

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse der Effekte der *MEK1*^{S212N}-Mutation hinsichtlich
Signaltransduktion und Phänotyp in Rattenfibroblasten und HEK293-
Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Xylander
aus Jena

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Abstract.....	9
2 Kurzfassung.....	10
3 Einleitung.....	11
3.1 Das kolorektale Karzinom	11
3.2 Tumorentstehung.....	11
3.2.1 Begriffsklärung.....	11
3.2.2 Mechanismus.....	11
3.2.3 Die Signalkaskade der MAP-Kinasen	13
3.3 Eigenschaften von MEK.....	14
3.3.1 Aufbau und Arbeitsweise von MEK	14
3.3.2 MEK-assoziierte Erkrankungen	16
3.4 Klinische Einordnung und Bedeutung für die Forschung.....	17
3.5 Zielsetzung der Arbeit	19
4 Material und Methoden.....	21
4.1 Material.....	21
4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
4.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	23
4.1.3 Stammlösungen und Puffer.....	26
4.1.4 Antibiotika	29
4.1.5 Molekularbiologische Kits.....	30
4.1.6 Enzyme	31
4.1.7 Antikörper.....	31
4.1.8 Primer.....	32
4.1.9 Plasmide.....	33
4.1.10 Zelllinien.....	38
4.1.11 Bakterienstämme	38
4.1.12 Software	39
4.2 Methoden	40

4.2.1	Zellkultur.....	40
4.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	41
4.2.2.1	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Stämme.....	41
4.2.2.2	Kultivierung der kompetenten <i>E. coli</i> -Stämme	42
4.2.2.3	Insertmodifikation mittels site-directed mutagenesis	42
4.2.2.4	Enzymatische Modifikation von DNA	45
4.2.2.5	Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	47
4.2.2.6	Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	47
4.2.2.7	Sequenzierung von DNA nach Sanger	48
4.2.2.8	Sequenzierung von Patientenmaterial aus Karzinompatienten	48
4.2.3	Virologische Methoden.....	48
4.2.3.1	Lentivector Packaging	48
4.2.3.2	Lentivirale Transduktion.....	49
4.2.4	Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (FACS).....	49
4.2.5	Proteinchemische Methoden	50
4.2.5.1	Proteinextraktion	50
4.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	51
4.2.5.3	SDS-PAGE.....	51
4.2.5.4	Western Blot.....	53
5	Ergebnisse	55
5.1	Sequenzierung von Patientenmaterial aus Karzinompatienten.....	55
5.2	Herstellung von Zelllinien mit der <i>MEK1^{S212N}</i> -Mutation	56
5.2.1	Klonierung der MEK1-Trägerplasmide.....	57
5.2.2	Klonierung der MEK1-GFP-Expressionsplasmide	59
5.2.3	Lentivirale Transduktion von Hek293 und 208F	62
5.2.4	Analyse der Transduktionseffizienz der lentiviralen Transduktion	62
5.2.4.1	Fluoreszenzmikroskopie	62
5.2.4.2	Durchflusszytometrie (FACS).....	66
5.3	Analyse der Eigenschaften der <i>MEK1^{S212N}</i> -tragenden Zellen auf Proteinebene.....	70
5.3.1	Überprüfung der MEK1-Proteinbiosynthese	70
5.3.2	Analyse der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2.....	74
5.4	Morphologische Eigenschaften der <i>MEK1^{S212N}</i> -tragenden 208F-Zellen.....	75
6	Diskussion	79
6.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	79
6.2	Kritische Betrachtung der Ergebnisse	79

6.3	Methodische Limitationen und Anregungen zur Optimierung/Weiterführung	81
6.4	Klinische Einordnung und Bedeutung für die Forschung.....	82
6.5	Schlussfolgerung	82
7	Literaturverzeichnis	83
	Eidesstattliche Versicherung.....	93
	Tabellarischer Lebenslauf.....	94
	Danksagung	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelsteins Modell.....	12
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges	14
Abbildung 3:	Lineares Modell von MEK1 (schematisch).....	15
Abbildung 4:	Schematischer Aufbau des Plasmids pMEV-2HA.....	34
Abbildung 5:	Schematischer Aufbau des Plasmids pCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP	35
Abbildung 6:	Schematischer Aufbau des Plasmids psPAX2	37
Abbildung 7:	Schematischer Aufbau des Plasmids pMD2.G	37
Abbildung 8:	Auszug aus der Sanger-Sequenz von MEK1 eines Patienten mit einem Kolonkarzinom	55
Abbildung 9:	Auszug aus der Sanger-Sequenz von MEK1 des Patienten mit einem Kolonkarzinom	56
Abbildung 10:	Schematische Gliederung der Ergebnisse.....	57
Abbildung 11:	Ausschnitt aus der Sanger-Sequenz für pMEV-MEK1-S212N.....	59
Abbildung 12:	Ausschnitt aus der Sanger-Sequenz für pMEV-MEK1-S212D.....	59
Abbildung 13:	Klonierung des Expressionsplasmids für die MEK1-Konstrukte, schematisch dargestellt.....	60
Abbildung 14:	Kontrollverdau der Ligation der Expressionsplasmide	61
Abbildung 15:	Hek293-Zellen 4 Tage nach lentiviraler Transduktion	63
Abbildung 16:	Hek293-Zellen 8 Tage nach lentiviraler Transduktion	64
Abbildung 17:	FACS-Analyse für Hek293-Populationen 14 Tage nach lentiviraler Transduktion	67
Abbildung 18:	FACS-Analyse für die 208F-Populationen 12 Tage nach lentiviraler Transduktion.....	69
Abbildung 19 :	Relative MEK1-Proteinbiosynthese in Hek293-Zellen 4 Tage nach lentiviraler Transduktion.....	71
Abbildung 20:	Relative MEK1-Proteinbiosynthese in Hek293-Zellen 13 Tage nach lentiviraler Transduktion (zweite Population).....	72
Abbildung 21:	Relative MEK1-Proteinbiosynthese in 208F-Zellen 4 und 9 Tage nach lentiviraler Transduktion	73
Abbildung 22:	Relative p-ERK1/2-Proteinmenge in Hek293-Zellen 4 Tage nach lentiviraler Transduktion.....	74
Abbildung 23:	Morphologie der 208F-Zellen 3 Tage nach lentiviraler Transduktion.....	76

Abbildung 24: Morphologie der 208F-Zellen 7 Tage nach lentiviraler Transduktion..... 77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien	23
Tabelle 3: Stammlösungen und Puffer	26
Tabelle 4: Zusammensetzung der Gele für SDS-Page	29
Tabelle 5: Zusammensetzung der Agarose-Gele	29
Tabelle 6: Eingesetzte Antibiotika	29
Tabelle 7: Angewandte Kits	30
Tabelle 8: Eingesetzte Enzyme	31
Tabelle 9: Eingesetzte Antikörper	31
Tabelle 10: Eingesetzte Primer	32
Tabelle 11: Eingesetzte Bakterienstämme	38
Tabelle 12: Angewandte Software	39
Tabelle 13: dsDNA- und ddH ₂ O-Volumina für die site-directed mutagenesis	43
Tabelle 14: Cycling-Parameter für die PCR	44

Abkürzungsverzeichnis

Gene, Biomoleküle, klinische Begriffe

AG	Arbeitsgruppe
APC	Adenomatous polyposis coli
AS	Aminosäure
CFC-Syndrom	Cardio-Facio-Cutanes Syndrom
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanindiphosphat
GTP	Guanintriphosphat
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
K-Ras	Kirsten-Ras
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MCS	Multiple cloning site
MMR	Mismatch-repair
mRNA	Messenger RNA
RNA	Ribonucleic acid

Material und Methoden

Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine serum albumine

ddH₂O	Doppelt destilliertes Wasser
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fetal calf serum
Ig	Immunglobulin
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	Loading buffer
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline plus Tween
PCR	Polymerase chain reaction
rb	Rabbit
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel elektrophoresis
TBST	Tris buffered saline plus Tween

1 Abstract

The MAPK signaling pathway is a major focus of current cancer research. About 30 % of all cancers show activating mutations in the MAPK signaling pathway (Nandan and Yang 2011, Hoshino et al. 1999). A major example of tumors in which MAPK pathway mutations are important is colorectal cancer (CRC). CRC is the third most common cause of death by cancer in Germany (Robert Koch-Institute 2019). The MEK isoforms play a central role between ERK and Raf in the MAPK signaling pathway. Mutations in the MEK1 gene have been shown to alter the proliferation of cell (Jindal et al. 2017). By genome panel sequencing it was found that a colorectal cancer cell line harbours a *MEK1^{S212N}* mutation. This cell line was derived from a hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) of a patient who suffered from Lynch syndrome.

The aim of the present thesis was to characterize the hitherto uncharacterized *MEK1^{S212N}* mutation in order to assess if it may be implicated in the development of CRC. The central questions were if mutations of MEK1 are present in tumors, and if the expression of *MEK1^{S212N}* *in vitro* leads to increased activation of the downstream protein, ERK1/2.

To address this question, the MEK1 gene of a cohort of carcinomas was sequenced. Furthermore, different constructs of MEK1 mutants were generated and cloned into lentiviral plasmids. These transgenes were then introduced in Hek293 and 208F cells, and the effect of the synthesis of mutant MEK1 proteins was subsequently investigated using biochemical and morphological methods.

The data presented in this thesis shows that *MEK1^{S212N}* was detected in a few carcinomas. Furthermore, it was possible to generate stable transgene cell lines that significantly express the MEK constructs. However, with the methods used in this thesis, no change in the activity of the signaling pathway and no change of the cell morphology due to the expression of *MEK1^{S212N}* could be detected.

With these results, the functional relevance for affected cells and tissues remains unclear.

2 Kurzfassung

Der MAPK-Signalweg ist einer der zentralen Forschungsschwerpunkte in der aktuellen Krebsforschung. Etwa 30 % der Krebserkrankungen (Nandan und Yang 2011; Hoshino et al. 1999) lassen sich auf Mutationen in diesem Signalweg zurückführen. Darunter befindet sich auch die Gruppe der kolorektalen Karzinome, die die dritthäufigste Ursache für vorzeitige Todesfälle durch Tumoren in Deutschland ausmachen (Robert Koch-Institut 2019).

MEK-Proteine nehmen eine zentrale Stellung innerhalb des MAPK-Signalwegs zwischen Raf und ERK ein. Mutationen in MEK1 können so z. B. die Proliferation einer Zelle stark beeinflussen (Jindal et al. 2017).

In der Kolonkarzinomzelllinie LIM1215 ist bei einer Panel-DNA-Sequenzierung die *MEK1^{S212N}*-Mutation gefunden worden. Diese Zelllinie ist aus dem HNPCC eines Patienten mit Lynch-Syndrom generiert worden.

Ziel dieser Arbeit ist es, festzustellen, ob die Mutation eine funktionelle Rolle im Darmkrebs spielt. Dafür soll geklärt werden, ob eine Expression von MEK1(S212N) *in vitro* in den eigens dafür eingesetzten Zellsystemen zu einer Steigerung von phosphoryliertem ERK1/2 führt und damit eine konstitutiv aktive Form des MEK1 darstellt. Weiterhin sollen im murinen 208F-Zellsystem eventuelle Änderungen der Zellmorphologie in Abhängigkeit der Expression von MEK1(S212N) detektiert werden.

Es sind verschiedene MEK1-Konstrukte generiert und in Trägerplasmide kloniert worden, um mittels lentiviraler Partikel die Zelllinien Hek293 und 208F stabil zu transduzieren. Anschließend sind mittels Western Blot und Mikroskopie die Auswirkungen von *MEK1^{S212N}* auf die biochemischen und morphologischen Eigenschaften der Zellen analysiert worden.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten belegen, dass die *MEK1^{S212N}*-Mutation in einzelnen Karzinomen nachgewiesen werden kann. Es ist außerdem gelungen, mit den genannten Methoden stabile transgene Zellen herzustellen, die das MEK1-Konstrukt ausreichend stark überexprimierten. Jedoch ist mit den gewählten Methoden keine Veränderung der Signalwegaktivität oder Veränderung der Zellmorphologie durch eine Expression dieser Mutation nachgewiesen worden. Die funktionelle Relevanz für die betroffenen Zellen und das Gewebe bleibt unklar.

3 Einleitung

3.1 Das kolorektale Karzinom

Karzinome des Kolons und des Rektums – zusammen als kolorektale Karzinome bezeichnet – gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen beim Menschen. Mit über 58.000 Neuerkrankungen im Jahr 2016 sind sie in Deutschland die zweithäufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen und die dritthäufigste bei Männern. Zudem stellen sie nach dem Prostatakarzinom bei Männern und nach dem Bronchialkarzinom bei Frauen die häufigste Krebstodesursache dar (Robert Koch-Institut 2019).

3.2 Tumorentstehung

3.2.1 Begriffsklärung

Jede Schwellung eines Gewebes gilt zunächst als Tumor. Im engeren Sinn handelt es sich dabei um eine Wucherung von Zellen, die keiner Wachstumskontrolle mehr unterliegen (vgl. Rassow et al. 2006: 522). Im Gegensatz zu einem benignen Tumor ist ein maligner Tumor in das umliegende Gewebe hineingewachsen und bildet Absiedlungen – sogenannte Metastasen (ebda.).

3.2.2 Mechanismus

Voraussetzung für die Transformation einer normalen Zelle zu einer Tumorzelle ist eine Reihe genetischer und epigenetischer Veränderungen (Hanahan & Weinberg 2000). Dieser Prozess erstreckt sich in der Regel über einen langen Zeitraum und bedarf meist einer großen Anzahl an Mutationen unterschiedlicher Gene, die anschließend an die Tochterzellen weitergegeben werden.

Eine Krebszelle besitzt Eigenschaften, die die meisten normalen Zellen nicht aufweisen. Dazu zählen selbstinduziertes Wachstum, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumseinschränkender Regulation, unbegrenzte Proliferation, anhaltende Angiogenese, Unempfindlichkeit gegenüber Apoptosesignalen und Absiedelung in andere Gewebe (Hanahan & Weinberg 2000).

Beim kolorektalen Karzinom ist das Epithel des Dick- und des Mastdarms das Ausgangsgewebe für die Veränderungen. Derzeit gibt es u. a. zwei Mechanismen, die hauptsächlich für die Tumorentstehung verantwortlich sind.

Beim klassischen Mechanismus, der Adenom-Karzinom-Sequenz, entsteht in 80–90 % der nichthereditären Tumoren zunächst ein gutartiger Tumor – ein Adenom –, der im Anschluss maligne zu einem Karzinom entartet (Nowell 1976, Vogelstein 1988). Dabei ist entscheidend, dass nicht eine, sondern mehrere Mutationen meist über Jahre akkumuliert zusammenspielen

(Vogelstein 1993). Vogelstein geht davon aus, dass die meisten kolorektalen Karzinome über eine stufenweise Akkumulation mehrerer Mutationen ausgehend von einer Mutation im APC-Gen, einem Tumorsuppressorgen, entstehen. So bildet sich aus einem normal entwickelten Epithel zunächst ein Adenom. Dessen Zellen rufen nach weiterer genetischer Modifikation Atypien im Gewebe hervor, die schließlich weiter entarten und ein Karzinom formen. Höhepunkt der Entartung ist die Entstehung eines invasiven Karzinoms mit Metastasierung in ferne Gewebe.

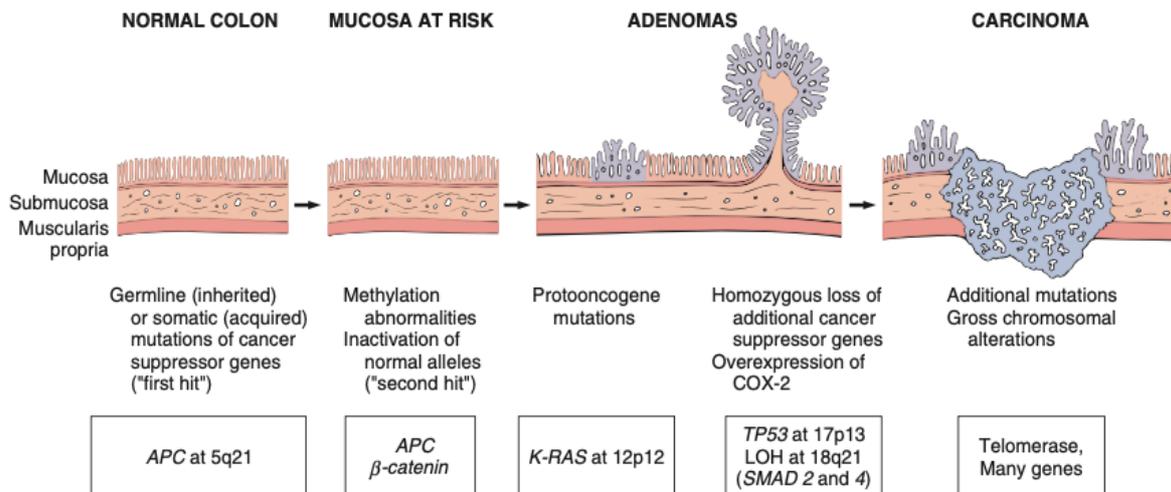


Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelsteins Modell (Kumar et al. 2018: 631)

An der Tumorentstehung sind verschiedene Mutationsformen beteiligt. Einerseits gibt es Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie dem Gen für APC (70–80 % der Fälle), das das Zellwachstum reguliert, oder dem Gen für p53, das an der Wachstumshemmung abnormaler Zellen beteiligt ist (Rassow et al. 2006: 527). Um in einem Tumorsuppressorgen einen Funktionsverlust zu erleiden, müssen beide dazugehörigen Allele von deaktivierenden Mutationen betroffen sein. Es handelt sich also um rezessive Mutationen. Andererseits gibt es Mutationen in Protoonkogenen, die an den Signalkaskaden für Wachstum, Überleben und Proliferation beteiligt sind (Markowitz und Bertagnolli 2009). Einer der bedeutendsten Signalwege ist die Ras-Raf-MAP-Kinasen-Kaskade (auch Ras-Raf-MEK-ERK-Weg genannt), wobei Mutationen an K-Ras am häufigsten vorkommen (Karnoub und Weinberg 2008). Schon bei einer einzelnen aktivierenden Mutation auf einem der beiden Allele, kommt es zur Förderung der Zellproliferation. Diese Mutationen sind also dominant. Beide Mutationsformen begünstigen ein Ungleichgewicht in Richtung Proliferation.

Beim zweiten Tumorentstehungsmechanismus begünstigen Mutationen in Genen, die für DNA-Reparatur-Enzyme kodieren, die Entartung der Zellen. Keimbahnmutationen in den MMR(Mismatch Repair)-Genen *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* sind für 70–85 % der hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinome (HNPCC) verantwortlich (Cox et al. 2018). Diese Mutationen können allerdings auch sporadisch auftreten. Die MMR-Enzyme sind für die Reparatur der DNA verantwortlich. Sie erkennen bei der DNA-Replikation entstehende falsche Basenpaarungen und schneiden sie heraus (Fukui 2010). Die herausgeschnittenen Elemente werden durch die DNA-Polymerase wieder ergänzt. Kommt es durch Zufall zu einer Mutation in dem ‘gesunden’ Allel dieser Reparaturgene, so entfällt die Synthese korrekt gebauter DNA-Reparatur-Enzyme und das Risiko für das Fortbestehen fehlerhafter DNA-Replikationen steigt (Hsieh und Yamane 2008). Als Folge entstehen Zellen mit neuen Mutationen, die ein Ungleichgewicht in Richtung Proliferation verursachen und eine maligne Entartung des Gewebes nach sich ziehen können.

3.2.3 Die Signalkaskade der MAP-Kinasen

Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg übersetzt extrazelluläre Signale von Rezeptoren auf der Zelloberfläche in Genexpression und Genregulation (Busca et al. 2016). Je nach Zelltyp und Stimulus kann über diesen Signalweg das Fortbestehen der Zelle oder der Zelluntergang kontrolliert werden (Chang et al. 2003), da der Eingriff in den Zellzyklus über Proliferation, Differenzierung und Apoptose bestimmt (Arkun und Yasemi 2018). Abweichungen in diesem Signalweg können das Gleichgewicht der regulierenden Prozesse innerhalb der Zelle in eine proproliferative Richtung beeinflussen.

Das Ras-Protein ist Produkt eines Protoonkogens. Es ist über einen Lipidanker an die Zellmembran (siehe Abbildung 2) gebunden und ruht dort in Form von Ras-GDP (Meloche und Pouysségur 2007). Über eine Rezeptortyrosinkinase, die ihrerseits durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren wie EGF aktiviert wird, erfolgt über diverse Zwischenschritte die Bindung von GTP an Ras (Kolch 2000). Sobald Ras aktiv ist aktiviert es seinerseits Raf (Orton 2001), eine MAPKKK, die wiederum über eine Phosphorylierung von MEK, einer MAPKK, die Aktivierung einer MAP-Kinase (MAPK) nach sich zieht (Fischmann et al. 2009). Die Targets dieser MAP-Kinase sind vorwiegend Transkriptionsfaktoren, die – ebenfalls über eine Phosphorylierung aktiviert – die Transkription von Genen im Zellkern initiieren (Katz et al. 2007).

Die für diese Arbeit bedeutendste MAP-Kinase ist ERK. Es hat zwei Isoformen: ERK1 und ERK2. Diese gleichen sich zu 90 % und werden von MEK, einer Tyrosin-Threonin-Kinase, an

den Resten der Aminosäuren Tyrosin (Y204/187) und Threonin (T202/185) phosphoryliert (Bromberg-White et al. 2012). Um aktiv zu sein, müssen beide Reste phosphoryliert werden.

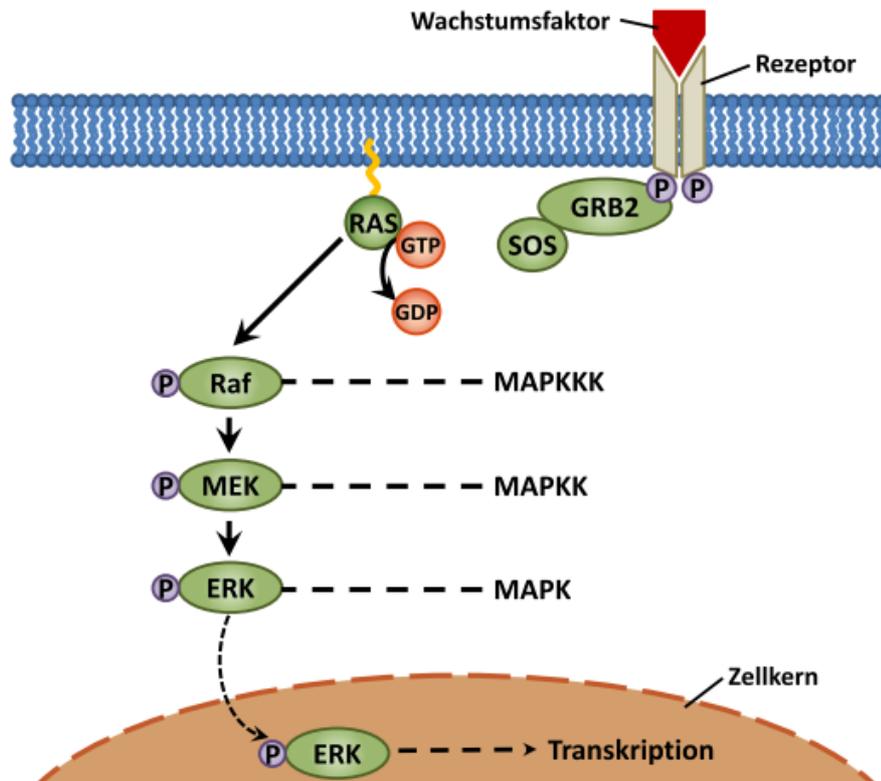


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges
(Abbildung modifiziert nach: Bollag et al. 2012)

3.3 Eigenschaften von MEK

3.3.1 Aufbau und Arbeitsweise von MEK

Die Kinase MEK beeinflusst im Rahmen des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges zahlreiche fundamentale Zellfunktionen. MEK spielt u. a. eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese, bei Immunreaktionen, bei der Organogenese und bei der Extremitätenentwicklung (Bromberg-White et al. 2012).

