC	AGC	GAA	TCA	GCC	TCA	CCT	TCA	GCC	CTG	TCC	AGT	AGC	CCC	AAC	AAT	CTG	AGC	C	<	1560
S	H	S	E	S	A	S	P	S	A	L	S	S	S	P	N	N	L	S	P			
		1510			1520				1530				1540			1550						
CA	ACA	GGC	TGG	TCA	CAG	CCG	AAA	ACC	CCC	GTG	CCA	GCT	CAG	CGA	GAG	CGG	GCA	CCA	GTA	T	<	1620
T	G	W	S	Q	P	K	T	P	V	P	A	Q	R	E	R	A	P	V	S			
		1570			1580				1590				1600			1610						
CT	GGG	ACC	CAG	GAG	AAA	AAC	AAA	ATT	AGG	CCT	CGT	GGA	CAG	AGA	GAT	TCA	AGC	TAT	TAT	T	<	1680
G	T	Q	E	K	N	K	I	R	P	R	G	Q	R	D	S	S	Y	Y	W			
		1630			1640				1650				1660			1670						
GG	GAA	ATA	GAA	GCC	AGT	GAA	GTG	ATG	CTG	TCC	ACT	CGG	ATT	GGG	TCA	GGC	TCT	TTT	GGA	A	<	1740
E	I	E	A	S	E	V	M	L	S	T	R	I	G	S	G	S	F	G	T			
		1690			1700				1710				1720			1730						
CT	GTT	TAT	AAG	GGT	AAA	TGG	CAC	GGA	GAT	GTT	GCA	GTA	AAG	ATC	CTA	AAG	GTT	GTA	GAC	C	<	1800
V	Y	K	G	K	W	H	G	D	V	A	V	K	I	L	K	V	V	D	P			
		1750			1760				1770				1780			1790						
CA	ACT	CCG	GAG	CAA	TTC	CAG	GCC	TTC	AGG	AAT	GAG	GTG	GCT	GTT	CTG	GCG	AAA	ACA	CGG	C	<	1860
T	P	E	Q	F	Q	A	F	R	N	E	V	A	V	L	R	K	T	R	H			
		1810			1820				1830				1840			1850						
AT	GTG	AAC	ATT	CTG	CTT	TTC	ATG	GGG	TAC	ATG	ACA	AAG	GAC	AAC	CTG	GCG	ATT	GTG	ACC	C	<	1920
V	N	I	L	L	F	M	G	Y	M	T	K	D	N	L	A	I	V	T	Q			
		1870			1880				1890				1900			1910						
AG	TGG	TGC	GAG	GGC	AGC	AGC	CTC	TAC	AAA	CAC	CTG	CAT	GTA	CAG	GAG	ACC	AAG	TTT	CAG	A	<	1980
W	C	E	G	S	S	L	Y	K	H	L	H	V	Q	E	T	K	F	Q	M			
		1930			1940				1950				1960			1970						