MEK1 und MEK2 werden über eine Phosphorylierung von Serin und Threonin aktiviert. MEK1 hat eine Länge von 393, MEK2 eine Länge von 400 Aminosäuren. Beide Kinasen gleichen sich zu 80 % (Bromberg-White et al. 2012).

Im Folgenden wird der Aufbau von MEK1 beispielhaft erklärt (nach Fischmann et al. 2009). Auf die Abweichungen zu MEK2 soll hier nicht weiter eingegangen werden.

Am N-Terminus (siehe Abbildung 3) von MEK1 befindet sich die D-Domäne (AS 1–32). Dies ist die Andockstelle (docking site) für ERK. Deletionen oder Mutationen in diesem Bereich führen über eine behinderte Bindung an ERK zu einer reduzierten Phosphorylierung dessen (Fukuda et al. 1997, Xu et al. 2001). Daran schließt sich die Kern-Export-Sequenz (KES) an (AS 33–44, Bromberg-White et al. 2012). Diese bestimmt die Lokalisation von MEK1 im Zytoplasma. Darauf folgt die Region für die negative Regulation (NRR) (AS 44–51). Diese ist essenziell für die Aktivität von MEK1. Die hier wirkenden Aminosäuren beeinflussen die Molekülkonformation dahingehend, dass die ATP-Bindungsstelle blockiert und die enzymatische Aktivität von MEK1 reduziert wird (Fischmann et al. 2009). Entfällt durch genetische Veränderung diese negative Regulation, steigt die Enzymaktivität deutlich an (Mansour et al. 1996).

Daran anschließend findet sich die katalytische Kerndomäne. Änderungen der Aminosäuresequenz in diesem Abschnitt haben aufgrund dessen zentraler Bedeutung weitreichende Folgen für die Aktivität von MEK1. Die katalytische Kerndomäne enthält folgende separat zu erwähnenden Regionen: eine ATP-Bindungsstelle (AS 143–146), einen katalytischen Loop (AS 192–195) mit dem Mg²⁺-Loop (AS 208–210), ein Aktivierungssegment (AS 208–233) und eine prolinreiche Region (AS 262–307). Letztere ist vor allem für die Bindung an ERK und dessen Aktivierung essenziell.

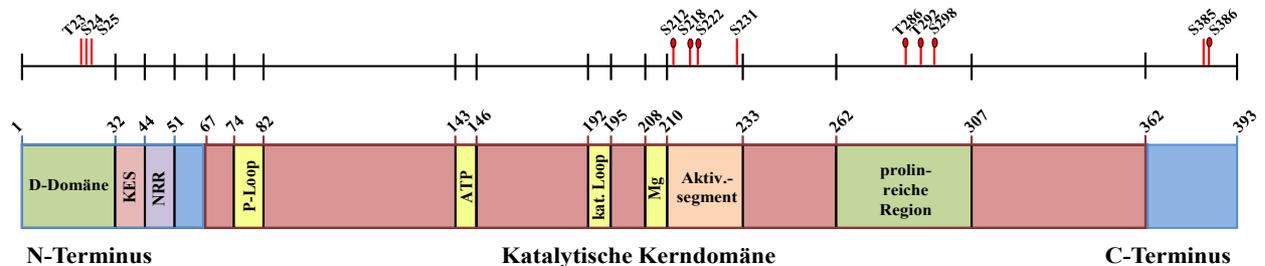


Abbildung 3: Lineares Modell von MEK1 (schematisch)

Die verschiedenfarbig markierten Abschnitte stehen für die im Text erwähnten funktionellen Regionen des Enzyms. Darüber sind die jeweiligen Aminosäuren zu finden. Die auf der oberen Linie markierten Aminosäuren zeigen die Position der vorhergesagten (ohne Oval) und experimentell bestätigten (mit Oval) Phosphorylierungsstellen von MEK1 (Abbildung modifiziert nach Bromberg-White et al. 2012).

Die Aktivierung von MEK1 erfolgt über die Phosphorylierung von S218 und S222 durch Raf im Aktivierungssegment (Zheng und Guan 1994). Daraufhin erfolgt eine Konformationsänderung, sodass die katalytische Kerndomäne ihre Funktion aufnehmen kann. Infolgedessen wird ERK

gebunden und am Tyrosinrest phosphoryliert. Anschließend dissoziiert es wieder und wird für die Phosphorylierung am Threoninrest erneut gebunden.

Innerhalb der prolinreichen Region befinden sich mehrere Bereiche zur Auto- und Retrophosphorylierung (Brunet et al. 1994), die für eine Reihe an Regulationsmechanismen von Bedeutung sind. Einen weiteren Bereich dieser Art stellt die Aminosäure Serin an Stelle 212 dar. Gopalbhai et al. zeigten 2003, dass MEK1 in intakten Zellen an dieser Stelle phosphoryliert wird. Eine Substitution dieser Aminosäure mit Alanin zog dabei eine Verstärkung der Enzymaktivität nach sich, eine Substitution mit einer phosphomimetischen Aminosäure hingegen inaktivierte das Enzym vollständig (Gopalbhai et al. 2003). S212 stellt damit eine wesentliche Schnittstelle zur negativen Regulation dar.

3.3.2 MEK-assoziierte Erkrankungen

Im Vergleich zu Ras und Raf wurde das MEK-Molekül weniger intensiv untersucht und spielte aus Sicht der klinischen Forschung für die Ursache von Krebserkrankungen bisher eine untergeordnete Rolle. Veränderungen im MEK-Molekül sind jedoch ebenso folgenschwer.

Die Isoform MEK1 ist in 76 % der kolorektalen Karzinome verstärkt aktiv (Lemieux et al. 2009). Somit wird über eine vermehrte Aktivierung von ERK1/2 die Aktivierung von proliferativen Transkriptionsfaktoren ausgelöst. Eine direkte Mutation von *MEK1* bzw. *MEK2* tritt jedoch nur in etwa 3 % der Fälle auf. Die durch genomische Screenings gefundenen *MEK1*-Mutationen waren R201H, E203K, Y134C (Bentivegna et al. 2008) und D67N (Murugan et al. 2009). Letztere ist eine konstitutiv aktivierende Mutation, die die Kinase also grundlegend anschaltet und ihre Aktivität damit steigert. In *MEK2* konnte die R388Q-Mutation ermittelt werden (Bromberg-White et al. 2012).

Weitere Erkrankungen oder Syndrome, bei denen das Auftreten von *MEK*-Mutationen erforscht wurde, sind folgende:

Beim Cardio-Facio-Cutanen(CFC)-Syndrom konnten durch Rodriguez-Viciana et al. 2006 Mutationen in *MEK1* (F53S, Y130C) und *MEK2* (F57C) nachgewiesen werden. In weiteren Untersuchungen wurden in 20-25% der CFC-Syndrome *MEK*-Mutationen nachgewiesen. Dabei treten diese entweder in dem Bereich für die negative Regulation oder in der katalytischen Domäne auf. Stets ist eine erhöhte MEK-Aktivität die Folge. Für die *MEK1*^{Y130H}-Mutation konnte bestätigt werden, dass es sich um eine konstitutiv aktivierende Mutation handelt (Hao et al. 2008).

Beim malignen Melanom konnten durch Nikolaev et al. 2011 vier isolierte Mutationen in *MEK1* (P124S, E203K, F53L und N382H) und eine isolierte Mutation in *MEK2* (S154F) nachgewiesen

werden. Die *MEK1/2*-Mutationen E203K und E207K traten hingegen auch kombiniert mit BRAF-Mutationen auf. Für die *MEK1*-Mutationen P124S, E203K und F53L konnte nachgewiesen werden, dass auch diese MEK1 konstitutiv aktivieren (Nikolaev et al. 2011).

Für das Non-small-Cell-Lungenkarzinom konnte 2008 durch Marks et al. und 2010 durch Sasaki et al. eine Mutation für *MEK2* (P298L) und eine für *MEK1* (K57N) nachgewiesen werden, wobei letztere nicht von anderen Mutationen im MAPK-Signalweg begleitet wird. Außerdem bringt auch diese eine konstitutiv aktive MEK1-Variante hervor (Marks et al. 2008).

In Ovarialkarzinomzelllinien konnte die bereits oben erwähnte *MEK1*-Mutation D67N nachgewiesen werden (Estep et al. 2007).

3.4 Klinische Einordnung und Bedeutung für die Forschung

MEK hat nicht nur bei der Entstehung von Karzinomen eine große Bedeutung erlangt, sondern auch in der Therapie maligner Erkrankungen.

Da MEK1/2 im MAPK-Signalweg u. a. eine wichtige signalvermittelnde Stellung hinter Ras einnimmt, stieg in den letzten Jahren die Bedeutung von MEK-Inhibitoren als Werkzeug in der medikamentösen Therapie von Karzinomen. Beispielsweise konnten beim malignen Melanom verschiedene BRAF-Mutationen gefunden werden. Die wohl bedeutendste und bekannteste ist die V600E-Mutation. Sie sorgt durch eine Aktivierung von BRAF für eine positive Verstärkung des MAPK-Signalwegs. Die Hemmung von BRAF und seinem nachgeschalteten Enzym MEK1/2 kann die von diesem Signalweg ausgehenden Wachstumssignale unterdrücken und somit die Proliferation der Tumorzellen verhindern oder verlangsamen.

Derzeit werden einige MEK-Inhibitoren klinisch eingesetzt oder befinden sich in der klinischen Erprobung. Bisher wurden drei Inhibitoren zugelassen: Trametinib, Cobimetinib und Binimetinib. Sie werden in Kombination mit einem BRAF-Inhibitor zur Therapie des malignen Melanoms eingesetzt verlängern so das progressionsfreie Überleben betroffener Patienten (Flaherty et al. 2012b). Der Einsatz von Dabrafenib, einem BRAF-Inhibitor, in Kombination mit Trametinib führt beim nicht operablen oder metastasierten malignen Melanom laut Long et al. 2014 zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens und zu einer verspäteten Progression der Symptome im Vergleich zur alleinigen Therapie mit dem BRAF-Inhibitor. Eine ähnlich vorteilhafte Wirksamkeit gegenüber einer Monotherapie mit einem BRAF-Inhibitor wurde für die später zugelassenen Kombinationen Encorafenib und Binimetinib (Dummer et al. 2018), sowie Vemurafenib und Cobimetinib (Ascierto et al. 2016) nachgewiesen.

Seit März 2017 ist der kombinierte Einsatz von Dabrafenib und Trametinib auch für die Therapie des NSCLC zugelassen (Gemeinsamer Bundesausschuss 2017). Dabei wird diese Kombination

bei Patienten eingesetzt, deren untersuchter Tumor ebenfalls die BRAF-Mutation V600E aufweist. Laut Planchard et al. (2017) konnte bei unbehandelten Tumoren dieser Entität mit dieser Medikamentenkombination ein medianes progressionsfreies Überleben von etwa zehn Monaten erzielt werden.

Ein weiterer Inhibitor mit großem Nutzen ist Selumetinib. Die Wirkung von Selumetinib in Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 konnte bereits nachgewiesen werden (Dombi et al. 2016). Selumetinib wurde von der Europäischen Arzneimittelagentur 2018 ein Orphan-Status erteilt und darf demzufolge für seltene Erkrankungen eingesetzt werden (European Medicines Agency 2018). In der Anwendung von Selumetinib beim Schilddrüsenkarzinom konnte die Aufnahme von Radiojod und damit dessen therapeutische Wirkung vergrößert werden (Alan et al. 2013). Dies stellte besonders in Fällen von metastasierten Schilddrüsenkarzinomen eine große Herausforderung dar. Aktuell wird der vorteilhafte Einsatz von Selumetinib in Phase-II-Studien untersucht (Brown et al. 2019).

Es wird deutlich, dass MEK-Inhibitoren in Kombinationstherapien klinisch relevante Wirkungen entfalten können. Bisher werden MEK-Inhibitoren als Monotherapeutika in Ausnahmefällen eingesetzt, da sie gegenüber Chemotherapeutika zwar eine bessere klinische Wirkung erzielen können, jedoch im Vergleich zu aktuell besser erprobten Therapeutika – beispielsweise BRAF-Inhibitoren – kein besseres Outcome für die Patienten bedeuten (Flaherty et al. 2012a). Am Beispiel des malignen Melanoms wird bei einer Monotherapie der Einsatz von Dabrafenib gegenüber Trametinib bevorzugt, da es mit dessen Nebenwirkungsprofil mehr Erfahrung gibt als bei Trametinib und für einen Zusatznutzen keine ausreichende Datenlage existiert (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen 2016). Eine Monotherapie mit dem MEK-Inhibitor ist jedoch eine Alternative für Patienten, bei denen eine Therapie mit BRAF-Inhibitoren nicht infrage kommt. Daher sind Trametinib, Cibimetinib und Binimetinib auch als Monotherapeutikum zugelassen, werden aber in dieser Form nicht in der Erstlinientherapie eingesetzt.

Langfristig wird sowohl die Rolle der MEK-Inhibitor-Monotherapie als auch die Rolle der Kombinationstherapie mit anderen Inhibitoren des MAPK-Signalwegs weiter zunehmen. Etliche klinische Studien sind dafür bereits gestartet worden.

Das Auftreten von MEK-Mutationen hat dabei zwei Bedeutungen: Einerseits bilden sie, wie eingangs erwähnt, den Grundstein für bestimmte Erkrankungen und dienen damit sowohl als Grundlage für die Erforschung dieser Erkrankungen als auch als Ansatz für maßgeschneiderte Therapien. Andererseits erschweren diese Mutationen die Wirkung bereits vorhandener Therapieprinzipien (Gao et al. 2019). Die beobachtete Resistenz der mutierten Zellen gegenüber

den Medikamenten und das Auftreten von Nebenwirkungen sind Gründe für die Einschränkung der Therapie durch Inhibitoren.

3.5 Zielsetzung der Arbeit

Während einer genomischen Untersuchung auf Mutationen bei verschiedenen Zelllinien der Arbeitsgruppe 'Molekulare Tumorphathologie' von Prof. Christine Sers (Institut für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) und Prof. Nils Blüthgen (Institut für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) wurde ein single nucleotide polymorphism (SNP) im Gen *MAPK2K1* der kolorektalen Karzinomzelllinie LIM1215 gefunden. Diese wurde ursprünglich aus einem am Lynch-Syndrom erkrankten Patienten isoliert und ist dafür bekannt, keine Mutationen in den *BRAF*- und *KRAS*-Genen zu tragen. Durch den Nukleotidaustausch von Guanin zu Adenin an der Position 1110 kommt es auf Proteinebene zu einem Aminosäureaustausch an Position 212 im MEK1-Protein, bei dem das Serin durch ein Asparagin ausgetauscht wird (S212N). Da sich diese Aminosäure inmitten des Aktivierungssegments befindet, könnte sie einen Einfluss auf die Regulierung des Enzyms haben (Gopalbhai et al. 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Besitzt die *MEK1^{S212N}*-Mutation klinische Relevanz?
 - » Da die Mutation nur in einer Zelllinie der Arbeitsgruppe gefunden wurde, soll überprüft werden, ob diese Mutation in Darmkrebspatienten auftritt. Dazu soll das Tumorgewebe von 96 Patienten untersucht werden, die nachweislich an einem Kolonkarzinom erkrankt waren. Das Material entstammt dem Archiv des Instituts für Pathologie der Charité Berlin.
- Welche Auswirkungen hat *MEK1^{S212N}* auf die biochemische Funktion des MAPK-Signalwegs?
 - » Da Serin an Position 212 in MEK1 phosphoryliert werden kann (Gopalbhai et al. 2003), soll mittels molekularbiologischer Methoden in einem geeigneten MEK1-Konstrukt eine Aminosäure substituiert werden, die diesen Zustand imitiert. Hierfür wird Serin (S212) in MEK1 durch Asparaginsäure (D) ausgetauscht (S212D). Mit Hilfe der generierten Konstrukte soll ermittelt werden, ob die *MEK1^{S212N}*-Mutation im MEK1-Enzym eine gesteigerte Phosphorylierung von Erk1 oder Erk2 nach sich zieht, um so die Bedeutung der Mutation in Hinsicht auf den MAPK-Signalweg ableiten zu können.

Dafür werden die generierten MEK1-Expressionskonstrukte mit den Mutationen S212N, S212D und geeignete Kontrollen durch lentivirale Transduktion in Hek293-Zellen eingebracht.

- Beeinflusst *MEK1*^{S212N} den Phänotyp?
 - » Dazu werden die MEK1-Expressionskonstrukte in Zellen der Linie 208F, eine Rattenfibroblastenlinie, lentiviral eingebracht, um mögliche Veränderungen der Zellmorphologie überprüfen zu können, wie sie von Schäfer et al. für die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs beschrieben wurden (Schäfer et al. 1988)

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
0,5-ml-, 1,5-ml- und 2-ml-Eppendorf-Tubes	Eppendorf/Sarstedt
15-ml-, 50-ml-Falcon-Tubes	BD Falcon
6-Well-Platten	BD Falcon/Sarstedt
12-Well-Platten	BD Falcon/Sarstedt
96-Well-Platten	BD Falcon/Sarstedt
Blotgerät	PreQLab
Brutschrank Zellkultur	Hera
Cell Culture Tubes	Cellstar
Elektrophoresekammer + Zubehör	Bio-Rad
ELISA-Reader	Bio-Rad
Eppendorfpipetten + Zubehör	Eppendorf
FACS-Zytometer	BD Accuri
Filterpapier	Whatman
Fluoreszenzmikroskop	Keyence
Fluoreszenzscanner	LI-COR
Hamilton-Pipette	Hamilton
Heizblock (Thermomixer)	Eppendorf
Inkubationsschüttler	IKA
Kamera	Canon
Kryobox	Nalgene
Kryoröhrchen	Cellstar
Kulturflaschen für Zellkultur	BD Falcon

Fortsetzung Tabelle 1:

Magnetrührer	IKAMAG
Mehrkanalpipetten	Eppendorf
Mikroskop	Leica DMIL
Mikrowelle	Samsung
Nanodrop	Implen
Nitrozellulosemembranen	Whatman
Schüttler	Stuart Scientific
Spannungsgerät	Bio-Rad
Ultraschallbad	Bioruptor
Vortex	Assistant
Wärmeschrank	Heraeus
Waage	Sartorius
Wasserbad	GFL 1092
YM-3 Millipore-Säulen	Microcon
Zählkammer	Neubauer
Zellschaber	TPP
Zentrifugen	Beckman Coulter Avanti™ J25 Beckman Coulter Optima™-TL Beckman Coulter Allegra X-15R Eppendorf 5415C Eppendorf 5417R Eppendorf 5810R

4.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Lysepuffer	Bio-Rad
Blotting-Puffer	LI-COR
Blocking-Puffer	LI-COR
10-kb-Leiter (Smartladder, für Agarosegele)	Eurogentec
Acrylamid (30 %)	Roth
Agarose	Serva
Amidoschwarz	Merck
APS	Merck
BCA-Puffer-Komponenten	Thermo Fisher Scientific
Bio-Rad-Lysereagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Serva
Chloroform	Sigma Aldrich
Complete	Roche
Desinfektionsmittel Meliseptol	Braun
DMEM	Lonza
DMSO	Sigma
DTT	Sigma
EDTA	Merck
Eisessig	Merck
Entwickler	Kodak
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma

Fortsetzung Tabelle 2:

Fixierer	Kodack
FCS	Biochrom
Glycerol (Glycerin)	Merck
Glucose	Sigma
HCl	Merck
Hepes	Sigma
Isoamylalkohol	Sigma
Isopropanol	J.T. Baker
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Ladepuffer für DNA-Gele (6 x)	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamine 2000	Invitrogen
LiCl	Sigma
Marker (für SDS-PAGE)	PageRuler, Fermentas
Methanol	J.T. Baker
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat)	Merck
NaCl (Natriumchlorid)	Merck
NaOH	Merck
Natrium-Acetat	Merck
Natriumdesoxycholat (DOC)	Sigma
Natriumjodat	Merck
Natriumziträt	Merck
Nonidet NP40 (10 %)	Calbiochem
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific
Pelletpaint	Novagen

Fortsetzung Tabelle 2:

Phenol	Fluka
Phosphataseinhibitor	Pierce
PMSF (Phenylmethansulfonsäurefluorid)	Sigma
Proteinase K	Roche
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma
Trireagent	Invitrogen
Tris Base	Merck
Triton X 100	Sigma
Trizol	Invitrogen
Trypsin/EDTA (für Zellkultur)	Biochrom AG
Tryptone	BD Biosciences
Tween 20	Serva
Ultraglutamine	Lonza
Yeast extract	BD Biosciences

4.1.3 Stammlösungen und Puffer

Tabelle 3: Stammlösungen und Puffer

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
Amidoschwarz (400 ml)	Amidoschwarz 0,4 g Methanol 90 ml Eisessig 20 ml bi-destilliertes Wasser (ddH ₂ O) 290 ml
10 % APS (10 ml)	1 g APS - gelöst in 10 ml ddH ₂ O
2,5 x Blotpuffer (1 L)	Methanol 500 ml Tris 14,5 g Glycerol 7,3 g 10 % SDS 9,37 ml - mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen
10 % SDS (100 ml)	10 g SDS - gelöst in 100 ml ddH ₂ O
1,5 M Tris-HCL (pH 8,6) (1 L)	Tris-Base 181,71 g - mit ddH ₂ O auf 800 ml auffüllen - tropfenweise 37 % HCl 38 ml hinzufügen bis pH 8,6 - mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen
0,5 M Tris-HCL (pH 6,8) (1 L)	Tris-Base 60,57 g - mit ddH ₂ O auf 800 ml auffüllen - tropfenweise 37 % HCl 40 ml hinzufügen bis pH 6,8 - mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen

Fortsetzung Tabelle 3:

<p>SDS-Lysepuffer (50 ml)</p>	<p>5 ml 10 % SDS 0,5 ml 1 M Tris pH 7,5 0,2 ml 0,5 M EDTA pH 8 - mit ddH₂O auf 50 ml auffüllen</p>
<p>S.O.C.-Medium</p>	<p>2 % Tryptone 0,5 % Yeast extract 8,6 mM NaCl 2,5 mM KCl 20 mM MgSO₄ 20 mM Glucose in ddH₂O, autoklaviert</p>
<p>LB-Medium (1 L)</p>	<p>10 g Tryptone 5 g Yeast extract 10 g NaCl - pH 7,5 mit NaOH einstellen mit dH₂O auf 1 L auffüllen, autoklavieren</p>
<p>LB-Agar (L)</p>	<p>800 ml dH₂O 10 g Tryptone 5 g Yeast extract 10 g NaCl - pH 7,5 mit NaOH einstellen - 15 g Agar, erwärmen mit dH₂O auf 1 L auffüllen, autoklavieren</p>
<p>D10-Medium (D10) (500 ml)</p>	<p>440 ml DMEM 50 ml FCS 5 ml Penicillin-Streptomycin (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) 2 mM Ultraglutamine</p>

Fortsetzung Tabelle 3:

D10+G-Medium	D10 Glucose Endkonzentration $c = 4,5 \text{ g/L}$
50 x TAE-Puffer (1 L)	242 g Tris-Base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 mit dH ₂ O auf 1 L auffüllen, autoklavieren
4 x Gelladungspuffer für SDS-Page	200 mM Tris-Cl (pH 6.8) 400 mM DTT 8 % SDS 0,4 % Bromophenol Blau 40 % Glycerol
1 x PBST (0,1 %) (1 L)	800 ml dH ₂ O 8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ 0,24 g KH ₂ PO ₄ 2 ml Tween-20 - mit HCl pH 7,2 einstellen mit dH ₂ O auf 1 L auffüllen, autoklavieren
10 x PBS (1 L)	800 ml dH ₂ O 80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ - mit HCl pH 7,4 einstellen mit dH ₂ O auf 1 L auffüllen, autoklavieren

Tabelle 4: Zusammensetzung der Gele für SDS-Page

Reagenz	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %	4 %
	Trenngel					Sammelgel
H ₂ O	5,3 ml	4,6 ml	4,0 ml	3,3 ml	2,3 ml	6,1 ml
30 % Acrylamid	2,0 ml	2,7 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml	1,33 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml					-
0,5 M Tris (pH 6,8)	-					2,5 ml
10 % SDS	100 µl					100 µl
10 % APS	100 µl					50 µl
TEMED	8 µl	6 µl	4 µl	4 µl	4 µl	10 µl

Tabelle 5: Zusammensetzung der Agarose-Gele

Reagenz	0,7 %	0,8 %	1 %
1 x TAE	60 ml		
Agarosepulver	0,42 g	0,48 g	0,6 g
Ethidiumbromid	3 µl		

4.1.4 Antibiotika

Tabelle 6: Eingesetzte Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Penicillin/Streptomycin	Calbiochem
Kanamycin-Sulfat	Roche
Ampicillin	Roche

4.1.5 Molekularbiologische Kits

Bei der Verwendung von molekularbiologischen Kits wurden die jeweils vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Lösungen und Puffer eingesetzt.

Tabelle 7: Angewandte Kits

Name	Hersteller	Verwendung
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen	Isolation und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Quiagen	Isolation und Aufreinigung von DNA aus Bakterienkulturen, für bis zu 20 µg DNA
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Quiagen	Isolation und Aufreinigung von DNA aus Bakterienkulturen, für bis zu 500 µg DNA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen	Isolation und Aufreinigung von DNA aus Bakterienkulturen, für bis zu 30 µg DNA
QIAamp DNA Mini Kit	Quiagen	Isolation und Aufreinigung von genomischer DNA aus LIM1215
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies	DNA-Modifikation, Einbau einer Punktmutation
Fast-Link DNA Ligation Kit	Biozym/Epicentre	Ligation
CalPhos™ Mammalian Transfection Kit	Clontech	Transfektionsreaktionen und lentivirale Transduktion
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Bestimmung der Proteinkonzentration

4.1.6 Enzyme

Tabelle 8: Eingesetzte Enzyme

Name	Typ	Hersteller
BamHI	Restriktionsenzym	New England Biolabs
SwaI	Restriktionsenzym	New England Biolabs
NheI	Restriktionsenzym	New England Biolabs
NcoI	Restriktionsenzym	New England Biolabs
EcoRI	Restriktionsenzym	New England Biolabs
PstI	Restriktionsenzym	New England Biolabs
XbaI	Restriktionsenzym	New England Biolabs
DpnI	Restriktionsenzym	Agilent Technologies
Klenow	DNA-Polymerase	New England Biolabs
Pfu-Turbo	DNA-Polymerase	Agilent Technologies
CIP	Alkalische Phosphatase	New England Biolabs

4.1.7 Antikörper

Tabelle 9: Eingesetzte Antikörper

Name	Detektiertes Protein	Hersteller	Verdünnung	Spezies
MEK1 (9124)	MEK1	New England Biolabs	1 : 500	Rabbit
p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) (9101)	p-Erk1 und p-Erk2	New England Biolabs	1 : 500	Rabbit
GAPDH	GAPDH	Ambion	1 : 10.000	Mouse
Anti-Mouse IgG	Mouseantigen	Abcam	1 : 10.000	Goat
Anti-Rabbit IgG	Rabbitantigen	Abcam	1 : 10.000	Goat

4.1.8 Primer

Tabelle 10: Eingesetzte Primer

Bezeichnung	Verwendung	Besonderheiten	Sequenz 5'-3'
MEK1_D_L	Insertmodifikation von <i>MEK1</i> ^{S212N} zu <i>MEK1</i> ^{S212D}	Forward Primer	CTCTGTGACTTTGGGG TCGACGGGCAGCTCA TCGACTCCATGGCC
MEK1_D_R	Insertmodifikation von <i>MEK1</i> ^{S212N} zu <i>MEK1</i> ^{S212D}	Reverse Primer	GGCCATGGAGTCGAT GAGCTGCCCGTCGAC CCCAAAGTCACAGAG
MEK1_6R	Sequenzierung von MEK1	Reverse Primer, (deckt Beginn von MEK1 ab)	ATGACCAGGCCAGAA GGCTT
MEK1_3L	Sequenzierung von MEK1	Forward Primer (deckt Ende von MEK1 ab)	AATAAAAACCCCGC AGAGA
MEK1_1L	Sequenzierung von MEK1	Forward Primer (deckt mittleren Bereich von MEK1 ab)	GTTCTGCATGAGTGC AACTCTC
MEK1_1R	Sequenzierung von MEK1	Reverse Primer (deckt mittleren Bereich von MEK1 ab)	ACAGAGTAATGAGTC CCCTGGA

Fortsetzung Tabelle 10:

MEKmutfor_01	Sequenzierung von MEK1	Forward Primer (deckt mittleren Bereich von MEK1 ab)	GCTGTAATAAAAGG CCTGACA
MEKmutrev_01	Sequenzierung von MEK1	Reverse Primer (deckt mittleren Bereich von MEK1 ab)	ATCAGCTCCAGCTCC TTGGCATCTGG
Christine-Primer	Sequenzierung von MEK1	Forward Primer (deckt mittleren Bereich von MEK1 ab)	ATGTCAAGCCCTCC AACATC

4.1.9 Plasmide

Trägerplasmid für die MEK1-Konstrukte

Name: pMEV-MEK1

Hersteller: Biomyx Technology, Kalifornien

Alle im Folgenden aufgelisteten MEK1-Konstrukte wurden innerhalb eines Trägerplasmids genutzt. Bei dem ursprünglichen Trägerplasmid handelt es sich um das pMEV-2HA-Plasmid, das sich ideal für die Untersuchung der Genexpression in Säugetierzellen eignet. Die MEK1-Konstrukte wurden dabei innerhalb der multiple cloning site (MCS) in das Plasmid integriert (siehe Abbildung 4).

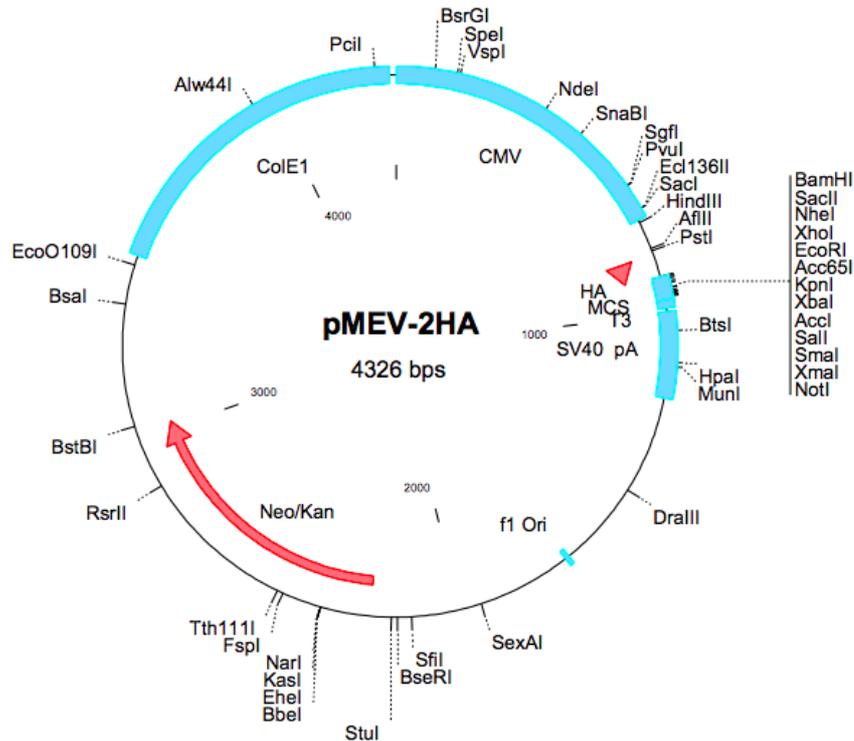


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Plasmids pMEV-2HA

Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen MEK1-Varianten näher beschrieben.

- **pMEV-MEK1-WT:** Hierbei handelt es sich um das Trägerplasmid für die Wildtypform des MEK1.
- **pMEV-MEK1-DN:** Dieses Plasmid trägt die Sequenz für ein MEK1-Konstrukt, das durchgehend inaktiv ist. Dabei sind die drei Mutationen K97R, S218A und S222E dafür verantwortlich, dass MEK1 nicht aktiv werden kann. Dementsprechend endet an dieser Stelle die Aktivierungskaskade und ERK wird nicht von MEK1 phosphoryliert.
- **pMEV-MEK1-CA:** Bei diesem für MEK1 sequenzierenden Plasmid sind eine Deletion der Aminosäuren 32 bis 51 und die Mutationen S218E und S222E vorhanden, sodass MEK1 nicht mehr inhibitorisch reguliert werden kann. Somit ist MEK1 dauerhaft (konstitutiv) aktiv und sorgt für eine mehr als 300-fach gesteigerte Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 (Fischmann et al. 2009).
- **pMEV-MEK1-212N:** Hierbei handelt es sich um das Trägerplasmid mit dem zu untersuchenden Konstrukt von MEK1 mit der Mutation S212N, das von Raphaela Fritsche aus dem oben gelisteten MEK1-Wildtyp-Konstrukt generiert wurde.

Expressionsplasmid

Name: pCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP

Hersteller: SBI – System Biosciences, Kalifornien

Hierbei handelt es sich um das Plasmid pCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP, ein lentivirales Expressionsplasmid.

Die einzelnen, für diese Arbeit bedeutendsten Abschnitte des Plasmids werden im Folgenden erklärt:

EF1: Elongation factor 1 (EF1) ist ein Promotor für das einzubauende Zielgen, bei dem es sich um die MEK1-Konstrukte handelt.

MCS: Die multiple cloning site (MCS), flexible Klonierungsstelle, ist ein Oligonukleotid mit 34 Basen, das geeignete Restriktionsschnittstellen für den Einbau der MEK1-Konstrukte bietet.

IRES: Die internal ribosome entry site (IRES) ist ein Abschnitt der mRNA, durch den diese ohne erneute Initiation mithilfe einer 5'-cap-Struktur an das Ribosom gebunden werden kann. Somit kann die Translation des dahintergelegenen Genabschnittes starten, ohne dass eine erneute klassische Bindung durch Initiationsfaktoren erfolgen muss (Sachs et al. 1997). Im Rahmen der Arbeit wird dies für die Koexpression des Reportergens *gfp* genutzt.

copGFP: Dies ist der Abschnitt für das Reportergen, das für GFP (green fluorescent protein) kodiert. GFP ist ein Protein aus dem Ruderfußkrebs *Pontellina plumata*, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Dies wird im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um die Zielzellen im Fluoreszenzmikroskop detektieren zu können.

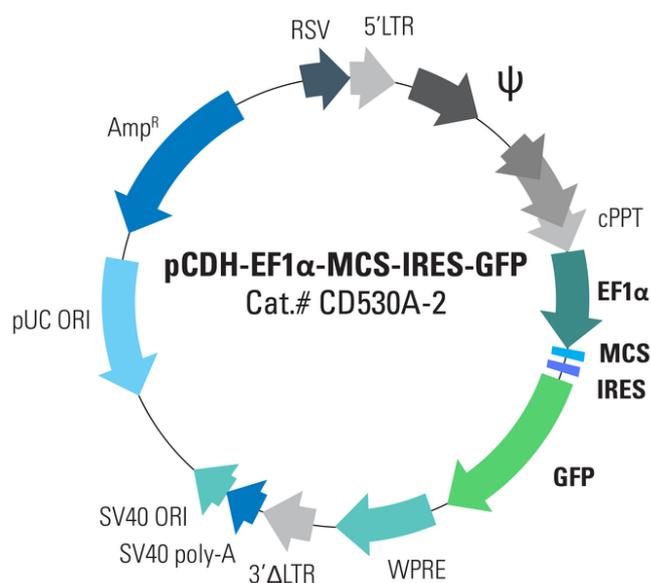


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Plasmids pCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP

Verpackungsplasmide zur Erstellung der viralen Partikel

Zur Erstellung viraler Partikel war der Einsatz zweier Helferplasmide zusätzlich zum eigentlichen Expressionsplasmid notwendig.

psPAX2: Hierbei handelt es sich um ein Verpackungsplasmid 2. Generation. Hauptaufgabe dieses Plasmids ist die Kodierung für die viralen Strukturproteine Gag und Env und für Enzyme mit Polymeraseaktivität (Pol) (Abbildung 6).

Hersteller: Addgene, Cambridge (Addgene plasmid # 12260)

pMD2.G: Hierbei handelt es sich um ein Hüllplasmid. pMD2.G kodiert für das Glykoprotein G des vesikulären Stomatitisvirus, das für die Bindung des Virus an die Rezeptoren der Zielzellen und der anschließenden Fusion beider Membranen verantwortlich ist (Abbildung 7).

Hersteller: Addgene, Cambridge (Addgene plasmid # 12259)

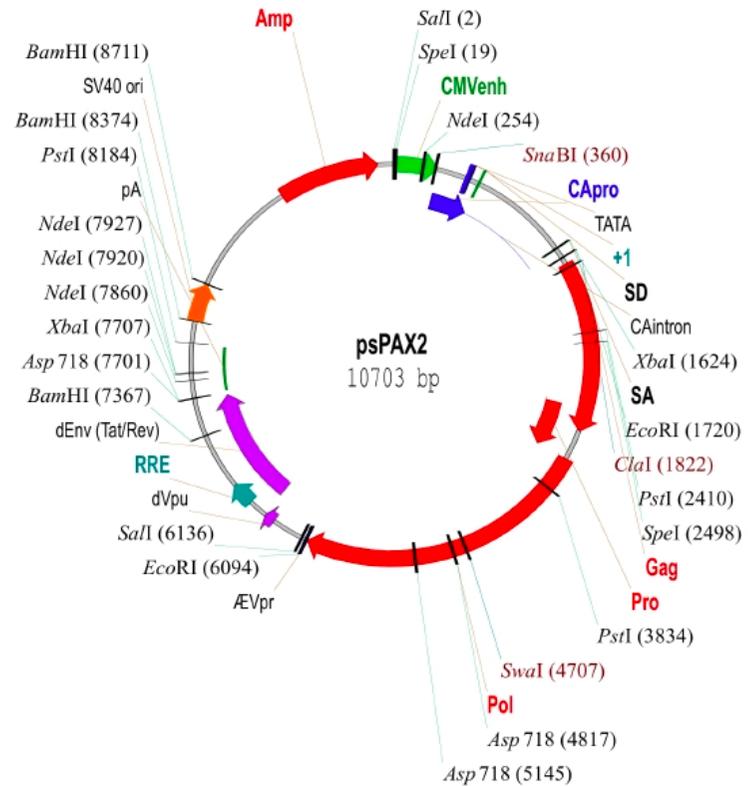


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Plasmids psPAX2

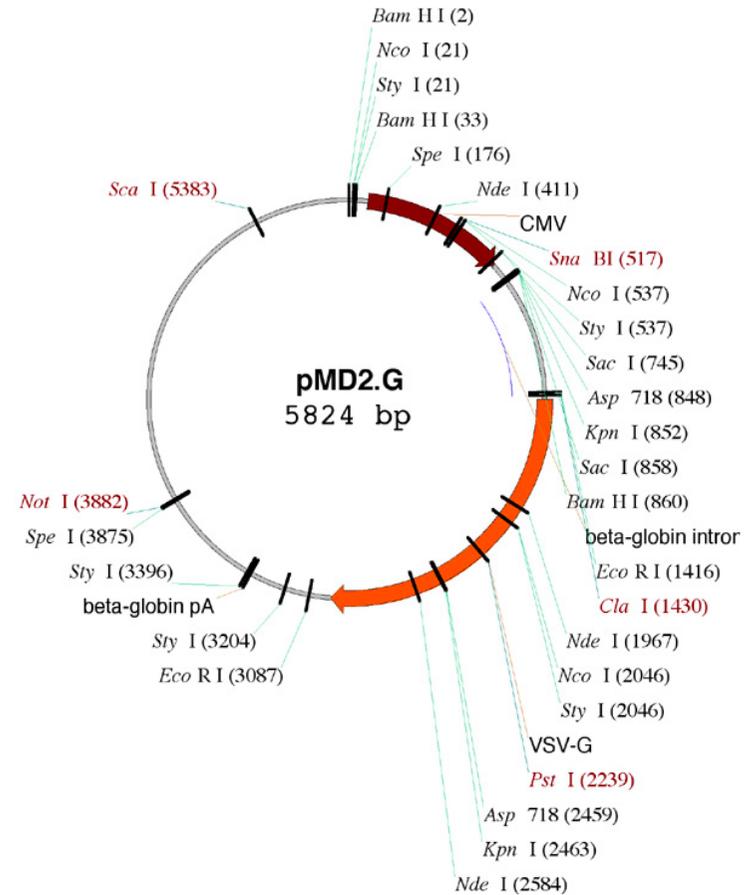


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Plasmids pMD2.G

4.1.10 Zelllinien

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung in D10-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂.

LIM1215 ist eine humane Kolonkarzinomzelllinie, die ursprünglich von einem HNPCC-Patienten stammt (Whitehead et al. 1985). Diese Zelllinie ist wildtypisch für BRAF- und KRAS-Mutationen (sequenziert/analysiert von Christine Sers (Charité Berlin, Institut für Pathologie, Molekulare Tumorpathologie) und freundlicherweise bereitgestellt durch Professor John Mariadason (Ludwig Institute for Cancer Research, Austin Hospital, Melbourne, Australia)).

Hek293 (bereitgestellt durch die American Type Culture Collection) ist eine humane embryonale Nierenzelllinie (Graham et al. 1977). Sie wurde im Jahr 1977 durch Transformation mit DNA-Fragmenten vom Adenovirus Typ 5 generiert. Damit ist sie besser der dauerhaften Kultur in Laboren zugänglich und lässt sich zudem leicht transfizieren.

Ihre verwandte Zelllinie Hek293T ist besonders für Einsätze in der Virologie geeignet. Diese Variante exprimiert das ‚SV40-T-Antigen‘ (Lebkowski et al. 1985) und erlaubt die episomale Replikation von transfizierten Plasmiden, die den SV40-origin-of-replication besitzen. Mit dieser Zelllinie lassen sich hohe Expressionslevel des gewünschten Transgens erreichen. Hek293T-Zellen eignen sich damit gut zur Herstellung von Viren, darunter auch Lentiviren. Ihre Kultivierung erfolgte in glukosehaltigem Medium D10 + G.

208F (bereitgestellt durch Professor Reinhold Schäfer) ist eine Fibroblastenzelllinie, die aus Ratten stammt (Topp 1981). Sie ist einfach zu kultivieren, lässt sich aber schwer transfizieren. Bei induzierten Veränderungen, die zu einer Transformation führen sollen, sind bei dieser Zelllinie früh sichtbare Morphologieveränderungen zu erwarten (Schäfer et al. 1988).

4.1.11 Bakterienstämme

Tabelle 11: Eingesetzte Bakterienstämme

Bakterienstamm	Verwendung
Stbl3 chemically competent <i>E. coli</i>	Zur Transformation der MEK1-Expressionsplasmide
XL1-Blue supercompetent <i>E. coli</i>	Zur Transformation des Ligationsproduktes nach dem Mutagenesis-Experiment

4.1.12 Software

Tabelle 12: Angewandte Software

Software	Verwendung	Hersteller
Vector NTI®	Primerdesign	Thermo Fisher Scientific
Keyence Application Software	Fluoreszenzmikroskopie und Fotodokumentation	Keyence
Odyssey Application Software 3.0	Westernblot-Scan	LI-COR
Image Studio Lite 4.0	Westernblot-Analyse	LI-COR
BD Accuri C6 Software	FACS	BD

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Auftauen

Beim Auftauen der Zellen musste möglichst schnell gearbeitet werden, um den zelltoxischen Effekten des DMSO entgegenzuwirken. Nach dem Entnehmen der Kryoröhrchen aus flüssigem Stickstoff wurden diese bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Sobald sich die Zellen lösten, konnten sie in ein 15-ml-Röhrchen überführt werden. Anschließend wurden 5 ml Medium zugegeben und die Zellen 2 min bei 200 g zentrifugiert, um den DMSO-haltigen Überstand herauszufiltern. Dieser wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml frischen Medium resuspendiert. Die Suspension wurde in eine mit 9 ml Medium befüllte 75-cm²-Flasche überführt und sanft verteilt.

Über Nacht wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um das restliche DMSO zu entfernen.

Kultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Zum Passagieren der Zellen wurden diese mit 1 x PBS gespült und mit 3 ml (für T75 = 75-cm²-Flaschen) bzw. 5 ml (für T175 = 175-cm²-Flaschen) Trypsin abgelöst und 1 : 10 verdünnt. Das Ablösen der Zellen in 6-Well-Platten erfolgte mit 500 µl Trypsin pro Well.

Nach vollständiger Zellablösung wurde mittels des für den Zelltyp erforderlichen Mediums die Wirkung des Trypsins gestoppt. Dabei betrug die Menge des Mediums mindestens das doppelte Volumen der eingesetzten Trypsinmenge. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 200 g zentrifugiert, das überschüssige Medium wurde abgesaugt und in 10 ml (bei 75-cm²-Flaschen) bzw. 15 ml (bei 175-cm²-Flaschen) neuen Mediums aufgenommen bzw. weiterbehandelt. Es wurde darauf geachtet, das Zellpellet durch sanftes Auf- und Abpipettieren vorsichtig zu resuspendieren.

Zellzählung

Für weitergehende Experimente war stets eine bestimmte Dichte der Zellen notwendig. Zur Zellzählung wurden Zählkammern vom Typ Neubauer verwendet. Dafür wurde nach dem Zentrifugieren (2 min bei 200 g) das Zellpellet zunächst in 10 ml Medium resuspendiert und anschließend 1 : 10 verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 20 µl für die Zählkammer verwendet. Es war darauf zu achten, dass die Zellsuspension direkt nach dem Resuspendieren

pipettiert wurde, um eine gleichmäßige Verteilung in der Zählkammer zu gewährleisten. Die Zellzahl wurde anschließend folgendermaßen berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

Einfrieren

Um Zellen über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, wurden, wie unter Punkt, Kultivierung‘ beschrieben, die Zellen zunächst abgelöst und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml Medium/DMSO (900 µl Medium + 100 µl DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. DMSO wird benötigt, um Gefrierschäden vorzubeugen. Aus einer 90–100 % konfluenten 75-cm²-Flasche konnten zwei Kryoröhrchen gewonnen werden.