Anhang

TG	TTC	CAG	CTA	ATT	GAC	ATT	GCC	CGG	CAG	ACG	GCT	CAG	GGA	ATG	GAC	TAT	TTG	CAT	GCA	A	<	2040
F	Q	L	I	D	I	A	R	Q	T	A	Q	G	M	D	Y	L	H	A	K			
	1990				2000				2010				2020			2030						
AG	AAC	ATC	ATC	CAT	AGA	GAC	ATG	AAA	TCC	AAC	AAT	ATA	TTT	CTC	CAT	GAA	GGC	TTA	ACA	G	<	2100
N	I	I	H	R	D	M	K	S	N	N	I	F	L	H	E	G	L	T	V			
	2050				2060				2070				2080			2090						
TG	AAA	ATT	GGA	GAT	TTT	GGT	TTG	GCA	ACA	GTA	AAG	TCA	CGC	TGG	AGT	GGT	TCT	CAG	CAG	G	<	2160
K	I	G	D	F	G	L	A	T	V	K	S	R	W	S	G	S	Q	Q	V			
	2110				2120				2130				2140			2150						
TT	GAA	CAA	CCT	ACT	GGC	TCT	GTC	CTC	TGG	ATG	GCC	CCA	GAG	GTG	ATC	CGA	ATG	CAG	GAT	A	<	2220
E	Q	P	T	G	S	V	L	W	M	A	P	E	V	I	R	M	Q	D	N			
	2170				2180				2190				2200			2210						
AC	AAC	CCA	TTC	AGT	TTC	CAG	TCG	GAT	GTC	TAC	TCC	TAT	GGC	ATC	GTA	TTG	TAT	GAA	CTG	A	<	2280
N	P	F	S	F	Q	S	D	V	Y	S	Y	G	I	V	L	Y	E	L	M			
	2230				2240				2250				2260			2270						
TG	ACG	GGG	GAG	CTT	CCT	TAT	TCT	CAC	ATC	AAC	AAC	CGA	GAT	CAG	ATC	ATC	TTC	ATG	GTG	G	<	2340
T	G	E	L	P	Y	S	H	I	N	N	R	D	Q	I	I	F	M	V	G			
	2290				2300				2310				2320			2330						
GC	CGA	GGA	TAT	GCC	TCC	CCA	GAT	CTT	AGT	AAG	CTA	TAT	AAG	AAC	TGC	CCC	AAA	GCA	ATG	A	<	2400
R	G	Y	A	S	P	D	L	S	K	L	Y	K	N	C	P	K	A	M	K			
	2350				2360				2370				2380			2390						
AG	AGG	CTG	GTA	GCT	GAC	TGT	GTG	AAG	AAA	GTA	AAG	GAA	GAG	AGG	CCT	CTT	TTT	CCC	CAG	A	<	2460
R	L	V	A	D	C	V	K	K	V	K	E	E	R	P	L	F	P	Q	I			
	2410				2420				2430				2440			2450						
TC	CTG	TCT	TCC	ATT	GAG	CTG	CTC	CAA	CAC	TCT	CTA	CCG	AAG	ATC	AAC	CGG	AGC	GCT	TCC	G	<	2520
L	S	S	I	E	L	L	Q	H	S	L	P	K	I	N	R	S	A	S	E			
	2470				2480				2490				2500			2510						
AG	CCA	TCC	TTG	CAT	CGG	GCA	GCC	CAC	ACT	GAG	GAT	ATC	AAT	GCT	TGC	ACG	CTG	ACC	ACG	T	<	2580
P	S	L	H	R	A	A	H	T	E	D	I	N	A	C	T	L	T	T	S			
	2530				2540				2550				2560			2570						
CC	CCA	AGG	CTG	CCT	GTC	TTC	GTT	CGG	ACA	TAC	GAA	TCA	CGA	ATT	CTG	GAT	CCA	CCG	GTC	G	<	2640
P	R	L	P	V	F	V	R	T	Y	E	S	R	I	L	D	P	P	V	A			
	2590				2600				2610				2620			2630						
CC	ACC	ATG	GTG	AGC	AAG	GGC	GAG	GAG	GAT	AAC	ATG	GCC	ATC	ATC	AAG	GAG	TTC	ATG	CGC	T	<	2700
T	M	V	S	K	G	E	E	D	N	M	A	I	I	K	E	F	M	R	F			
	2650				2660				2670				2680			2690						
TC	AAG	GTG	CAC	ATG	GAG	GGC	TCC	GTG	AAC	GGC	CAC	GAG	TTC	GAG	ATC	GAG	GGC	GAG	GGC	G	<	2760
K	V	H	M	E	G	S	V	N	G	H	E	F	E	I	E	G	E	G	E			
	2710				2720				2730				2740			2750						
AG	GGC	CGC	CCC	TAC	GAG	GGC	ACC	CAG	ACC	GCC	AAG	CTG	AAG	GTG	ACC	AAG	GGT	GGC	CCC	C	<	2820
G	R	P	Y	E	G	T	Q	T	A	K	L	K	V	T	K	G	G	P	L			
	2770				2780				2790				2800			2810						
TG	CCC	TTC	GCC	TGG	GAC	ATC	CTG	TCC	CCT	CAG	TTC	ATG	TAC	GGC	TCC	AAG	GCC	TAC	GTG	A	<	2880
P	F	A	W	D	I	L	S	P	Q	F	M	Y	G	S	K	A	Y	V	K			
	2830				2840				2850				2860			2870						
AG	CAC	CCC	GCC	GAC	ATC	CCC	GAC	TAC	TTG	AAG	CTG	TCC	TTC	CCC	GAG	GGC	TTC	AAG	TGG	G	<	2940
H	P	A	D	I	P	D	Y	L	K	L	S	F	P	E	G	F	K	W	E			
	2890				2900				2910				2920			2930						
AG	CGC	GTG	ATG	AAC	TTC	GAG	GAC	GGC	GGC	GTG	GTG	ACC	GTG	ACC	CAG	GAC	TCC	TCC	CTG	C	<	3000
R	V	M	N	F	E	D	G	G	V	V	T	V	T	Q	D	S	S	L	Q			
	2950				2960				2970				2980			2990						
AG	GAC	GGC	GAG	TTC	ATC	TAC	AAG	GTG	AAG	CTG	CGC	GGC	ACC	AAC	TTC	CCC	TCC	GAC	GGC	C	<	3060
D	G	E	F	I	Y	K	V	K	L	R	G	T	N	F	P	S	D	G	P			
	3010				3020				3030				3040			3050						

```

CC GTA ATG CAG AAG AAG ACC ATG GGC TGG GAG GCC TCC TCC GAG CGG ATG TAC CCC GAG G < 3120
V M Q K K T M G W E A S S E R M Y P E D
3070 3080 3090 3100 3110

AC GGC GCC CTG AAG GGC GAG ATC AAG CAG AGG CTG AAG CTG AAG GAC GGC GGC CAC TAC G < 3180
G A L K G E I K Q R L K L K D G G H Y D
3130 3140 3150 3160 3170

AC GCT GAG GTC AAG ACC ACC TAC AAG GCC AAG AAG CCC GTG CAG CTG CCC GGC GCC TAC A < 3240
A E V K T T Y K A K K P V Q L P G A Y N
3190 3200 3210 3220 3230

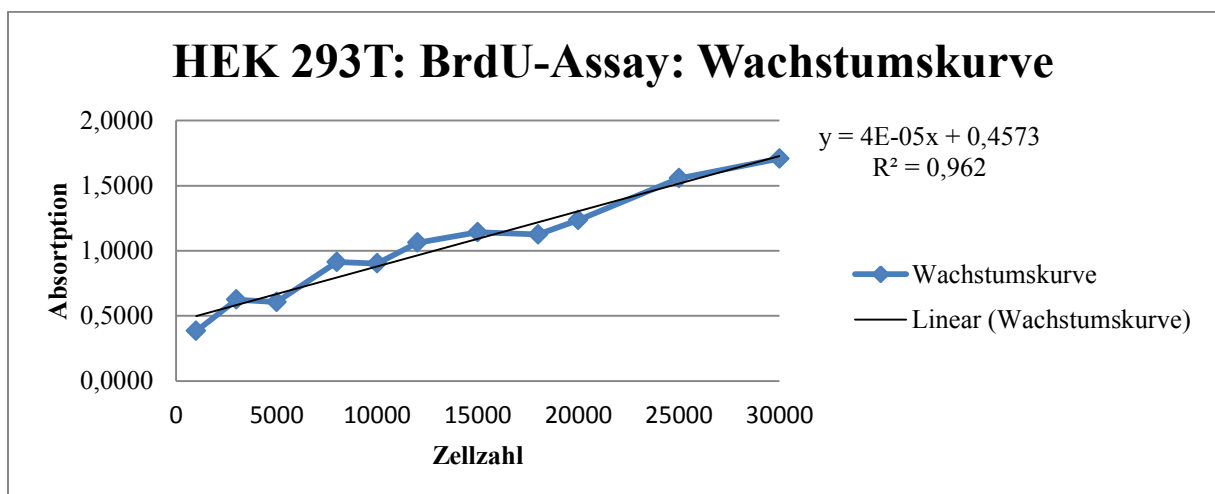
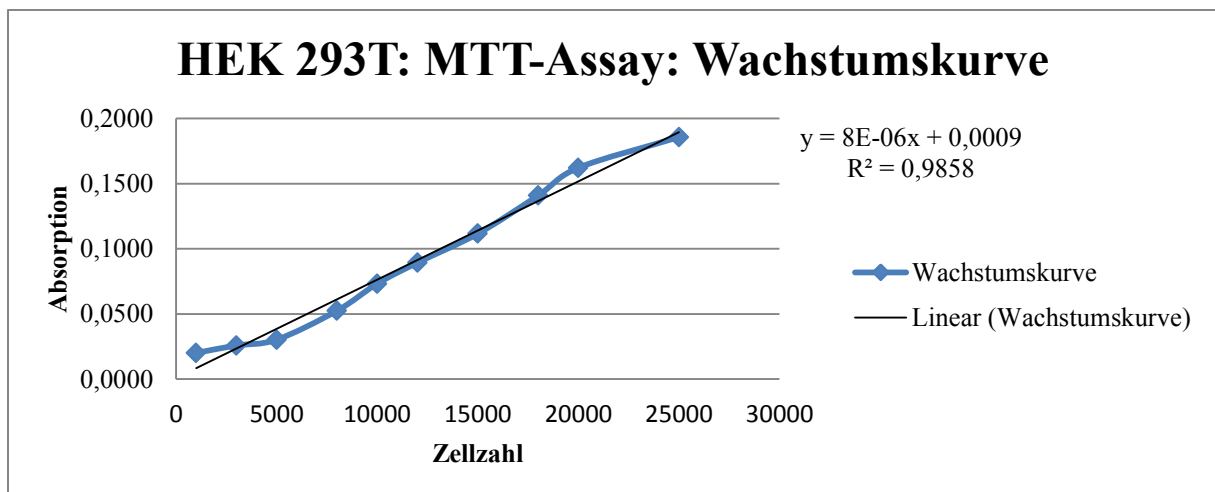
AC GTC AAC ATC AAG TTG GAC ATC ACC TCC CAC AAC GAG GAC TAC ACC ATC GTG GAA CAG T < 3300
V N I K L D I T S H N E D Y T I V E Q Y
3250 3260 3270 3280 3290

AC GAA CGC GCC GAG GGC CGC CAC TCC ACC GGC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAG CGG ... < 3360
E R A E G R H S T G G M D E L Y K * R
3310 3320 3330 3340 3350

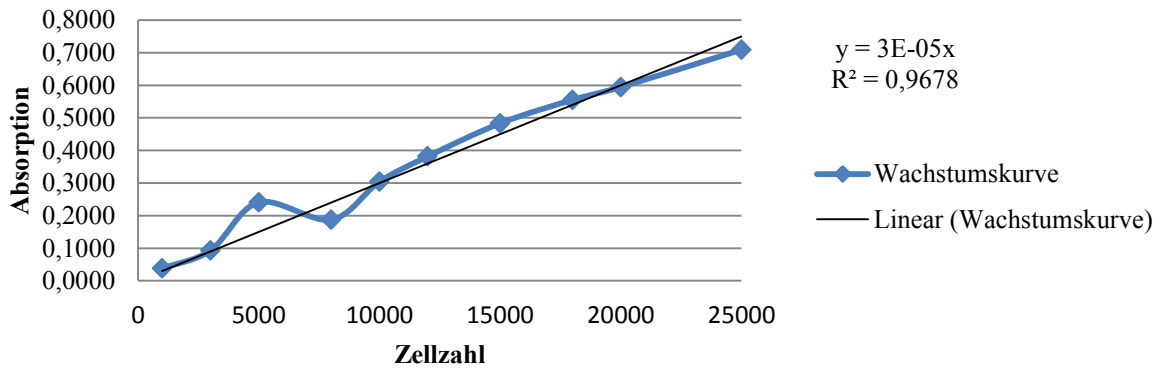
```