Die stufenweise Abkühlung der Zellen erfolgte in Kryoboxen, gefüllt mit Isopropanol bei -80 °C. Diese Lösung kühlt das Röhrchen pro Stunde um 1 °C ab, wodurch die Zellen schonend eingefroren werden konnten. Anschließend wurden sie im flüssigen Stickstoff (bei -196 °C) gelagert.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Transformation kompetenter *E.-coli*-Stämme

Bei einer Transformation handelt es sich in erster Linie um die Fähigkeit von Bakterien, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen. In der Molekularbiologie wird dieser Begriff benutzt, um das Einbringen von DNA in dafür geeignete, superkompetente Bakterien zu beschreiben. Die Transformation stellt ein Standardverfahren dar, um gewünschte DNA in ausreichender Menge von den Bakterien vervielfältigen zu lassen. Zur Selektion der plasmidhaltigen Bakterien wurde mit verschiedenen, zu dem gewünschten Plasmid passenden Antibiotika gearbeitet. Die Transformation selbst erfolgte mittels Hitzeschock (Hanahan 1983).

Die im Folgenden aufgeführten Angaben gelten, wenn nicht anders erwähnt, für beide verwendeten Bakterienstämme. Eingeklammerte Werte beziehen sich nur auf den Umgang mit den Stbl3-Zellen. Die Bakterien wurden vorsichtig aus -80 °C aufgetaut. Anschließend wurde zu je 25 µl (30 µl) Bakteriensuspension 1 µl (1,5 µl) der zu transformierenden DNA gegeben und behutsam vermischt. Auf die anschließende Inkubation von 30 min auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s (30 s).

Danach wurden die Zellen für 2 min auf Eis gelagert, anschließend mit 500 µl (150 µl) vorgewärmtem S.O.C.-Medium versetzt und bei einer Temperatur von 37 °C (30 °C) für 1 h (1,5 h) auf dem Schüttler bei 180 rpm (190 rpm) inkubiert.

4.2.2.2 Kultivierung der kompetenten *E.-coli*-Stämme

Agarplatten

Nach der Transformation wurden je 250 µl (70 µl) der Bakteriensuspension mit sterilen Drygalski-Spateln auf LB(Luria Bertani)-Agarplatten übertragen, die mit dem jeweils benötigten Antibiotikum versetzt waren. Für alle Stb13-Zellen wurde zur Selektion der plasmidhaltigen Kolonien Ampicillin (c = 50µg/ml) benutzt. Anschließend wurden die Platten mit dem Boden nach oben bei 37 °C (30 °C) für 17 h inkubiert.

Flüssigkultur

Zum Animpfen größerer LB-Medienmengen wurden Kolonien mittels steriler, gestopfter Pipettenspitzen aufgenommen und in das Medium übertragen. Dabei wurde mit 200 ml autoklaviertem 1 x LB-Medium gearbeitet, das mit dem jeweils benötigten Antibiotikum versetzt war. Das Wachstum erfolgte für 17 h über Nacht bei 37 °C (30 °C) auf dem Schüttelinkubator bei 180 rpm (190 rpm).

4.2.2.3 Insertmodifikation mittels site-directed mutagenesis

Um aus dem Ausgangsplasmid für MEK1-S212N das Trägerplasmid für MEK1-S212D zu generieren, musste die Basenfolge für Asparagin (Basenfolge: AAC) an Position 212 in das Triplet GAC umgeschrieben werden. Dafür wurde mit der Methode der site-directed mutagenesis, einer gesteuerten Mutagenese, gearbeitet. Sie stellt eine Methode zum Einbau von Punktmutationen und anderer Veränderungen der Sequenz für Aminosäureabfolgen in Plasmide dar.

Für die Insertmodifikation wurde mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Agilent Technologies gearbeitet. Die im Folgenden beschriebenen durchgeführten Schritte orientierten sich an dessen Herstellerprotokoll.

Das Prinzip der gerichteten Mutagenese ist folgendes: Mithilfe selbst generierter Primer, die die gewünschte Mutation enthalten, wird das neue Plasmid in einer Amplifikationsreaktion mittels PCR hergestellt. Wird dieses neue, noch geöffnete Plasmid anschließend in Bakterien überführt, schließen diese die Lücke im Strang, die durch die Arbeit der DNA-Polymerase vor dem jeweiligen Primer entstanden ist, und vervielfältigen das Produkt.

Die Reaktion erfolgte im Thermo-Cycler. Dabei wurden die Reaktionsansätze erhitzt, um eine Trennung beider Plasmidstränge zu erreichen. Die Temperatur wurde nach einem bestimmten Rhythmus gesenkt (siehe Tabelle 14), sodass die Primer sich mit den freien Plasmidsträngen verbinden konnten. Detektierte die PfuTurbo DNA-Polymerase komplemente Primer-Plasmid-Paarungen, verband sie hinter dem Primer die im dNTP-Mix enthaltenen Basen (dATP, dTTP, dCTP und dGTP) zu einem neuen DNA-Strang, der entsprechend der komplementären Basenpaarung eine genaue Kopie des parentalen Stranges darstellte und sich nur im Bereich der Mutation davon unterschied.

Für die Amplifikation wurden zwei Reaktionsansätze vorbereitet. Der Ansatz für die Kontrolle erfolgte genau nach den Angaben des mitgelieferten Protokolls. Der Ansatz für die Probe ist im Folgenden aufgeführt.

Reaktionsansatz für *MEK1^{S212D}*:

- 5 µl 10 x reaction buffer
- 0,842 µl (125 ng) oligonucleotide forward-Primer für *MEK1^{S212D}*
- 0,842 µl (125 ng) oligonucleotide reverse-Primer für *MEK1^{S212D}*
- 1 µl dNTP-Mix
- X₁ µl des dsDNA-Templates (5 bis 50 ng)
- X₂ µl ddH₂O
- 1 µl PfuTurbo DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

Die eingesetzten dsDNA(x₁)- und ddH₂O(x₂)-Volumina können der folgenden Tabelle entnommen werden. Das Totalvolumen des Reaktionsansatzes betrug stets 51 µl.

Tabelle 13: dsDNA- und ddH₂O-Volumina für die site-directed mutagenesis

DNA-Menge [ng]	x ₁ = dsDNA-Lösung [µl]	X ₂ = ddH ₂ O [µl]
5	0,509	41,807
10	1,018	41,298
20	2,036	40,280
30	3,054	39,262
40	4,072	38,244
50	5,090	37,226

Die Cycling-Parameter sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Cycling-Parameter für die PCR

Schritt	Ansatz	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	Kontrolle	1	95 °C	30 s
	Probe			
2	Kontrolle	18	95 °C	30 s
			55 °C	1 min
			68 °C	5 min
	Probe	16	95 °C	30 s
			55 °C	1 min
			68 °C	2 min

Die Zyklenanzahl in Schritt 2 in Tabelle 14 orientiert sich jeweils an der Art der Mutation und wird vom Hersteller mit 16 vorgegeben. Die Zyklenanzahl des Kontrollreagenz' wird mit 18 vorgegeben. Die Dauer der 68-°C-Phase soll nach Angabe von *Agilent Technologies* 1 min je 1000 Basen des Plasmids betragen.

Nach der PCR im Thermo-Cycler wurden die Ansätze für 2 min auf Eis gelegt und anschließend bei -20 °C gelagert.

Am nächsten Tag erfolgte ein Restriktionsverdau des Amplifikationsproduktes mit 1 µl der Endonuklease Dpn I. Dafür musste das Amplifikationsreagenz 1 h bei 37 °C inkubieren. Ziel dieses Schrittes war, die parentale DNA zu verdauen, die zu Beginn der Amplifikation eingesetzt wurde. Da die parentale DNA im Gegensatz zur amplifizierten DNA methyliert war, verdaute die auf methylierte und teilmethylierte DNA spezialisierte Dpn I ausschließlich die parentale DNA. So blieb anschließend das reine Amplifikationsprodukt funktionsfähig und konnte für die Transformation in XL1-Blue superkompetente Bakterien eingesetzt werden (siehe dazu 4.1.11). Die zur Kultivierung genutzten Medien waren zur Selektion der konstrukthaltigen Kolonien mit Kanamycin (c = 50 µg/ml) versetzt. Die Kultivierung des Kontrollansatzes erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Das Primerdesign der hier eingesetzten Primer erfolgte von Raphaela Fritsche (Max-Delbrück-Centrum Berlin) unter Anwendung des Programms Vector NTI® und nach den von Agilent

Technologies angegebenen Kriterien. Die Primer mit der Mutation wurden so entworfen, dass die Mutation jeweils von 10–15 bp flankiert wurde (siehe 4.1.8).

4.2.2.4 Enzymatische Modifikation von DNA

Restriktionsverdau von DNA

Bei einem Restriktionsverdau von DNA kommen sogenannte Restriktionsendonukleasen zum Einsatz, die spezifische Abschnitte der DNA erkennen, daran binden und durch ihre proteolytische Aktivität mittels Hydrolyse spalten können (Danna und Nathans 1971; Smith und Wilcox 1970). Diese Methode wird gern bei der Klonierung, Ligation und Analyse von DNA benutzt, da hierdurch gezielt Bereiche ausgeschnitten, ersetzt und neu verbunden werden können. Bei einem Restriktionsverdau können Restriktionsenzyme zum Einsatz kommen, die sich zum Teil wesentlich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Sie können beispielsweise eine oder mehrere Schnittstellen besitzen oder überhängende Enden (engl.: sticky ends) oder stumpfe Enden (engl.: blunt ends) erzeugen, wobei erstere bei einer Ligation wünschenswert sind, da die Verbindung der DNA-Fragmente leichter erreicht wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beim Einsatz von Restriktionsenzymen mit einem leichten Enzymüberschuss gearbeitet. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass der Anteil der Enzymlösung 10 % des gesamten Ansatzvolumens nicht überschreitet, da das in der Enzymlösung vorhandene Glycerin inhibitorisch auf die Enzymaktivität wirkt.

- Analytischer Restriktionsverdau: Hierfür wurden Restriktionsansätze in 20 µl Endvolumen mit ca. 200–500 ng Plasmid-DNA und jeweils 1 U der jeweiligen Restriktionsenzyme hergestellt. Puffer und PSA wurden stets nach Angaben des Enzymherstellers eingesetzt. Die Inkubation erfolgte je für 1h bei 37 °C (ebenfalls nach Angabe des Enzymherstellers). Nach dem Verdau wurden die Restriktionsansätze im Agarosegel (1 %) aufgetrennt und analysiert.
- Präparativer Restriktionsverdau: Für die Klonierung von DNA wurden Restriktionsansätze in 20 µl Endvolumen mit 5 µg Plasmid-DNA und 5 U des jeweiligen Enzyms durchgeführt. Der Einsatz von Puffern und PSA erfolgte stets nach Angaben des Enzymherstellers. Die Ansätze wurden einer 90-minütigen Inkubation bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur unterzogen und die Reaktion wurde anschließend bei 65 °C für 20 min durch Inaktivierung der Enzyme gestoppt.

Alle Ansätze wurden mit sterilem Wasser auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt.

Blunting – Herstellung von stumpfen Enden

Bei der Erstellung der Expressionsplasmide für die MEK1-Konstrukte war es nicht für alle Plasmide möglich, geeignete Endonukleasen zu verwenden, die komplementäre überhängende Enden generieren. Daher war es notwendig, diese Enden in stumpfe Enden umzuwandeln. Dies wurde durch den Einsatz des großen (Klenow-)Fragments der DNA-Polymerase I erreicht. Bei diesem Enzym handelt es sich um ein proteolytisch entstandenes Proteinfragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, das seine Aktivität als Exonuklease in 5'-3'-Richtung verloren, die Aktivität als Polymerase in 5'-3'-Richtung und Exonuklease in 3'-5'-Richtung jedoch behalten hat (Jacobsen et al. 1974). Somit werden 5'-Überhänge aufgefüllt und 3'-Überhänge entfernt und ein stumpfes Ende entsteht.

Für das Blunting wurden zum jeweiligen Ansatz des vorherigen Restriktionsverdau 5 U Klenowenzym und 2 µl dNTP-Mix (33 µM für jede Base) hinzugefügt und der neue Reaktionsansatz für 15 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde zum Stoppen der Reaktion EDTA (Endkonzentration: 10 mM) hinzugegeben und das Reagenz für 20 min bei 75 °C erhitzt.

Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Ringbildung der Plasmide und damit eine Religation zu verhindern, wurde das linearisierte pCDH-EF1-MCS-IRES-GFP-Plasmid mittels CIP (calf intestine alkaline phosphatase) dephosphoryliert. Bei diesem Schritt wurden 5'-P-Enden eliminiert und die DNA-Enden konnten nicht miteinander reagieren. Dazu wurden je Mikrogramm Plasmid-DNA 2 U CIP eingesetzt. Der Ansatz enthielt außerdem die vom Hersteller empfohlenen Mengen an Puffer. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 1h.

Ligation von DNA-Fragmenten

Vor der Ligation wurde die Plasmid-DNA in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und mithilfe des QIAquick gel extraction Kits aufgereinigt. Dabei wurde nach Protokoll des Herstellers gearbeitet.

Bei der Ligation wurde mit den Puffern und Enzymen aus dem Fast-Link Ligation Kit gearbeitet. Hierfür wurden 100 ng Plasmid und die 3-fache Menge an MEK1-Insert eingesetzt. Die Menge ergab sich nicht aus dem eingesetzten Gewicht der vorbereiteten MEK1-Konstrukte, sondern wurde so gewählt, dass auf ein linearisiertes Zielplasmid drei MEK1-Inserts kamen. So sollte eine erfolgreiche Ligation gewährleistet werden. Zur Kontrolle der Ligationseffizienz wurden außerdem je Insert eine Insert-Ligationskontrolle, bei der die Plasmid-DNA fehlte, und eine Plasmid-Ligationskontrolle, bei der die Insert-DNA fehlte, angesetzt. Zu allen Ansätzen wurden entsprechende Mengen sterilen Wassers, 1,5 µl Puffer, 0,75 µl ATP und 1 µl Ligase gegeben,

sodass die Reaktionsansätze ein Endvolumen von 15 µl erreichten. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur. Zur Inaktivierung der Ligase wurden alle Ansätze für 15 min bei 75 °C erhitzt. Danach erfolgte die Transformation von Stbl3-Bakterien mit 1,5 µl Ligat und die übrigen Mengen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

4.2.2.5 Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die weitere Arbeit mit den Plasmiden war es notwendig, saubere, von Nukleotidresten und anderen Fremdkörpern befreite DNA zu isolieren und zu konzentrieren. Dies erfolgte mithilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Die Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979; Le Gouill et al. 1994) und der anschließenden Bindung der Plasmid-DNA an das QIAGEN-Anionenaustausch-Granulat, das in den QIAGEN-tips (Säulen) enthalten ist. Anschließend wurde das Lysat gewaschen und von RNA, Proteinen und anderen niedermolekularen Verunreinigungen befreit. Die aufgereinigte DNA wurde dann vom Granulat gelöst, konzentriert und mittels Isopropanol entsalzt und ausgefällt. (Alle Schritte, die mithilfe der QIAGEN-tips ausgeführt wurden, erfolgten ausschließlich unter Nutzung der Schwerkraft.) Die gereinigte DNA konnte anschließend in Elution-Buffer gelöst und bei -20 °C aufbewahrt werden.

4.2.2.6 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde für die Analyse des Restriktionsverdaus, zur Kontrolle von PCR-Reaktionen und für die Präparation von DNA eingesetzt. Dabei wandern DNA-Fragmente entlang eines elektrischen Feldes durch das Agarosegel, trennen sich je nach Größe und Form voneinander und können dann für das entsprechende Protokoll extrahiert und weiterverwendet werden. Wenn nicht anders angegeben, wurden 0,7–1%ige Agarosegele verwendet. Die Agarosemenge richtete sich dabei nach der Größe der gesuchten DNA-Fragmente.

Für die Herstellung wurde 1 x TAE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarosepulver (siehe Methodenteil Tabelle 5) in der Mikrowelle erwärmt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurde die Lösung sanft auf 60 °C abgekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt und in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach Erstarren wurden bei analytischen Gelen 2–200 ng DNA, bei präparativen Gelen 5 µg DNA eingesetzt. Alle Proben wurden mit 6 x Loading Dye DNA-Puffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Als DNA-Größenstandard wurden 5 µl SmartLadder-Marker verwendet. Anschließend wurden alle Proben bei einer Spannung von 50–70 V für 30–60 min unter Verwendung von 1 x TAE als Laufpuffer aufgetrennt. Die Präparation

des Gels erfolgte an einem UV-Leuchttisch und die Dokumentation mithilfe eines Geldokumentationssystems.

4.2.2.7 Sequenzierung von DNA nach Sanger

Alle in dieser Arbeit sequenzierten Proben wurden im Labor von Herrn Dr. Martin Meixner (HU Berlin) nach Sanger sequenziert. Die dabei verwendeten Primer sind in Tabelle 10 aufgeführt.

4.2.2.8 Sequenzierung von Patientenmaterial aus Karzinompatienten

Alle 96 Proben wurden von MitarbeiterInnen der AG Molekulare Tumorpathologie (Institut für Pathologie der Charité Berlin) zur Sanger-Sequenzierung mit den Primern MEK1_1L (Primer für die Vorwärtssequenzierung der DNA) und MEK1_1R (Primer für die Sequenzierung des rückwärtigen DNA-Stranges) vorbereitet.

Zur Validierung des Ergebnisses wurden vom Paraffinblock des Indexpatienten erneut Gewebeschnitte angefertigt, um daraus Material für eine weitere Sanger-Sequenzierung zu gewinnen. Nachdem die DNA aus den markierten Bereichen isoliert werden konnte, wurde eine Sanger-Sequenzierung mit den Primern MEKmutfor_01 (Vorwärtssequenzierung der DNA) und MEKmutrev_01 (Sequenzierung des rückwärtigen DNA-Stranges) durchgeführt.

4.2.3 Virologische Methoden

4.2.3.1 Lentivector Packaging

Für die Herstellung der lentiviralen Partikel wurden Hek293T-Zellen verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass in der Kultivierung keine höheren Passagezahlen als 15 erreicht wurden. Zur Vorbereitung wurde eine 80 % konfluente T175-Kulturflasche trypsiniert, zentrifugiert, in Medium resuspendiert und gleichmäßig auf sieben T75-Kulturflaschen (je Konstrukt und Kontrolle eine Flasche) mit je 12,5 ml Gesamtvolumen verteilt, um für den nächsten Tag eine 60%ige Konfluenz zu gewährleisten. Für die Transfektion der Hek293T wurden die Reagenzien des CalPhos Mammalian Transfection Kits (Clontech) verwendet und es wurde sich an dessen Protokoll orientiert. Für jedes zu transfizierende Plasmid wurde ein 1,5-ml-Eppendorf-Tube mit folgenden Reagenzien vorbereitet: 6 µg psPAX2-Plasmid, 3,6 µg pMD2.G-Plasmid und 8,4 µg des Zielplasmids. Um ein Endvolumen von 526 µl zu erreichen, wurden alle Proben mit dem vom Hersteller mitgelieferten H₂O aufgefüllt und mit 74 µl 2M-Kalziumlösung ergänzt. Als nächstes wurde für jede Transfektion ein 15-ml-Tube mit 600 µl 2 x HBS vorbereitet. Anschließend wurde in dieses tropfenweise die zuvor beschriebene Plasmidlösung unter sanftem

Schütteln hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur wurde jeder Transfektionsansatz vollständig (1,2 ml) zur entsprechenden vorbereiteten Hek293T-Kulturflasche hinzugefügt. Die Flaschen wurden bis zum nächsten Morgen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, gefolgt von einem Mediumwechsel. Dabei musste mit großer Vorsicht gearbeitet werden, da die Zellen nur locker am Boden hafteten. Das Medium wurde 48 h nach der Transfektion geerntet, in einem 50-ml-Falcon-Tube gesammelt und bei 4 °C aufbewahrt. Die Kulturflaschen wurden mit 12,5 ml neuen Mediums befüllt. Am nächsten Morgen wurde erneut das Medium gesammelt und zusammen mit der Ernte vom Vortag unter Verwendung eines 0,45-µm-Filters filtriert. Der virushaltige Überstand wurde anschließend in 5-ml-Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.3.2 Lentivirale Transduktion

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zielzellen in Vorbereitung für die Transduktion einen Tag zuvor mit $1 \cdot 10^5$ (für Hek293) bzw. $1,25 \cdot 10^5$ (für 208F) Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät, sodass die Konfluenz am Folgetag bei ca. 60 % lag. Der beim lentiviralen Packaging hergestellte, unkonzentrierte Virusüberstand wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Vor der Transduktion wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden vorsichtig mit 1 x PBS gespült und es wurde zunächst 1 ml Medium pro Well hinzugefügt. Bei der Transduktion der Hek293-Zellen wurden 500 µl und bei der Transduktion der 208F-Zellen wurden 700 µl Virusüberstand eingesetzt. Das Endvolumen im Well betrug 2 ml und enthielt 8 µg/ml Protaminsulfat zur Verbesserung der Transduktionseffizienz. Dabei wurde der virushaltige Überstand stets zuletzt hinzugefügt. Nichttransduzierte Zellen dienten der Kontrolle und wurden jedem Schritt des Protokolls unterzogen, außer dass statt des virushaltigen Überstands normales Kulturmedium eingesetzt wurde. Am nächsten Tag wurde das virushaltige Medium entfernt, die Zellen wurden zweimal vorsichtig mit 1 x PBS gespült und ihre Vitalität wurde unter dem Mikroskop überprüft.

4.2.4 Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (FACS)

Zellpopulationen, die mit den für GFP kodierenden Plasmiden transduziert wurden, wurden mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) analysiert, um den Anteil der Zellen zu ermitteln, die GFP synthetisieren. Die fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen Charakteristika voneinander getrennt und gemessen werden können. Dazu werden die Zellen vom Gerät in eine Küvette gesaugt, einem Laserstrahl ausgesetzt und das emittierte Licht wird von verschiedenen

Detektoren aufgefangen und gemessen. Die Lichtstreuung lässt dabei Rückschlüsse auf die Größe, Gestalt und Fluoreszenz der Zellen zu.

Um die FACS-Analyse durchzuführen erfolgte zunächst die Ernte der Zellen. Die 208F-Zellen wurden nach zwölf und die Hek293-Zellen nach 14 Tagen geerntet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden, wie in Punkt „Zellzählung“ (Kapitel 4.2.1) beschrieben, trypsiniert und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden mit einem Ansatz aus 1 x PBS mit 1 % FCS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei 200 g wurden die Zellen je nach Größe des entstandenen Zellpellets in 500–1000 µl des PBS/FCS-Ansatzes aufgenommen, resuspendiert und 175 µl der Zellsuspension zur Messung im FACS-Gerät genutzt. Zur Positivkontrolle dienten Zellen, die mit dem Originalplasmid pCDH-EF1-MCS-IRES-GFP transduziert wurden. Als Negativkontrolle wurden nichttransduzierte Zellen verwendet.

Alle Messungen erfolgten am FACS Accuri (Becton Dickenson BD, Heidelberg). Je Probe wurden 20.000 Ereignisse (*Events*) gezählt. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Accuri C6 (BD) ausgewertet. In dem SSC-A/FSC-A-Punktdiagramm (*dot plot*) können die Zellen entsprechend ihrer Vorwärts- und Seitenstreuprofile einander zugeordnet und gruppiert werden (SSC-A: *Side Scatter* im Messkanal A, FSC-A: *Forward Scatter* im Messkanal A). Um verschiedene Subgruppen der Messung (hier Zelltrümmer und andere Unreinheiten) von den zu untersuchenden Zellen zu unterscheiden, wurde das *Gating* im SSC-A/FSC-A-*dot-plot* vorgenommen. Hierzu wurde die Region mit den zytometrischen *Events* im SSC-A/FSC-A-*dot-plot* mittels Markierung ausgewählt, die die zu untersuchenden Zellen widerspiegelte. Für die Analyse der Fluoreszenz wurde an drei nichttransfizierten Proben ein Grenzwert für die Fluoreszenz festgelegt. Bei diesen Proben konnte von höchstens 3 % Eigenfluoreszenz ausgegangen werden. Für die Grenzwertfestlegung wurde im Fenster für die Fluoreszenz und den *Cellcount* (Count/FL1-A-*plot*) die Grenzmarkierung so gesetzt, dass bei allen drei Proben die Fluoreszenz bei maximal 3 % lag. Mit diesen Rahmenmarkierungen wurden die *Events* analysiert.

4.2.5 Proteinchemische Methoden

4.2.5.1 Proteinextraktion

Zur Extraktion der Proteine wurde der Überstand im Well abgesaugt und verworfen, der Boden vorsichtig mit kaltem 1 x PBS gespült und mit Lysereagenz (ca. 100 µl/6-Well) versetzt. Als Lysereagenz wurden SDS-Lysepuffer oder Bio-Rad-Lysereagenz verwendet. Bei Verwendung

des SDS-Lysepuffers wurde die Suspension nach dem Abschaben mit einem Schaber gleich in ein Eppendorfgefäß übertragen und für 30 min bei 4 °C geschüttelt. Bei der Verwendung des Bio-Rad-Lysereagenz' wurden die Platten 20 min bei 4 °C geschüttelt, abgeklebt und anschließend mindestens über Nacht bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Suspension in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß übertragen. Bei beiden Methoden wurden die Proben anschließend zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Bei allen Arbeitsschritten befanden sich die Gefäße, wenn möglich, auf Eis.

4.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die BCA-Reaktion (Bicinchoninsäure-Reaktion) genutzt. Hierbei handelt es sich um eine Methode zur quantitativen, photometrischen Bestimmung von Proteinen. Dabei wird die Gesamtheit der Proteine gemessen. Der eingesetzte Puffer enthält zweiwertige Kupferionen, die quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen reagieren. Zusammen mit der Bicinchoninsäure bilden sie einen violetten Farbstoff, dessen Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch am ELISA-Reader (Bio-Rad) ausgewertet werden kann.

Die Vorbereitung des BCA-Puffers (aus dem BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) erfolgte direkt vor der Erstellung der BSA-Standardreihe. Dazu mussten die beiden vom Hersteller mitgelieferten Komponenten frisch miteinander gemischt werden.

Um einen Vergleichswert zu haben, wurden verschiedene Konzentrationen einer BSA-Lösung (BSA in 1 x PBS 10 ug/ul, 5 ug/ul, 1 ug/ul, 0,1 ug/ul und 0,05 ug/ul) angesetzt. Von dieser Standardreihe wurden je Standardwert 2 µl und je 2 µl der zu ermittelnden Proben auf eine 96-Well-Platte in Duplikaten aufgetragen. Anschließend wurden 100 µl des BCA-Puffers hinzugefügt und die Platte wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte der Farbumschlag entsprechend der Konzentration.

Nach erfolgter Reaktion wurden die Absorptionswerte der 96-Well-Platte im ELISA-Reader mit dem Microplate-Manager photometrisch bei 625 nm gemessen.

4.2.5.3 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine molekularbiochemische Methode zur Auftrennung von Proteingemischen.

Das Grundprinzip ist, dass Proteine das anionische Tensid SDS binden und damit ihre Eigenladung verdeckt wird. Damit herrschen innerhalb des Proteins veränderte Kräfteverhältnisse und die Bildung von Quartärstrukturen wird unterdrückt. Bei der Herstellung

der Polyacrylamidgele wurde mit dem System nach Laemmli gearbeitet. Hierbei setzt sich das Gel aus einem Sammelgel und einem Trenngel zusammen. Beide unterscheiden sich hinsichtlich ihres pH-Wertes, ihrer Ionenstärke und ihrer Porengröße. Die Zusammensetzung der Gele kann Kapitel 4.1.3 entnommen werden. Meist wurden 10%ige und 12%ige Gele eingesetzt.

Nach dem Auftragen der Proben wurde eine Spannung an das Geld angelegt. Daraufhin konnten sie entlang des elektrischen Feldes im Polyacrylamidgel nach molekularer Masse aufgetrennt werden, da sich die Moleküle je nach Molekülgröße unterschiedlich schnell fortbewegten. Diese Trennung wird durch die gitterförmige Struktur des Acrylamids, die durch Polymerisierung während der Gelherstellung entsteht, ermöglicht. Durch dieses ‚Wandern‘ im Gitternetzwerk werden klar voneinander abgrenzbare Proteinbanden erzeugt, die zur quantitativen Analyse herangezogen werden können. Der Vorteil beim Einsatz des Systems nach Laemmli besteht darin, dass die Proben im Sammelgel zunächst konzentriert werden, bevor sie sich im Trenngel auftrennen. Dieses führt zu schärferen Banden und erlaubt größere Probenvolumina als in Gelen ohne Sammelgel (Laemmli 1970).

Vor der Auftragung in die Geltaschen mussten die Proben im Eppendorfgeläß wie folgt vorbereitet werden:

Die Proben wurden mit 4 x bzw. 6 x Gelladungspuffer versetzt und auf einheitliche Volumina von 30–40 µl mit einheitlichen Proteinmengen von 30–50 µg verdünnt, sodass der Gelladungspuffer am Ende in einfacher Konzentration vorlag. Danach erfolgten die Denaturierung bei 95 °C im Heizblock für 5 min und die Lagerung auf Eis bis zum Zeitpunkt des Auftragens. Um einen Flüssigkeitsverlust durch am Deckel gesammelte Tröpfchen und damit ein verändertes Mischungsverhältnis zu vermeiden, erfolgte eine kurze Zentrifugation der Proben.

Anschließend wurde die erste Geltasche mit 4 µl Marker befüllt (PageRuler Prestained™). Dieser enthielt ein Proteingemisch, dessen Bestandteile bekannt und je nach Größe bereits vorgefärbt waren. Dies diente dazu, den Fortschritt der Wanderung der Proben zu verfolgen. Anschließend wurden die übrigen Geltaschen mithilfe einer Hamilton-Pipette mit den Proben befüllt. Sind Geltaschen unbefüllt geblieben, wurden diese mit 1 x Gelladungspuffer gefüllt, um eine Verzerrung der Lauflinie zu vermeiden.

Für die Gelelektrophorese kam zunächst eine geringe Spannung (65 V) zum Einsatz, um das dünnere Sammelgel nicht schmelzen zu lassen. Sobald die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 100–150 V erhöht.

Die Trennung der Proteine erfolgte so lange, bis die gewünschte Höhe erreicht und eine sichere Auftrennung der gesuchten Banden absehbar war.

4.2.5.4 Western Blot

Der Western Blot diente der Analyse von extrahierten, aufgetrennten Proteinen. Dazu musste nach der SDS-PAGE zunächst das ‚Blotten‘ erfolgen. Dabei wurden die aufgetrennten Proteine mittels eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, worauf sie anschließend detektiert werden konnten.

Hierfür wurden drei Lagen Whatman-Filterpapier, eine Nitrozellulose-Membran, das Gel (ohne den Sammelgelanteil) und nochmals drei Lagen Filterpapier in einem Blotter übereinandergeschichtet. Um eine artefaktfreie Übertragung zu erhalten, wurden zuvor alle Bestandteile in Blotting-Puffer getränkt und der Aufbau wurde blasenfrei erstellt. Anschließend wurde der Blotter gleichmäßig verschlossen. Die Gele wurden dann für 1 h bei 100 mA pro Gel (2 mA/cm^2) und maximal 40 V geblottet. Dabei transferierten die Proben entsprechend ihrer Ladung entlang des elektrischen Feldes in die Membran.

Nach diesem Vorgang erfolgte die Immunodetektion der Proteine unter dem Einsatz von spezifischen Antikörpern. Dabei bedient man sich einem oder mehrerer Primärantikörper und jeweils dazu passenden Sekundärantikörpern, die über eine Farbreaktion detektiert werden können. Die Primärantikörper gehen dabei mit den antigenen Epitopen der fixierten Zielproteine Verbindungen ein. Diese Antikörper-Antigen-Reaktion bedarf einer speziellen Vorbereitung:

Nach dem Transfer wurden die Membranen in Blockingreagenz, bestehend aus 1 : 1 Blocking-Puffer (LI-COR) und 1 x PBS, für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gespült, um freie, unspezifische Proteinbindestellen zu blockieren.

Anschließend erfolgte die Bindung des Primärantikörpers. Dazu wurden Blocking-Puffer und PBST [0,1 %] im Verhältnis 1 : 1 gemischt und mit den Antikörpern versehen und zu den Membranen gegeben. Die Antikörper-Antigen-Reaktion erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Die Konzentrationen der Antikörper entsprachen stets den vom Hersteller empfohlenen Angaben. Waren die zu detektierenden Proteinbanden nah beieinander, wurden Primärantikörper unterschiedlicher Spezies eingesetzt, um eine unterschiedliche Färbung ermöglichen zu können. Vor der Bindung des Sekundärantikörpers wurden alle Membranen dreimal für je 5 min mit 1 x PBST gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in einem Ansatz aus Blocking-Puffer und PBST [0,1 %], gemischt im Verhältnis 1 : 1, vorbereitet. Alle Sekundärantikörper waren infrarot-gelabelt und kamen in den zwei Wellenlängen 680 nm und 800 nm zum Einsatz.

Die Bindung des zweiten Antikörpers erfolgte mindestens 1 h und abgedunkelt bei Raumtemperatur, da es sich bei den an die Antikörper gebundenen Infrarotfarbstoffe um

lichtempfindliche Substanzen handelte. Danach erfolgten drei weitere Waschungen für je 5 min in 1 x PBST.

Nach abgeschlossener Reaktion konnten die Membranen in PBS gelagert und am Fluoreszenzscanner (Odyssey-Scanner von LI-COR) gescannt werden. Dabei kamen zwei Laser zum Einsatz, um verschiedene Antikörpergruppen darstellen zu können.

Die Auswertung erfolgte in der Odyssey Application Software Version 3.0 oder im Programm Image Studio Lite Version 4.0. Zum Messen der Banden wurde je eine Bande markiert, die integrierte Intensität abzüglich der mittleren Hintergrundintensität im markierten Bereich bestimmt und mit der Fläche der markierten Bande multipliziert. Die so ermittelten Intensitäten wurden gegenüber der Kontrolle normalisiert.

5 Ergebnisse

Zunächst erfolgt die Auswertung der genomischen Sequenzierung von Patientenmaterial. Im Anschluss wird auf die Herstellung der Zelllinien eingegangen, die die *MEK1*^{S212N}-Mutation tragen. Es folgen die Analyse der Veränderungen auf Proteinebene und zuletzt die Untersuchung der morphologischen Eigenschaften.

5.1 Sequenzierung von Patientenmaterial aus Karzinompatienten

Zur Sequenzierung wurde Gewebe von 96 Patienten mit einem Kolonkarzinom aus dem Archiv des Instituts für Pathologie (Charité – Universitätsmedizin Berlin) herangezogen. Alle 96 Sequenzierungen ergaben eine interpretierbare Sequenz an der Stelle der Mutationen. Unter den 96 Patienten fand sich ein Patient, dessen Tumor-DNA die *MEK1*^{S212N}-Mutation enthielt. Im Folgenden sind die Sequenzierungsergebnisse dieses Patientengewebes dargestellt.

Da die Sanger-Sequenz in Abbildung 8 (links) auf Höhe der Mutation auf die Anwesenheit drei verschiedener Aminosäuren hinweist und starke unspezifische Signale aufweist, ist davon auszugehen, dass die Sequenzierung fehlerhaft war oder die verwendeten Reagenzien verunreinigt waren. Aus diesem Grund wurde eine zweite Sequenzierung der Probe mit dem Primer für den rückwärtigen Strang durchgeführt. Diese diente als Kontrolle (Abbildung 8, rechts). Hierbei zeigte sich auf Höhe der Mutation deutlich die Anwesenheit von Cytosin und Thymin. Die Hintergrundsignale waren deutlich schwächer, sodass von einer erfolgreichen Sequenzierung ausgegangen werden kann. Die Sequenz bestätigte somit die Heterozygotie für die Mutation *MEK1*^{S212N}.

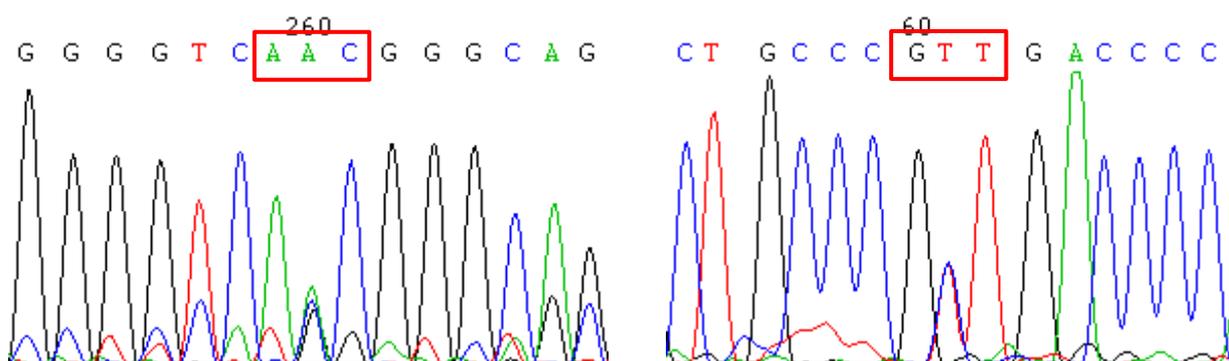


Abbildung 8: Auszug aus der Sanger-Sequenz von MEK1 eines Patienten mit einem Kolonkarzinom

Links: Sanger-Sequenz mit dem Primer MEK1_1L. Rechts: Sanger-Sequenz mit dem Primer MEK1_1R. Die *MEK1*^{S212N}-Mutation mit der Basensequenz AAC (bzw. GTT am rückwärtigen Strang) ist markiert.

schwarz: G – Guanin, blau: C – Cytosin, rot: T – Thymin, grün: A – Adenin.

Die zur Validierung des obigen Ergebnisses erstellte Sequenzierung bestätigte, dass die in der Probe enthaltenen Zellen heterozygot für die *MEK1*^{S212N}-Mutation waren (siehe Abbildung 9).

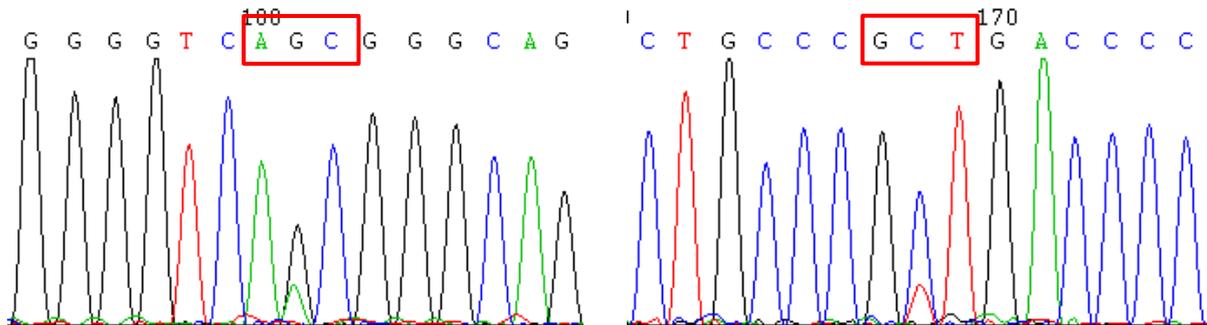


Abbildung 9: Auszug aus der Sanger-Sequenz von MEK1 des Patienten mit einem Kolonkarzinom

Links: Sanger-Sequenz mit dem Primer MEKmutfor_01. Rechts: Sanger-Sequenz mit dem Primer MEKmutrev_01.

Die Position der *MEK1*^{S212N}-Mutation ist markiert.

schwarz: G – Guanin, blau: C – Cytosin, rot: T – Thymin, grün: A – Adenin.

5.2 Herstellung von Zelllinien mit der *MEK1*^{S212N}-Mutation

Um die strukturelle Bedeutung der *MEK1*^{S212N}-Mutation untersuchen zu können, wurden folgende Schritte durchgeführt: Zunächst erfolgte die Herstellung geeigneter Konstrukte für MEK1. Dabei handelte es sich um Plasmidabschnitte auf einem Trägerplasmid, die die kodierende Sequenz von MEK1 trugen und mit verschiedenen Mutationen ausgestattet waren. Es folgte die Klonierung dieser Konstrukte in einem Expressionsplasmid. Anschließend wurden daraus lentivirale Partikel generiert, die zur Transduktion der Konstrukte in Hek293- und 208F-Zellen genutzt wurden. Nach Überprüfung der Transduktionseffizienz der Partikel erfolgte die Analyse der Veränderungen auf Proteinebene mit genauerer Betrachtung der MEK1- und p-ERK1/2-Level. Abschließend wurde die Morphologie der transduzierten 208F-Zellen untersucht.

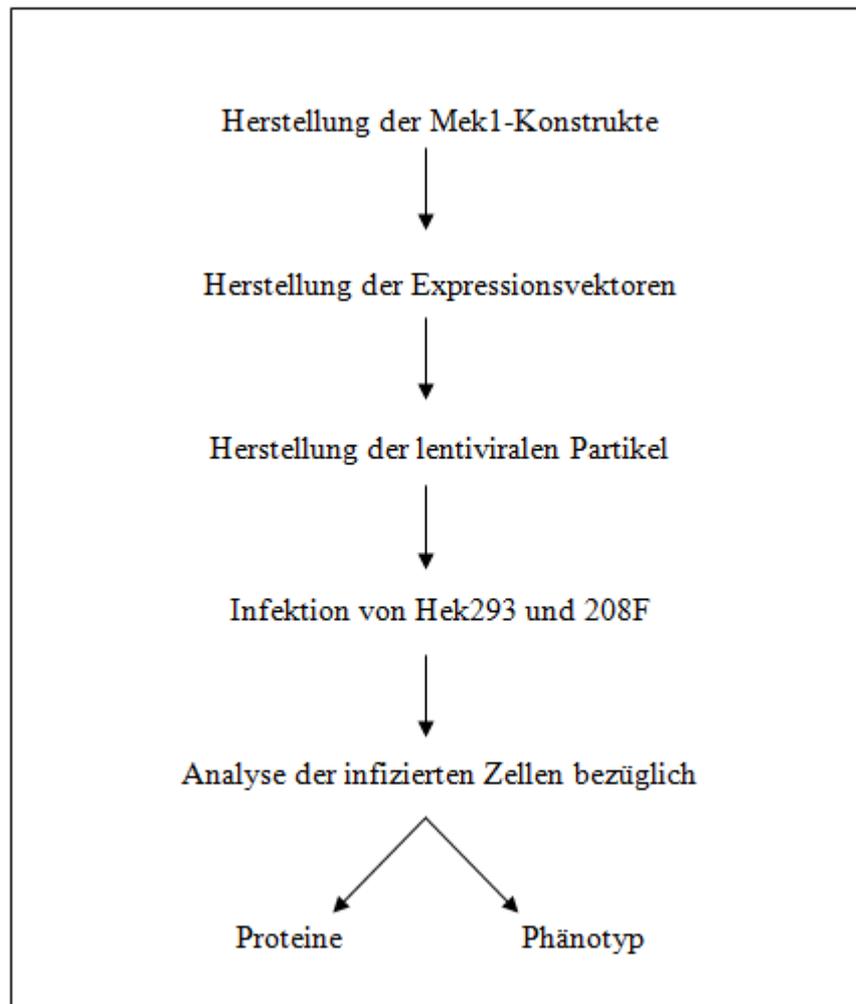


Abbildung 10: Schematische Gliederung der Ergebnisse

5.2.1 Klonierung der MEK1-Trägerplasmide

Um die Rolle der *MEK1^{S212N}*-Mutation für die Aktivität von MEK1 besser untersuchen zu können, war es notwendig, mehrere Expressionsplasmide mit unterschiedlichen Mutationen mit bekannten Auswirkungen sowie dem Wildtyp zu generieren. Dies diente in erster Linie der Kontrolle bei der Analyse der Proteinfunktion.

Zur Verfügung standen dabei zunächst die folgenden MEK1-Konstrukte, die in dem Trägerplasmid pMEV-2HA integriert vorlagen:

- Der MEK1-Wildtyp (**MEK1-WT**): Hierbei handelt es sich um die kodierende Sequenz der Wildtypform von MEK1.
- Ein dominant-negatives MEK1 (**MEK1-DN**): Dieses Konstrukt trägt die Sequenz für ein MEK1, das konsekutiv inaktiv ist. Dabei trägt die Sequenz die drei Mutationen *K97R*, *S218A* und *S222E*, die die Kinaseaktivität von MEK1 unterbinden. Dementsprechend

endet an dieser Stelle die Aktivierungskaskade und ERK wird nicht von MEK1 phosphoryliert.

- Ein konstitutiv aktives MEK1 (**MEK1-CA**): Bei diesem Konstrukt sind eine Deletion der Aminosäuren 32 bis 51 und die Mutationen *S218E* und *S222E* vorhanden, sodass MEK1 an diesen Stellen nicht mehr inhibitorisch reguliert werden kann. Somit ist MEK1 vermehrt aktiv und sorgt für eine gesteigerte Phosphorylierung von ERK.

Aus dem Trägerplasmid für den MEK1-Wildtyp wurde von Raphaela Fritsche (Max-Delbrück-Centrum Berlin) bereits die S212N-Mutation mithilfe der *site-directed mutagenesis* durch den Einbau einer Punktmutation hergestellt. Dabei wurde in dem Codon für Serin (S212) die Base Guanin durch die Base Adenin ausgetauscht, um so das Codon für Asparagin (N) zu generieren.



Anschließend wurde daraus im Rahmen dieser Arbeit mit der gleichen Methode die *MEK1^{S212D}*-Mutation generiert. Hierbei wurde im Codon für Asparagin (212N) das erste Adenin durch ein Guanin ausgetauscht, sodass daraus das Codon für Asparaginsäure (D) entstand.



Asparaginsäure ist eine phosphomimetische Aminosäure. Sie ähnelt einem phosphorylierten Serin. Der Austausch von Asparagin durch Asparaginsäure diente der Herstellung eines MEK1-Konstrukts, das eine dauerhafte Phosphorylierung an dieser Position imitiert. Die detaillierten Schritte dazu sind im Kapitel 4.2.2.3 angegeben.

Zur Kontrolle wurden die beiden Plasmide nach Sanger sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse bestätigten den erfolgreichen Einbau der Punktmutationen (siehe Abbildungen 11 und 12).