Anhang 5: Die Sequenzen von c-Raf (rosa) und mCherry (rot) wurden farblich hervorgehoben.

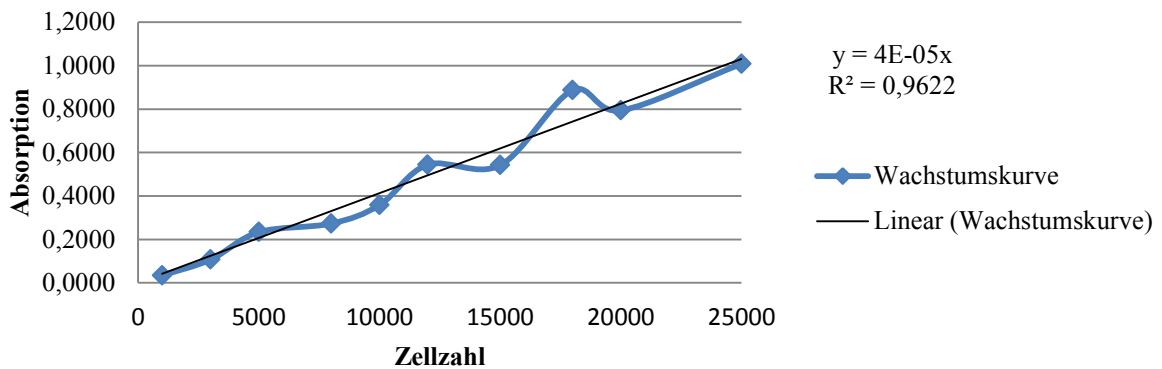
7.4 Wachstumskurven von HEK293T und HT29 Zellen



HT29: MTT-Assay: Wachstumskurve



HT29: BrdU-Assay: Wachstumskurve



Anhang 6: Wachstumskurven von HEK 293T und HT29 Zellen im MTT-Assay beziehungsweise im BrdU-Assay (n=6)

7.5 Danksagung

7.6 Lebenslauf

7.7 Liste der Publikationen

Originalarbeiten:

Measured Effects of Wnt3a on Proliferation of HEK293T Cells Depend on the Applied Assay. Reischmann P, Fiebeck J, von der Weiden N, Müller O. (Int J Cell Biol. 2015;2015:928502. doi: 10.1155/2015/928502. Epub 2015 Dec 22)

Fluorescence-based gene reporter plasmid to track canonical Wnt signaling in ENS inflammation. Di Liddo R, Bertalot T, Schuster A, Schrenk S, Müller O, Apfel J, Reischmann P, Rajendran S, Sfriso R, Gasparella M, Parnigotto PP, Conconi MT, Schäfer KH. (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2016 Mar 15;310(6):G337-46. doi: 10.1152/ajpgi.00191.2015. Epub 2016 Jan 14)

A New Fluorescence-Based Reporter Gene Vector as a Tool for Analyzing and Fishing Cells with Activated Wnt Signaling Pathway. Apfel J., Reischmann P., Müller O., (ISRN Oncology, Vol. 2013, Article ID 603129, 8 pages, 2013. doi:10.1155/2013/603129)

Delayed c-Fos activation in human cells triggers XPF induction and an adaptive response to UVC-induced DNA damage and cytotoxicity. Tomicic M., Reischmann P., Rasenberger B., Meise R., Kaina B., Christmann M. (Cell Mol Life Sci. May 2011; 68(10): 1785–1798)

Buchbeiträge:

The Wnt signaling network in cancer. Invited book chapter for “Systems Biology of Cancer” by Johanna Apfel, Jignesh R. Parikh, Patricia Reischmann, Rob M. Ewing, Oliver Müller, Yu Xia, Isabel Dominguez (Cambridge University Press, Editor: Samuel Thiagalingam) Publisher: Cambridge University Press, 2015, Chapter DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511979811.016> pp 222-255)

Kongressbeiträge:

New fluorescence-based cell assays for visualizing the Raf-Ras interaction and the Wnt pathway activity. Reischmann P., Apfel J., Müller O. [AACR, 06.-10.04.2013, Washington D.C., USA]

A novel cell assay to screen for wnt pathway inhibiting drugs. Apfel J., Reischmann P., Müller O. [European Cancer Congress, 27.09.-01.10.2013, Amsterdam, Netherlands]

Direct visualizing of the activity of the Ras/Raf pathway by fluorescent cell assay. Reischmann P., Apfel J., Müller O. [Cell Symposia Hallmarks of Cancer, 29.-31.10.2012, San Francisco, USA]

New fluorescence-based cell assay for visualizing the Wnt signaling pathway. Apfel J., Reischmann P., von der Weiden N., Müller O. [24th EORTC-NCI-AACR Symposium on 'Molecular Targets and Cancer Therapeutics', 06.-09.11. 2012, Dublin, Ireland]

cFos/AP1-mediated regulation of XPF and TREX1 in human and murine cells upon genotoxic stress. Tomicic M. T., Aasland D., Reischmann P., Rasenberger B., Kaina B. and Christmann M. [2nd German-French DNA Repair Meeting “DNA Damage and Repair in Ageing and Degenerative Diseases” 20.-23.09.2009, Konstanz, Germany]

c-Fos/AP-1 dependent regulation of the three prime exonuclease 1 (TREX1) by genotoxic stress. Christmann M., Tomicic M. T., Aasland D., Schulz J., Berdelle N., Reischmann P., Birkner R., Rasenberger B. and Kaina B. [46th Congress of the European Societies of Toxicology. September 13th to 16th, 2009, Dresden, Germany]

Complex regulation of three prime exonuclease 1 (TREX1) by genotoxic stress: Fos-dependent gene induction, nuclear translocation, and interaction with DNA polymerase eta. Christmann M., Tomicic M. T., Aasland D., Schulz J., Reischmann P., Berdelle N., Birkner R., Rasenberger B. and Kaina B. [10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), 39th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS), 20.-25.08.2009, Fierenze, Italy]

Gebrauchsmustereintragung:

Plasmid-Vektor zur Anreicherung und zur Analyse von Zellen mit aktiviertem Wnt-Signalweg. Apfel J., Reischmann P., Müller O. [Nr: 202013006982.1, IPC:C12N 15/79, 19.11.2013, Germany]

7.8 Eidesstattliche Erklärung des Autors

Gemäß § 11 Abs. 3d der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz vom 22.12.2003 versichere ich hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel in der Arbeit angegeben habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Textstellen, Tabellen oder Grafiken sind als solche gekennzeichnet. Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits als Prüfungsarbeit in eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht wurde. Ebenso wurde die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile einer Abhandlung bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, April 2017

Patricia Reischmann