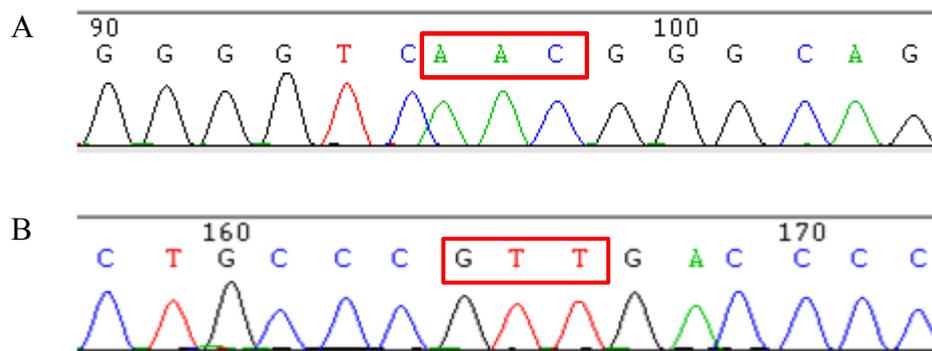


Abbildung 11: Ausschnitt aus der Sanger-Sequenz für pMEV-MEK1-S212N

A: Sanger-Sequenz für pMEV-MEK1-S212N, erstellt mit dem MEKmutfor_01 Primer. B: Sanger-Sequenz für pMEV-MEK1-S212N, erstellt mit dem MEKmutrev_01 Primer. Der rote Kasten markiert die Mutation *MEK1^{S212N}*.
schwarz: G – Guanin, blau: C – Cytosin, rot: T – Thymin, grün: A – Adenin.

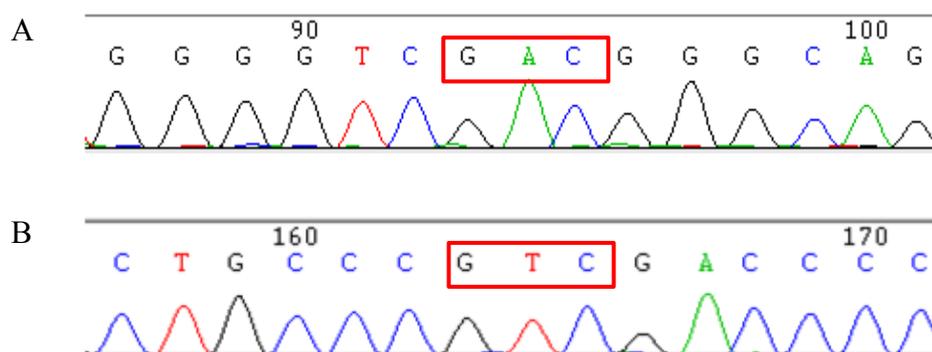


Abbildung 12: Ausschnitt aus der Sanger-Sequenz für pMEV-MEK1-S212D

A: Sanger-Sequenz für pMEV-MEK1-S212D, erstellt mit dem MEKmutfor_01 Primer. B: Sanger-Sequenz für pMEV-MEK1-S212D, erstellt mit dem MEKmutrev_01 Primer. Der rote Kasten markiert die Mutation *MEK1^{S212D}*.
schwarz: G – Guanin, blau: C – Cytosin, rot: T – Thymin, grün: A – Adenin.

5.2.2 Klonierung der MEK1-GFP-Expressionsplasmide

Für die Herstellung der MEK1-Expressionsplasmide wurden die MEK1-Trägerplasmide pMEV-MEK1-WT, pMEV-MEK1-212N, pMEV-MEK1-212D, pMEV-MEK1-DN und pMEV-MEK1-CA unter der Verwendung der Restriktionsendonuklease BamHI geschnitten. Dabei entstanden zwei DNA-Fragmente, wobei jenes mit der Basenlänge von 1209 bp (kleineres Fragment für MEK1-CA) den gewünschten Plasmidabschnitt mit der Expressionskassette für MEK1 enthielt. Nach dem gleichen Prinzip wurde das Ausgangs-Expressionsplasmid pCDH-EF1-MCS-IRES-GFP unter der Verwendung von SwaI – für den Einsatz den Inserts MEK1-CA – und NheI – für

den Einsatz der restlichen Konstrukte – geschnitten. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden anschließend für die Ligation vorbereitet. Dazu wurden alle mit NheI geschnittenen Plasmide dem *Blunting* unterzogen, da NheI überhängende Enden erzeugte, SwaI jedoch nicht. Außerdem wurde das geschnittene Ausgangsplasmid dephosphoryliert, damit bei der anschließenden Ligation keine vorzeitige Ringbildung durch die 5'P-Enden des Plasmids zustande kommt. Danach erfolgten die Auftrennung, Aufreinigung und Ligation aller Ansätze. Daran schloss sich die Transformation chemisch kompetenter Stbl3-*E.-coli*-Bakterien an. Das Endplasmid bestand anschließend aus dem pCDH-EF1-MCS-IRES-GFP Plasmid mit je einem Insert für das jeweilige MEK1-Konstrukt anstelle der MCS, wobei der Abschnitt für das GFP hinter der Expressionskassette für MEK1 lag (siehe Abbildung 13).

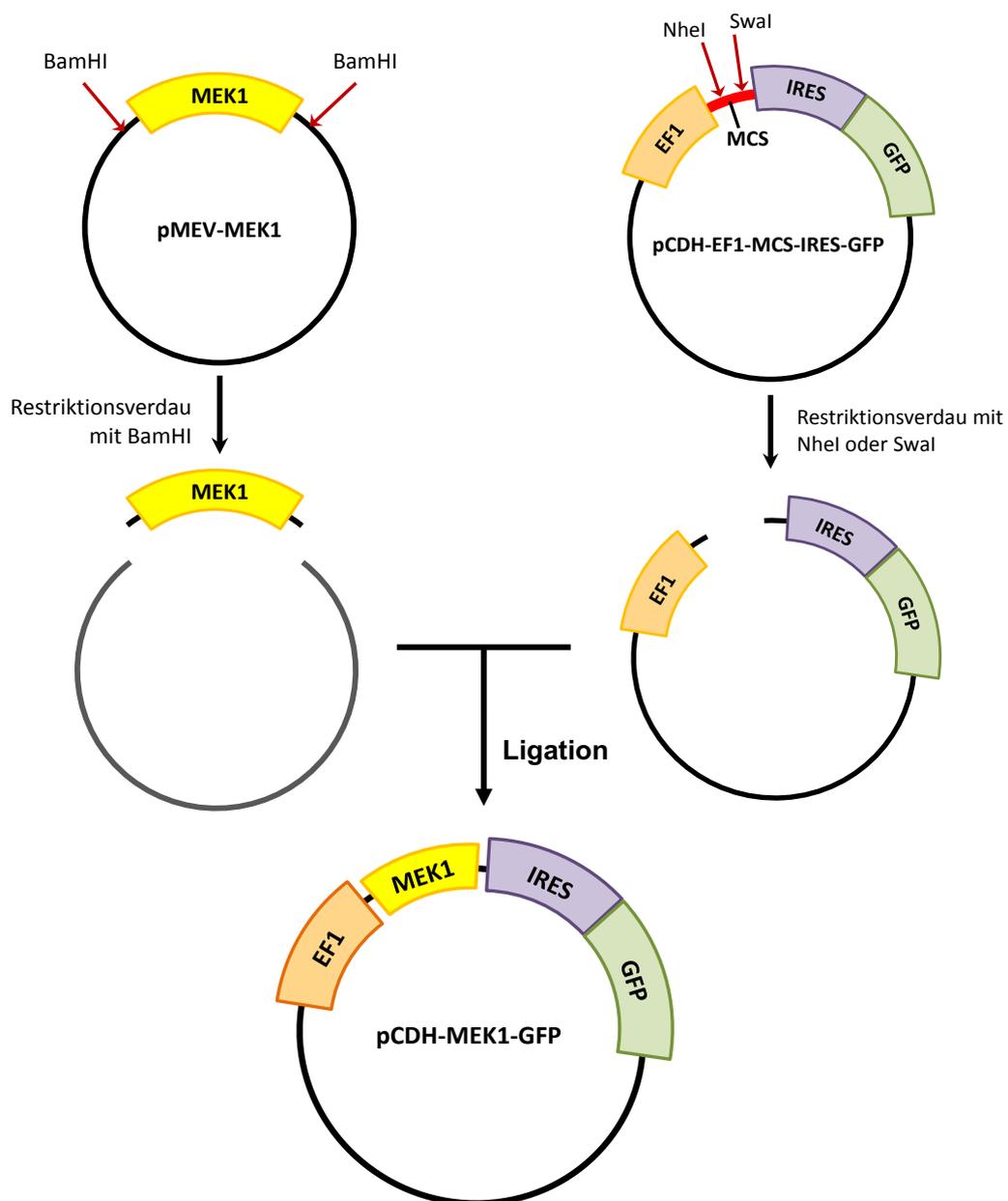


Abbildung 13: Klonierung des Expressionsplasmids für die MEK1-Konstrukte, schematisch dargestellt

Zur Kontrolle der Orientierung der Inserts bei der Ligation wurden die Endplasmide mit PstI verdaut und in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Restriktionsschnittstellen wurden dabei so gewählt, dass deutlich voneinander unterscheidbare DNA-Fragmente entstehen. Bei korrekter Orientierung betragen die Fragmentlängen 290 bp, 2016 bp und 6661 bp. Die Größenabweichung des MEK1-CA-Konstrukts war dabei vernachlässigbar gering. Bei verkehrter Orientierung der MEK1-Inserts wären Fragmente mit den Längen von 290 bp, 2812 bp und 5865 bp zu erwarten gewesen. Für jeden MEK1-Typ konnte mindestens eine Probe ermittelt werden, deren Insertorientierung korrekt war.

Die erwarteten Fragmente konnten so durch einen Kontrollverdau erfolgreich identifiziert und die korrekte Integrität der MEK1-Konstrukte konnte bestätigt werden (siehe dazu Abbildung 14).

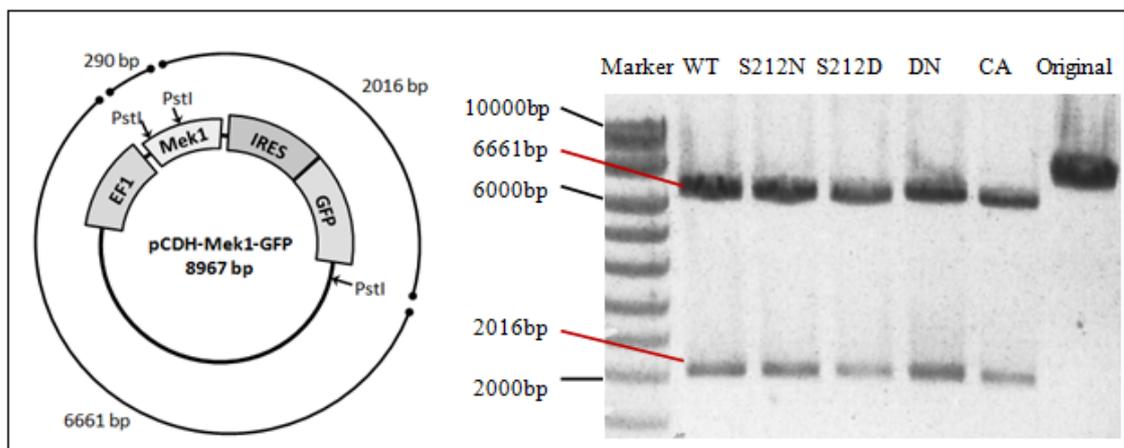


Abbildung 14: Kontrollverdau der Ligation der Expressionsplasmide

Links: Die Zusammensetzung der Plasmidfragmente und ihrer Fragmentgrößen ist auf der linken Seite schematisch dargestellt.

Rechts: Gelfoto des Agarosegelscans mit Banden der DNA-Fragmente der Expressionsplasmide. Die Banden des 1-kb-DNA-Markers sind mittig dargestellt.

WT: pCDH-EF1-MEK1-WT-IRES-GFP geschnitten, S212N: pCDH-EF1-MEK1-212N-IRES-GFP geschnitten,

S212D: pCDH-EF1-MEK1-212D-IRES-GFP geschnitten,

DN: pCDH-EF1-MEK1-DN-IRES-GFP, CA: pCDH-EF1-MEK1-CA-IRES-GFP,

Original: pCDH-EF1-MCS-IRES-GFP geschnitten.

Im Anschluss daran wurden alle pCDH-EF1-MEK1-IRES-GFP-Plasmide zur Kontrolle nach Sanger sequenziert. Diese konnte eine korrekte Insertorientierung und die Vollständigkeit der MEK1-Sequenz validieren (hier nicht dargestellt).

5.2.3 Lentivirale Transduktion von Hek293 und 208F

Für die Herstellung von Zellpopulationen, die die verschiedenen MEK1-Varianten exprimieren, wurden lentivirale Partikel hergestellt. Die Produktion der Viren wurde im Methodenteil dargestellt. Unter Anwendung eines Standardprotokolls, das dem Methodenteil entnommen werden kann, wurde je Konstrukt bzw. Kontrolle ein Well einer 6-Well-Platte mit einem 60%ig-konfluenten Zellrasen lentiviral transduziert.

Bei den Zielzellen handelte es sich um Hek293- und 208F-Zellen, die im Material- und Methodenteil bereits vorgestellt wurden. Die bei der lentiviralen Transduktion eingesetzten Mengen an Virusüberstand wurden zuvor experimentell für den jeweiligen Zelltyp optimiert. Dazu wurden verschiedene Verhältnisse von virushaltigem Überstand und Medium eingesetzt und die Zellen im Verlauf im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Die für Folgeexperimente eingesetzte Menge an virushaltigem Überstand wurde anhand der stärksten Fluoreszenz der Zellen ausgewählt und betrug für Hek293-Zellen 500 µl pro Well und für 208F-Zellen 700 µl pro Well (siehe Methodenteil).

5.2.4 Analyse der Transduktionseffizienz der lentiviralen Transduktion

5.2.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Nach Infektion der Zielzellen mit den lentiviralen Partikeln für die einzelnen MEK1-Konstrukte und mit dem pCDH-EF1-MCS-IRES-GFP-Plasmid als Kontrolle wurden alle 6-Well-Platten über mehrere Tage ab dem zweiten Tag nach der lentiviralen Transduktion täglich im Fluoreszenzmikroskop begutachtet, um den Erfolg der Methode optisch festzuhalten und die transduzierten Zellen einer strukturierten Auszählung zugänglich zu machen. GFP-synthetisierende Zellen waren durch ihre grüne Farbe erkennbar. Somit konnte ihr Anteil an der Gesamtpopulation im Mikroskop eingeschätzt und damit ein Rückschluss auf die Effizienz der Transduktion gezogen werden.

Transduktion in Hek293-Zellen

Die erste Betrachtung der Hek293-Zellen im Fluoreszenzmikroskop erfolgte nach 48 h. So konnte davon ausgegangen werden, dass sich die Zellen nach der Behandlung mit den viralen Partikeln ausreichend erholt haben und erste Kopien des GFP angefertigt wurden. Als Negativkontrolle dienten nichttransduzierte Hek293-Zellen und als Positivkontrolle wurden mit dem pCDH-EF1-MCS-IRES-GFP-Plasmid infizierte Hek293-Zellen benutzt.

Bei allen transduzierten Zell-Populationen stieg der Anteil grün fluoreszierender Zellen im Verlauf langsam an. Die nachfolgende Abbildung zeigt die transduzierten Hek293-Zellen nach 96 h.

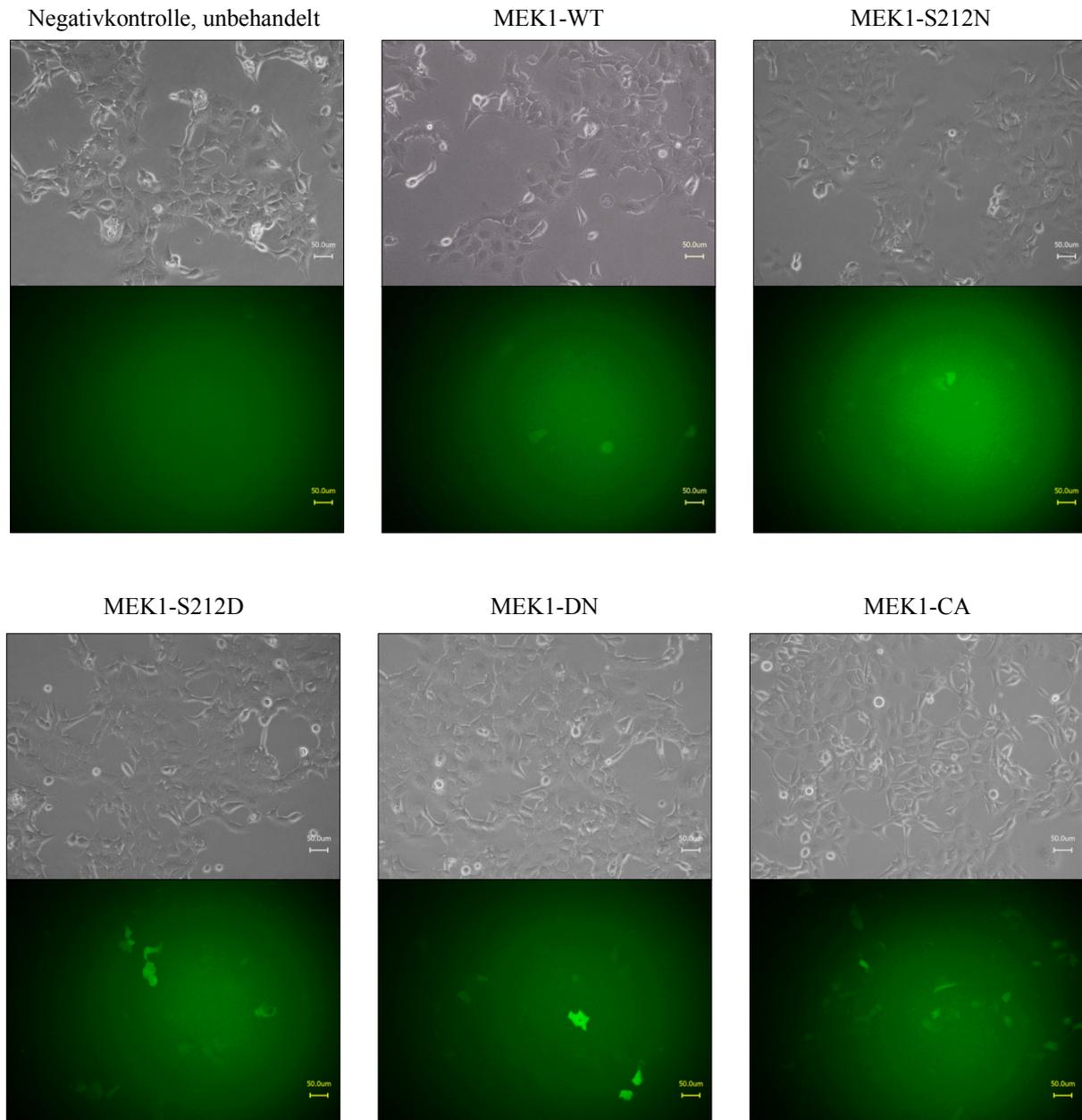
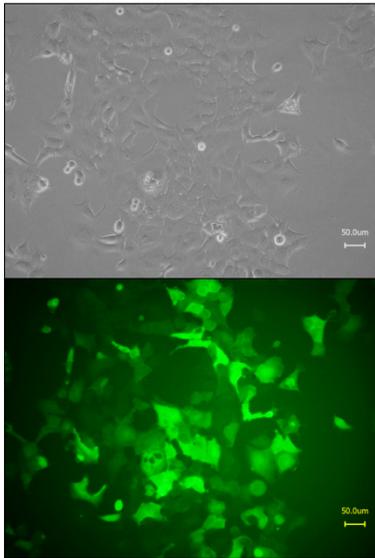


Abbildung 15: Hek293-Zellen 4 Tage nach lentiviraler Transduktion

Fortsetzung auf der nächsten Seite.

Positivkontrolle, GFP



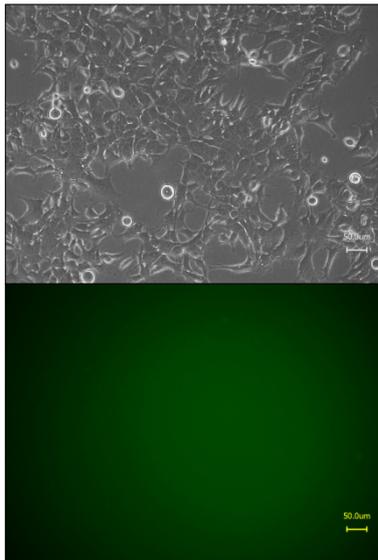
Fortsetzung Abbildung 15:

Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen der lentiviral transduzierten Hek293-Populationen 4 Tage nach lentiviraler Infektion. Für jede Zellpopulation ist oben die Phasenkontrastaufnahme dargestellt. Unterhalb davon sind die Fluoreszenzaufnahmen der entsprechenden Bildausschnitte abgebildet. Alle Bilder wurden zur deutlicheren Darstellung mittels digitaler Bildbearbeitung (IrfanView) kontrastiert (Maßstabballen: 50 µm).

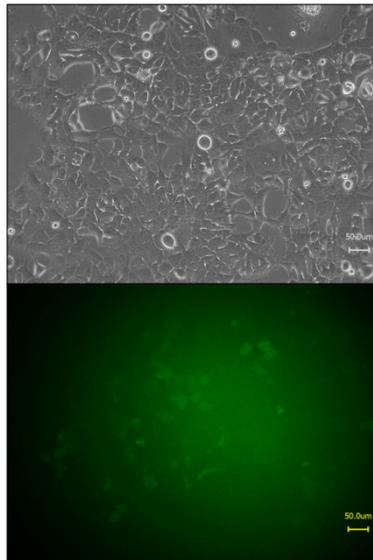
Das Optimum zur Erkennung grün fluoreszierender Zellen war nach acht Tagen erreicht (Abbildung 16).

Nach acht Tagen lag die Konfluenz der Zellen zwischen 40 und 80 %. Dabei zeigte vor allem die Hek293-MEK1-CA-Population eine deutlich geringere Konfluenz (ca. 40 %) als die restlichen transduzierten Zellen und die Negativkontrolle (je zwischen 70 und 80 %). Die Kulturschalen enthielten außerdem vereinzelte im Medium schwimmende oder locker anhaftende Zellen, die in Form kugelförmiger Artefakte erkennbar waren und sich deutlich vom restlichen Zellbild unterschieden. Dabei handelte es sich in den meisten Fällen um tote Zellen, die ihre Integrität verloren haben und anschließend im Medium schwammen. Beim Vergleich der Fluoreszenzintensitäten wurde beachtet, dass tote Zellen eine höhere Autofluoreszenz als vitale Zellen haben und dementsprechend nicht mit in die Auswertung einfließen konnten.

Negativkontrolle, unbehandelt



MEK1-WT



MEK1-S212N

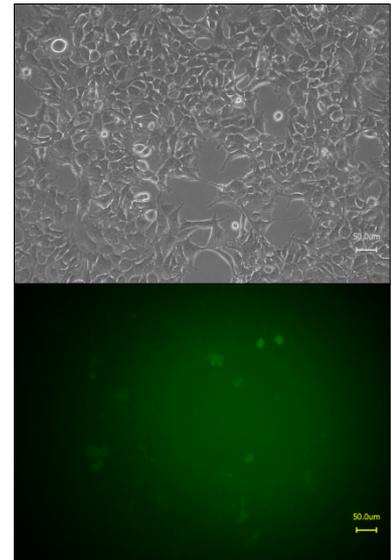
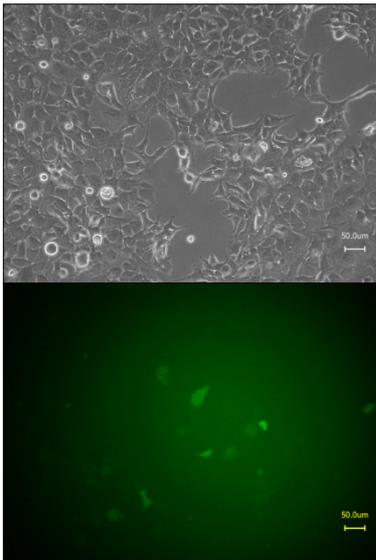


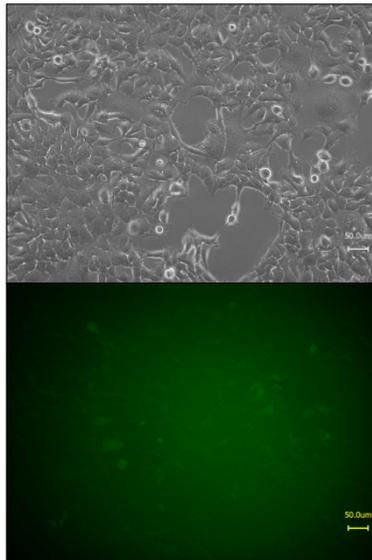
Abbildung 16: Hek293-Zellen 8 Tage nach lentiviraler Transduktion

Fortsetzung auf der nächsten Seite.

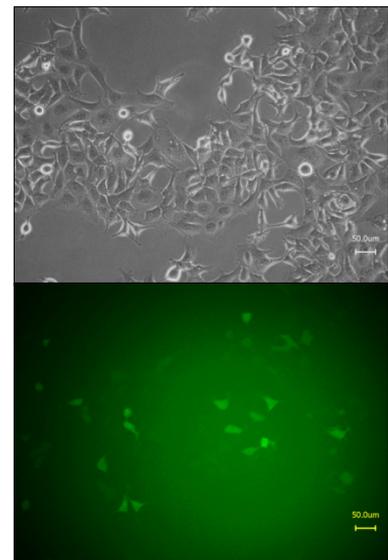
MEK1-S212D



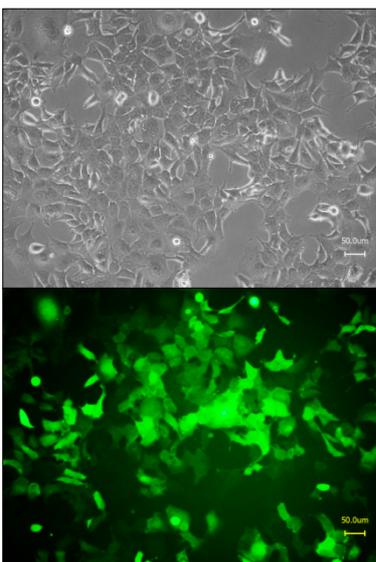
MEK1-DN



MEK1-CA



Positivkontrolle, GFP



Fortsetzung Abbildung 16: Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen der lentiviral transduzierten Hek239-Populationen 8 Tage nach lentiviraler Infektion. Für jede Zellpopulation ist oben die Phasenkontrastaufnahme dargestellt. Unterhalb davon sind die Fluoreszenzaufnahmen der entsprechenden Bildausschnitte abgebildet. Alle Bilder wurden zur deutlicheren Darstellung mittels digitaler Bildbearbeitung (IrfanView) kontrastiert (Maßstabballen: 50 µm).

Bei den nichttransduzierten Zellen (Negativkontrolle) sind in der Fluoreszenzaufnahme keine grünen Zellen zu erkennen. Hingegen zeigt die Aufnahme der Positivkontrolle eine fast 100%ige Fluoreszenz der Zellen. In den MEK1-tragenden Populationen sind deutlich weniger grün und weniger intensiv leuchtende Zellen erkennbar als in der Positivkontrolle. Für die Darstellung der Fluoreszenz dieser Zellen mussten die Aufnahmen mittels digitaler Bildbearbeitung stark kontrastiert werden. Bei genauerer Betrachtung sind im Hintergrund weitere grüne Zellen schemenhaft zu erkennen. Jedoch reicht diese Fluoreszenzintensität nicht aus, um zu entscheiden, ob es sich hierbei wirklich um GFP-tragende Zellen handelt.

Damit erwies sich die Fluoreszenzmikroskopie unter dem Einsatz von GFP als nicht sensitiv genug, um den Anteil an grün fluoreszierenden Zellen ausreichend dokumentieren zu können. Aus diesem Grund wurde an dieser Stelle auf eine prozentuale Auswertung der fluoreszierenden Zellen verzichtet.

Zur Kontrolle wurde je lentiviraler Transduktion ein biologisches Replikat, eine zweite Population, erzeugt. Auch bei diesem stieg der Anteil an grün fluoreszierenden Zellen nicht über das in der Abbildung 16 aufgezeigte Maß. Daher wird hier auf eine Darstellung der Aufnahmen der zweiten Population verzichtet.

Transduktion in 208F-Zellen

Die für die Hek293-Zellen beschriebene Vorgehensweise wurde auch bei den 208F-Zellen angewandt. Jedoch zeigten sich auch hier nur schwache GFP-Signale, sodass auf eine quantitative Auswertung verzichtet werden musste.

5.2.4.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Da mit der Fluoreszenzmikroskopie keine genaue Aussage über die Transduktionseffizienz getroffen werden konnte, wurde für beide Zellsysteme der Anteil der GFP-synthetisierenden Zellen mittels Fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie (FACS) ermittelt. Wurden mit dem FACS-Gerät fluoreszierende Zellen gefunden, konnte nach Festlegung eines Grenzwertes davon ausgegangen werden, dass alle darüber hinaus fluoreszierenden Zellen mindestens eine Kopie von *gfp* erstellt hatten und damit als erfolgreich infiziert galten.

Wie bereits im Methodenteil (4.2.4) erläutert, wurde anhand der nicht behandelten Zellen der Grenzwert für die Fluoreszenz festgelegt. Je Zellart wurden drei Negativkontrollen verwendet, davon ist je eine exemplarisch dargestellt (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Als Positivkontrolle dienten erneut die mit dem pCDH-EF1-MCS-IRES-GFP-Plasmid transduzierten Zellen. Alle Populationen wurden anhand des *Gatings* (P1 in Abbildung 17 und Abbildung 18) der nicht behandelten Population analysiert. Im SSC-A/FSC-A-*dot-plot*, dem Diagramm für die Darstellung der Größe und Granularität der Zellen, erschienen zunächst zwei Subgruppen. Daraufhin wurde die Markierung (P1) beim *Gating*, wie in Abbildung 17 erkennbar, platziert. Bei den zytometrischen Events außerhalb von P1 handelte es sich am ehesten um tote Zellen und Zellfragmente. Diese wurden aus der Analyse der Fluoreszenz ausgeschlossen.

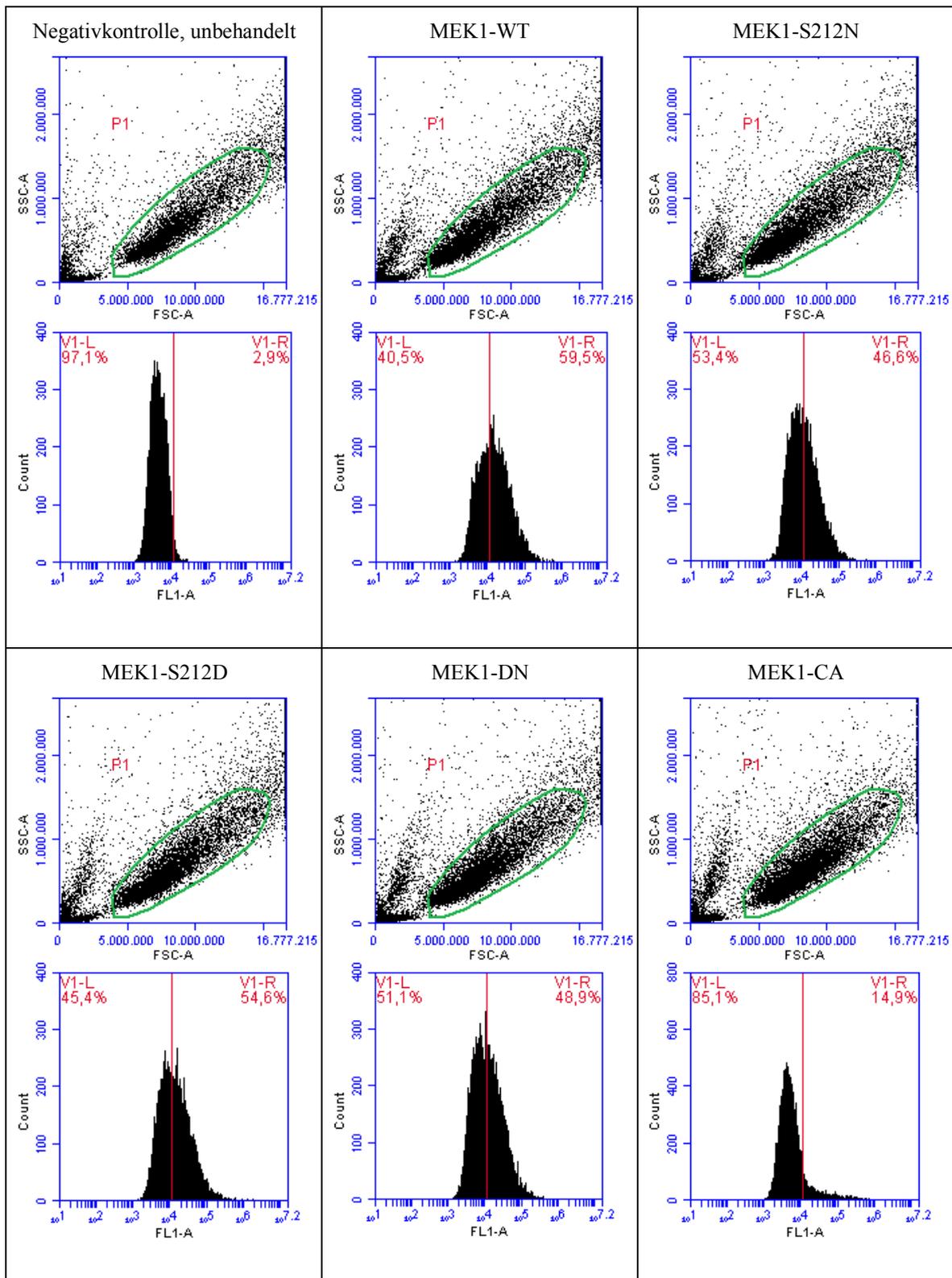
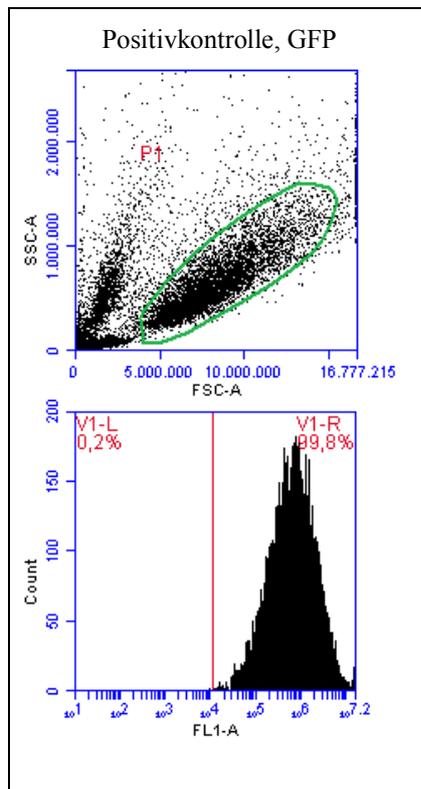


Abbildung 17: FACS-Analyse für Hek293-Populationen 14 Tage nach lentiviraler Transduktion

Fortsetzung auf der nächsten Seite.



Fortsetzung Abbildung 17: Oben ist jeweils das übertragene Gating der Grundpopulation P1 zu sehen. Unten findet sich der Anteil an fluoreszierenden Ereignissen (Zellen).

SSC-A: Achse für den *Side Scatter* im Messkanal A, FSC-A: Achse für den *Forward Scatter* im Messkanal A, FL1-A: Achse für die Fluoreszenz im Messkanal A, *count*: Anzahl der Zellen.

Die Bestimmung der Transduktionseffizienz basierte auf der Annahme, dass alle fluoreszierenden Zellen erfolgreich transduziert wurden. Die FACS-Analyse ergab, dass für die Hek293-Zellen im Mittel eine Transduktionseffizienz von 44,9% (Median 48,9%) für die MEK1-tragenden Plasmide erzielt wurde. Es wurden Transduktionsraten von 14,9% bis 59,5% erreicht (siehe dazu Abbildung 17), wobei lediglich der Wert für die pCDH-EF1-MEK1-CA-IRES-GFP-tragende Population mit 14,9% stark vom Mittelwert abwich. Die

Transduktionseffizienz der Positivkontrolle betrug 99,8%.

Die Analyse der FACS-Daten für die 208F-Zellen erfolgte nach den gleichen Prinzipien, wie für die Hek293-Zellen beschrieben. Die Auswertung ergab für die 208F-Zellen geringere Transduktionsraten als für die Hek293-Zellen. Im Mittel wurden 38,1% (Median 39,4%) der Zellen mit den MEK1-tragenden Plasmiden transduziert. Die Transduktionseffizienz für die MEK1-Expressionsplasmide betrug zwischen 28,1% und 48,3% (siehe dazu Abbildung 18) und die der Positivkontrolle 94,6%.

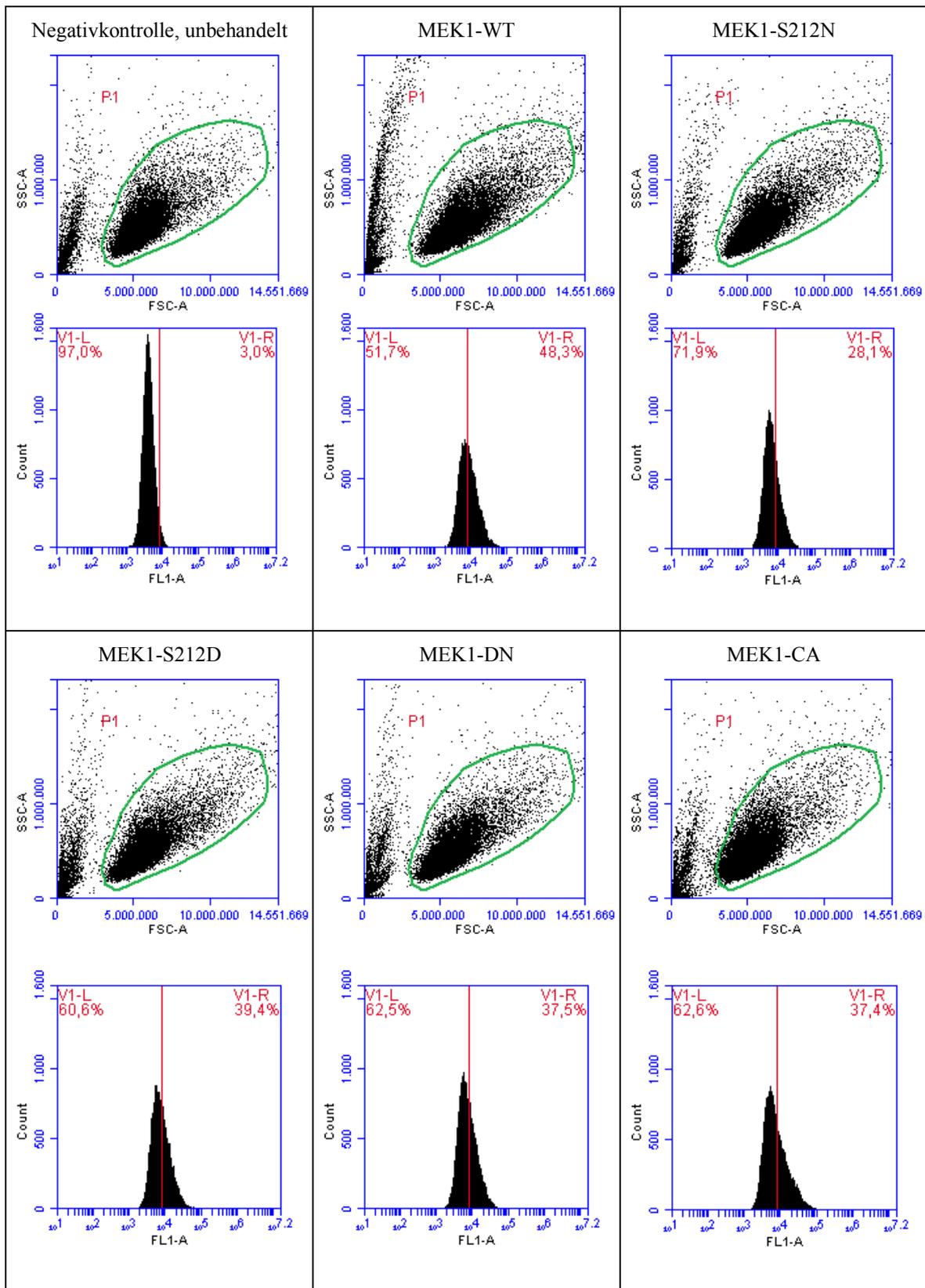
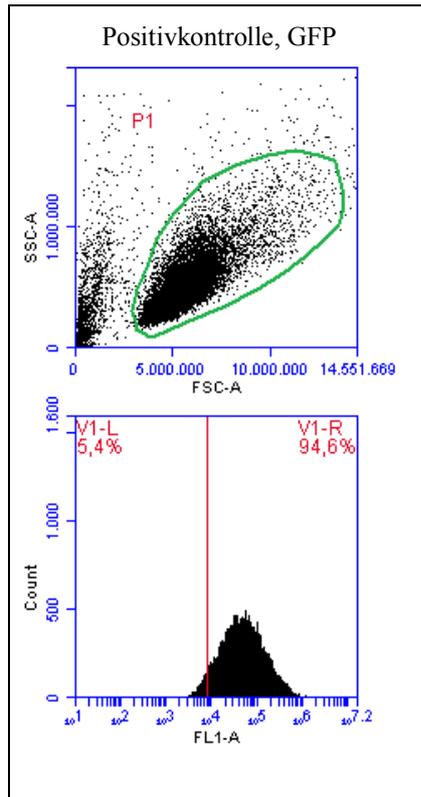


Abbildung 18: FACS-Analyse für die 208F-Populationen 12 Tage nach lentiviraler Transduktion

Fortsetzung auf der nächsten Seite.



Fortsetzung Abbildung 18: Oben ist jeweils das übertragene Gating der Grundpopulation P1 zu sehen. Darunter findet sich der Anteil an fluoreszierenden Ereignissen (Zellen).

SSC-A: Achse für den Side Scatter im Messkanal A, FSC-A: Achse für den *Forward Scatter* im Messkanal A, FL1-A: Achse für die Fluoreszenz im Messkanal A, *count*: Anzahl der Zellen.

5.3 Analyse der Eigenschaften der *MEK1*^{S212N}-tragenden Zellen auf Proteinebene

Nachdem in der FACS-Analyse die Effizienz der lentiviralen Transduktion bestimmt wurde, sollte mittels Western Blot die Proteinbiosynthese von MEK1 der klonierten MEK1-Konstrukte geprüft werden.

5.3.1 Überprüfung der MEK1-Proteinbiosynthese

MEK1-Proteinbiosynthese in Hek293-Zellen

Für die Analyse der MEK1-Proteinbiosynthese wurden von den transduzierten Hek293-Zellen der ersten und zweiten Population nach vier Tagen Proben genommen und mittels Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienten nichttransduzierte Zellen. Als Ladekontrolle wurde GAPDH gewählt, mit der Annahme, dass es von allen Zellen in nahezu gleicher Konzentration synthetisiert wird.

Die Auswertung der Western Blots aus Abbildung 19 ergab für alle mit MEK1-Konstrukten transduzierten Hek293-Zellen eine deutlich gesteigerte Synthese von MEK1 im Vergleich zur Negativkontrolle (unbehandelte Zellen). Bei den Zellen der ersten Hek293-Population zeigte sich für MEK1-WT, MEK1-S212N, MEK1-S212D und MEK1-DN eine 7,7- bis 11,6-fache Proteinbiosynthese. Beim MEK1-CA-Konstrukt ergab sich gemessen an der Kontrolle eine 49,4-fache Synthese.

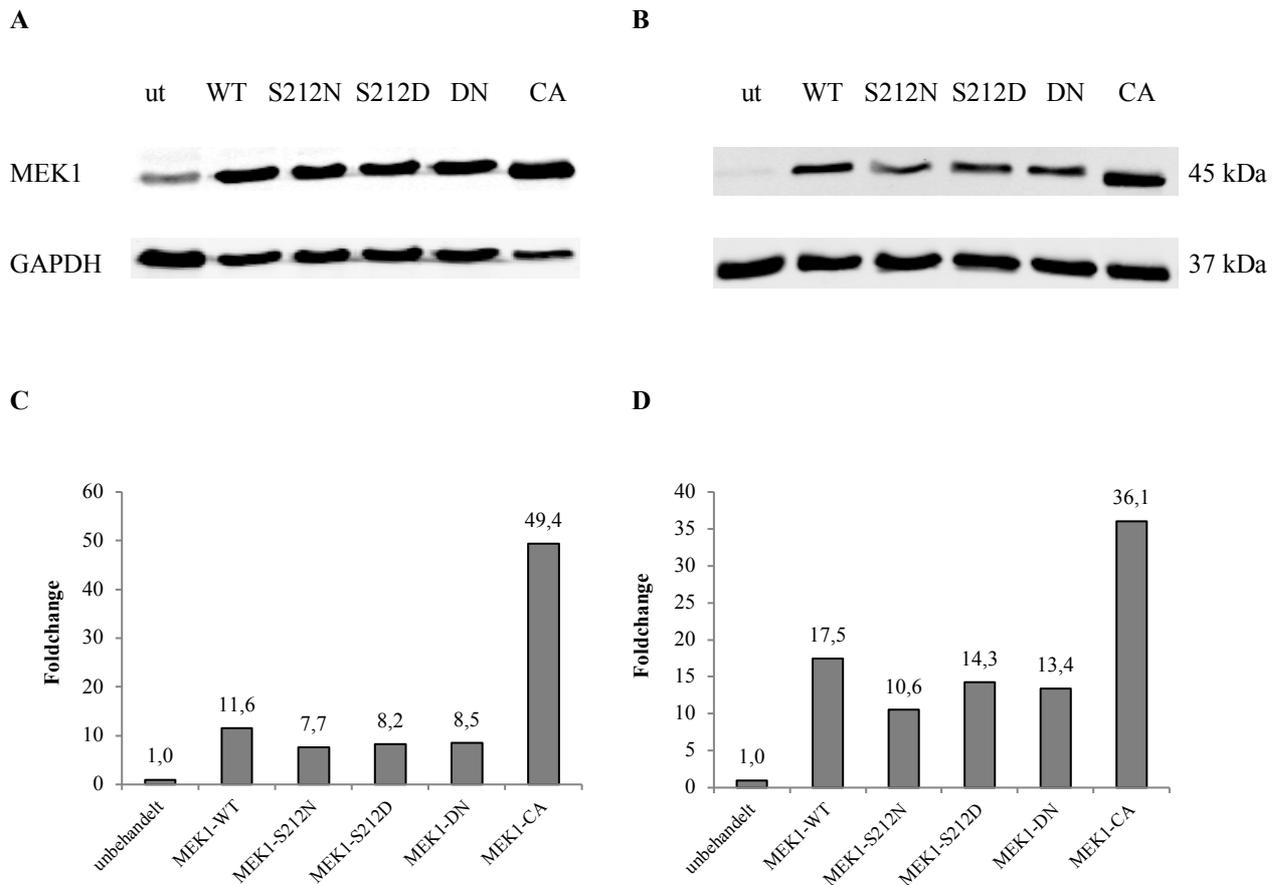


Abbildung 19 : Relative MEK1-Proteinbiosynthese in Hek293-Zellen 4 Tage nach lentiviraler Transduktion

Oben: Western Blot mit 25 µg Gesamtprotein, A) erste Population, B) zweite Population. Zur besseren Darstellung wurden die Aufnahmen der Fluoreszenz mittels digitaler Bildbearbeitung (IrfanView) kontrastiert.

ut: unbehandelt, WT: MEK1-WT, S212N: MEK1-S212N, S212D: MEK1-S212D, DN: MEK1-DN, CA: MEK1-CA.

Unten: C) Auswertung des Western Blots aus A, D) Auswertung des Western Blots aus B. Die Auswertung erfolgte mittels der Odyssey Software und Excel. Für die Berechnung der Proteinbiosynthese (Fold change) wurden die gemessenen Intensitäten für MEK1 durch GAPDH normiert und auf die Negativkontrolle bezogen.

unbehandelt: nichttransduzierte Zellen (Negativkontrolle).

Bei den Zellen der zweiten Population zeigte sich ebenfalls eine deutlich gesteigerte Proteinbiosynthese von MEK1 (siehe Abbildung 20). Für MEK1-WT, MEK1-S212N, MEK1-S212D und MEK1-DN konnte eine 10,6- bis 17,5-fache Produktion erreicht werden. MEK1-CA wurde 36,1-fach synthetisiert.

Im Gegensatz zur ersten Hek293-Population wurde für die zweite Hek293-Population eine Analyse der MEK1-Werte im zeitlichen Verlauf angefertigt. Dazu wurden die Proben 6, 9, 13

und 18 Tage nach der lentiviralen Transduktion entnommen. Dieser Schritt diente der Beobachtung der gesteigerten Proteinbiosynthese. So konnte die Stabilität der MEK1-Produktion nachvollzogen werden. Die Analyse mittels Western Blot zeigte, dass auch 13 Tage nach der Infektion mit lentiviralen Partikeln alle MEK1-Proteinvarianten vermehrt synthetisiert wurden. Die Überproduktion betrug das 4,1- und 9,5-Fache.

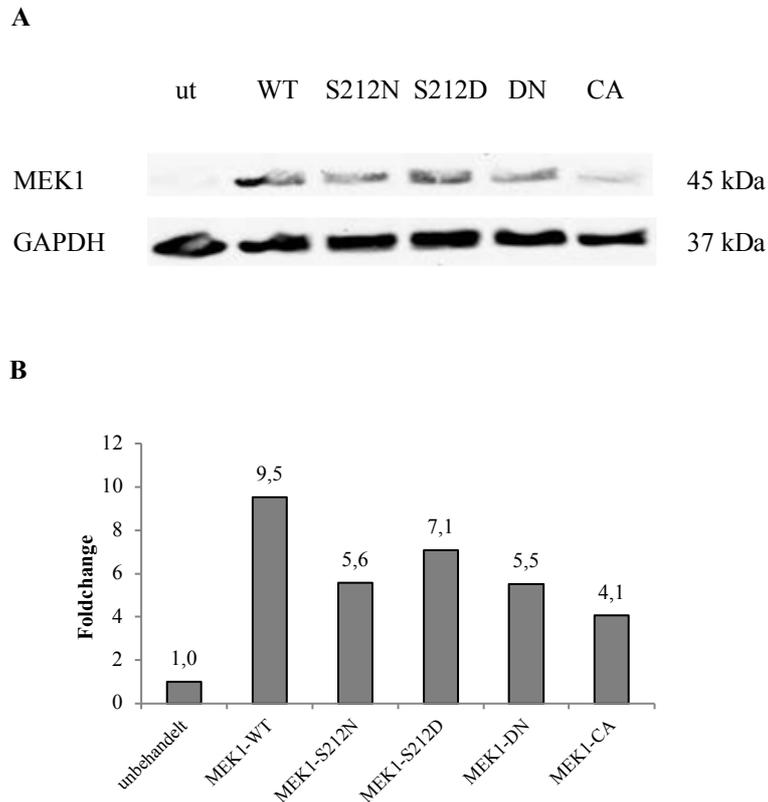


Abbildung 20: Relative MEK1-Proteinbiosynthese in Hek293-Zellen 13 Tage nach lentiviraler Transduktion (zweite Population)

A) Western Blot mit 25 µg Gesamtprotein. Zur besseren Darstellung wurden die Aufnahmen der Fluoreszenz mittels digitaler Bildbearbeitung (IrfanView) kontrastiert.

ut: unbehandelt, WT: MEK1-WT, S212N: MEK1-S212N, S212D: MEK1-S212D, DN: MEK1-DN, CA: MEK1-CA.

B) Auswertung des Western Blots aus A. Die Auswertung erfolgte mittels der Odyssey Software und Excel. Für die Berechnung der Proteinbiosynthese (Fold change) wurden die gemessenen Intensitäten für MEK1 durch GAPDH normiert und auf die Negativkontrolle bezogen. unbehandelt: nichttransduzierte Zellen (Negativkontrolle).

MEK1-Proteinbiosynthese in 208F-Zellen

Für die 208F-Zellen wurden vier und neun Tage nach der Infektion mit den lentiviralen Partikeln Proben zur Überprüfung der MEK1-Proteinproduktion gewonnen und einer Analyse mittels

Western Blot unterzogen. In allen transduzierten Zellen war eine deutlich gesteigerte Proteinbiosynthese von MEK1 erkennbar. Die Synthese war zwischen 12,9- und 19-fach gesteigert. Mit zunehmender Kultivierungsdauer nahm diese jedoch ab, sodass nach neun Tagen die Proteinbiosynthese 6,2-fache bis 11,1-fache Werte erreichte (siehe Abbildung 21).

Es wurden die gleichen Antikörper und Berechnungsansätze wie für die Proteinanalyse der Hek293-Zellen verwendet.

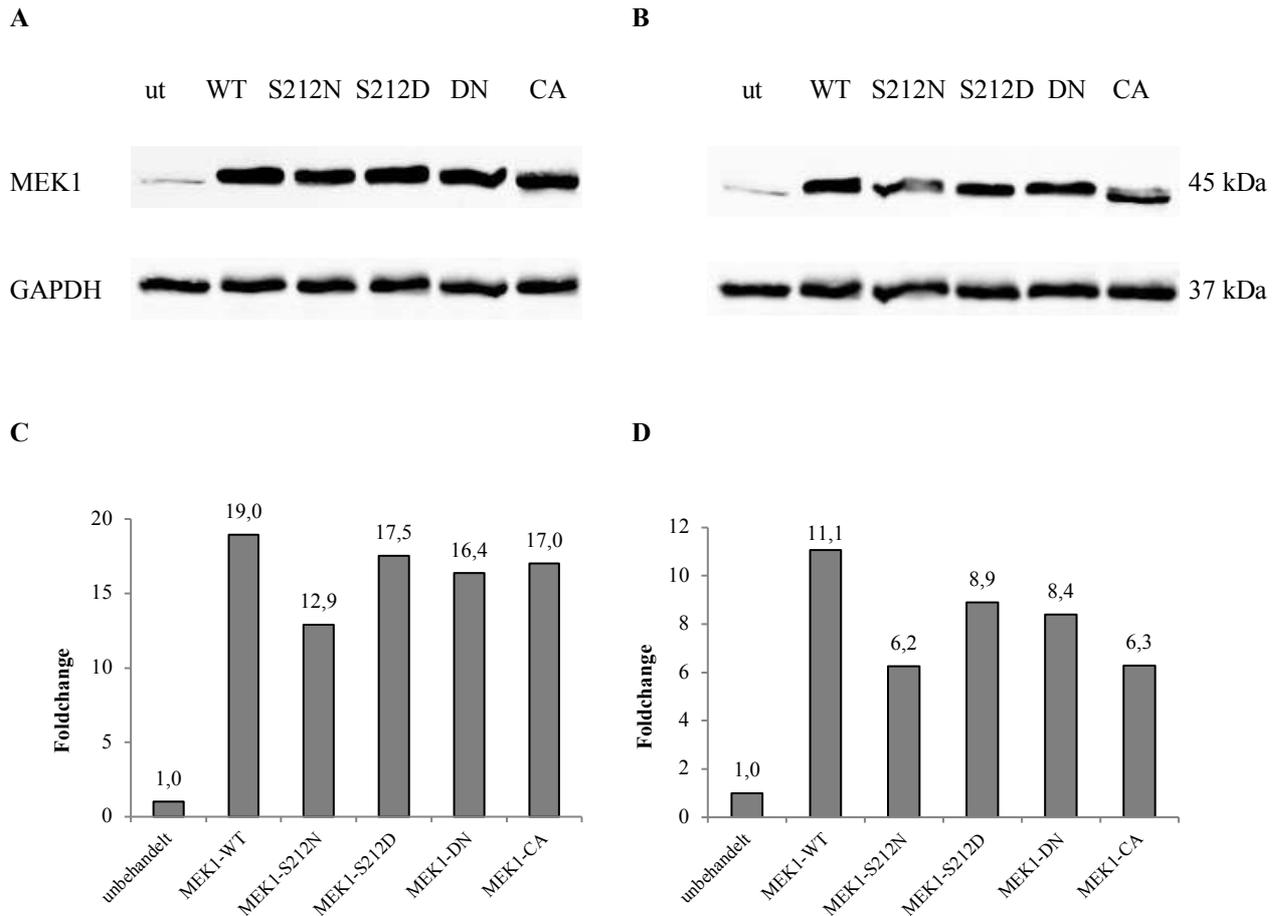


Abbildung 21: Relative MEK1-Proteinbiosynthese in 208F-Zellen 4 und 9 Tage nach lentiviraler Transduktion

Oben: Western Blot mit 25 µg Gesamtprotein, A) 4 Tage, B) 9 Tage nach lentiviraler Transduktion. Zur besseren Darstellung wurden die Aufnahmen der Fluoreszenz mittels digitaler Bildbearbeitung (IrfanView) kontrastiert.

ut: unbehandelt, WT: MEK1-WT, S212N: MEK1-S212N, S212D: MEK1-S212D, DN: MEK1-DN, CA: MEK1-CA.

Unten: C) Auswertung des Western Blots aus A, D) Auswertung des Western Blots aus B. Die Auswertung erfolgte mittels der Odyssey Software und Excel. Für die Berechnung der Proteinbiosynthese (Fold change) wurden die gemessenen Intensitäten für MEK1 durch GAPDH normiert und auf die Negativkontrolle bezogen.

unbehandelt: nichttransduzierte Zellen (Negativkontrolle)

5.3.2 Analyse der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2

Nachdem in allen transduzierten Zellen eine gesteigerte Synthese der MEK1-Proteinvarianten nachgewiesen werden konnte, sollte der Anteil an phosphoryliertem ERK1 und ERK2 in Hek293-Zellen überprüft werden, um einen Rückschluss auf die Aktivität der einzelnen MEK1-Proteinvarianten ziehen zu können. Die Proben zur p-ERK1/2-Analyse wurden zusammen mit den Proben für die MEK1-Analyse (in 5.3.1 dargestellte Blots) generiert. Als Negativkontrolle dienten auch hier nichttransduzierte Zellen und als Ladekontrolle wurde GAPDH gewählt.

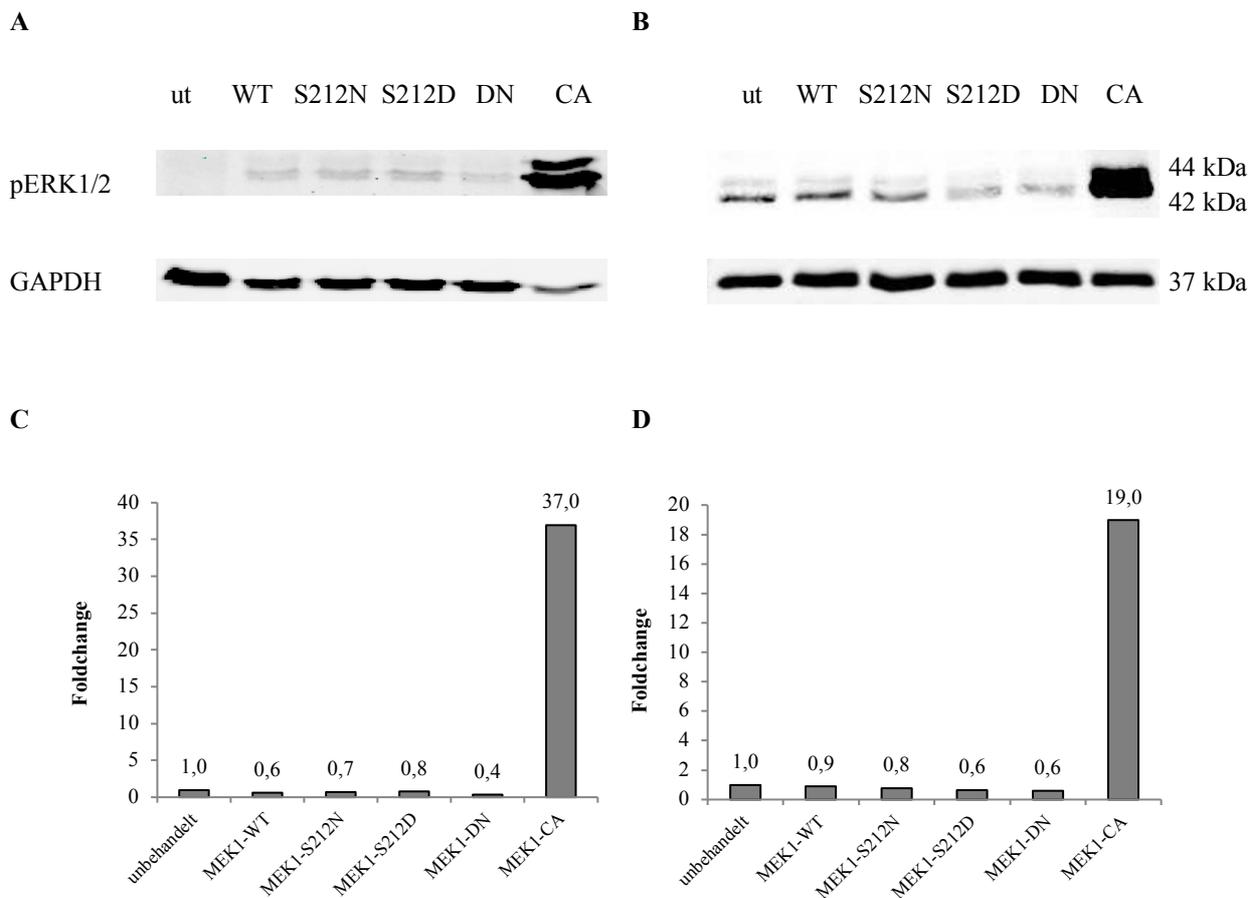


Abbildung 22: Relative p-ERK1/2-Proteinmenge in Hek293-Zellen 4 Tage nach lentiviraler Transduktion

Oben: Western Blot mit 25 µg Gesamtprotein, A) erste Population, B) zweite Population. Zur besseren Darstellung wurden die Aufnahmen der Fluoreszenz mittels digitaler Bildbearbeitung (IrfanView) kontrastiert.

ut: unbehandelt, WT: MEK1-WT, S212N: MEK1-S212N, S212D: MEK1-S212D, DN: MEK1-DN, CA: MEK1-CA.

Unten: C) Auswertung des Western Blots aus A, D) Auswertung des Western Blots aus B. Die Auswertung erfolgte mittels der Odyssey Software und Excel. Für die Berechnung der Proteinmengen (Fold change) wurden die gemessenen Intensitäten für pERK1/2 durch GAPDH normiert und auf die Negativkontrolle bezogen.

unbehandelt: nichttransduzierte Zellen (Negativkontrolle).

Wie in Abbildung 22 erkennbar, ergab der Western Blot für p-ERK1 und p-ERK 2 lediglich in den mit dem EF1-MEK1-CA-IRES-GFP-Plasmid transduzierten Zellen erhöhte Werte. Der fold change betrug 37 für die erste Population und 19 für die zweite Population. In allen anderen MEK1-Konstrukt-tragenden Zellen waren keine signifikant erhöhten Level erkennbar. Der erhöhte Anteil an p-ERK1 und p-ERK2 in der Probe des MEK1-CA-Konstrukts erklärt sich durch die erhöhte Aktivität des mutierten MEK1 und stellt für den Vergleich mit den anderen Konstrukten eine Positivkontrolle dar.

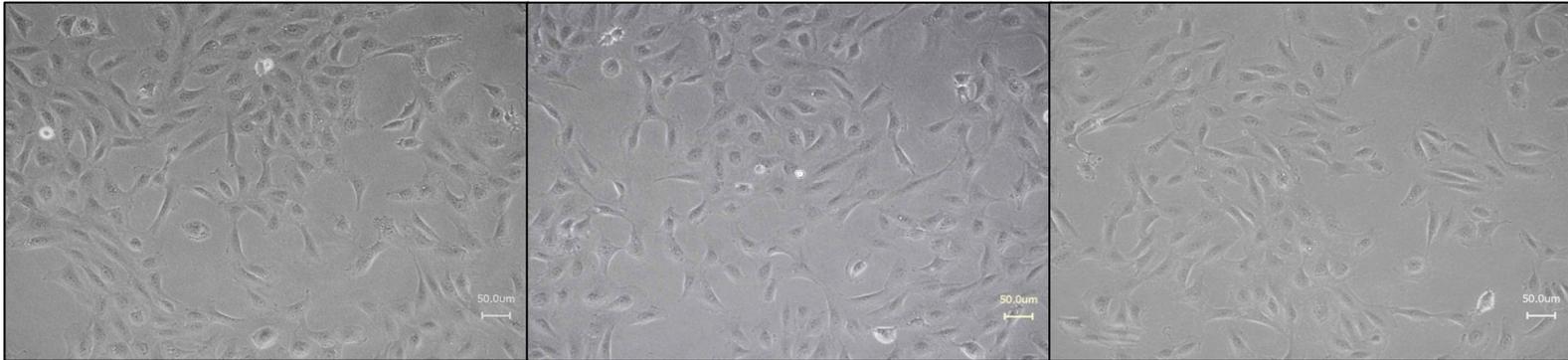
5.4 Morphologische Eigenschaften der *MEK1^{S212N}*-tragenden 208F-Zellen

Zur Beobachtung morphologischer Veränderungen wurden die 208F-Zellen 48 h im Anschluss an die Infektion mit den lentiviralen Partikeln und über mehrere Tage im Mikroskop beobachtet. Die optimale Konfluenz der Zellen zur Dokumentation war jeweils nach drei und nach sieben Tagen erreicht und betrug zwischen 50 und 80 %. Als Negativkontrolle dienten nichttransduzierte Zellen. Als Positivkontrolle kam die Population zum Einsatz, die mit dem MEK1-CA-Konstrukt transduziert wurde. Da diese Zellen ein konstitutiv aktives MEK1 synthetisierten, wurde davon ausgegangen, dass erhöhte p-ERK1/2-Level hier eine morphologische Änderung nach sich ziehen würden.

A Negativkontrolle, unbehandelt

B MEK1-WT

C MEK1-S212N



D MEK1-S212D

E MEK1-DN

F MEK1-CA

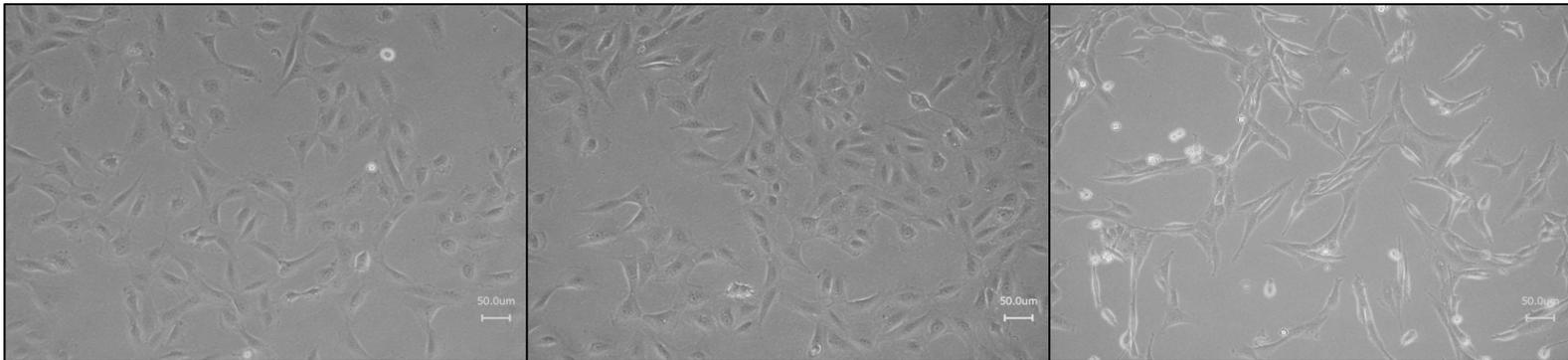


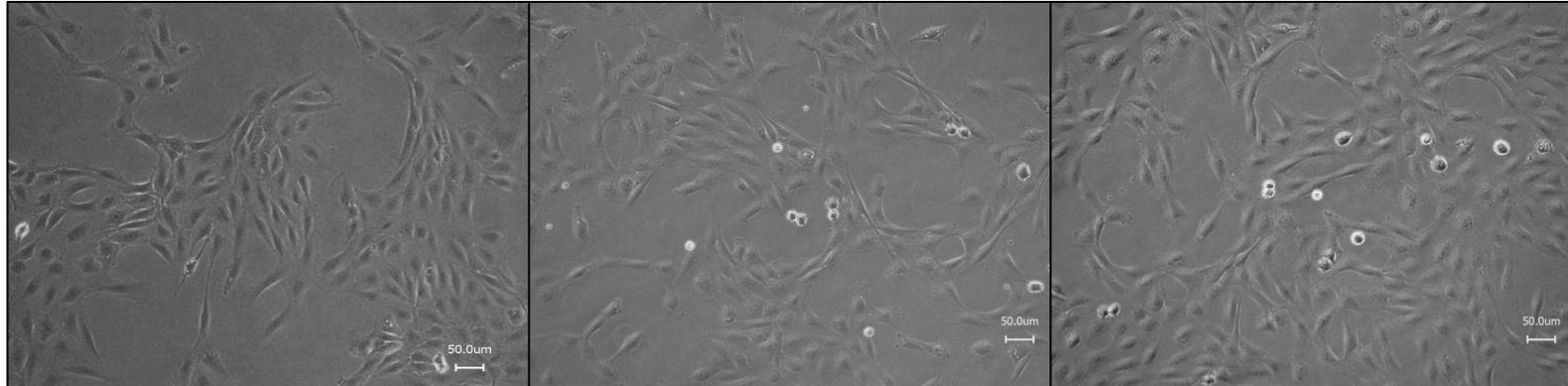
Abbildung 23: Morphologie der 208F-Zellen 3 Tage nach lentiviraler Transduktion

A–F): Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen der mit den verschiedenen MEK1-Konstrukten transduzierten 208F-Populationen und der Negativkontrolle. Zur besseren Darstellung wurden die Aufnahmen mittels digitaler Bildbearbeitung (IrfanView) kontrastiert. (Maßstabballen: 50 µm)

A Negativkontrolle, unbehandelt

B MEK1-WT

C MEK1-S212N



D MEK1-S212D

E MEK1-DN

F MEK1-CA

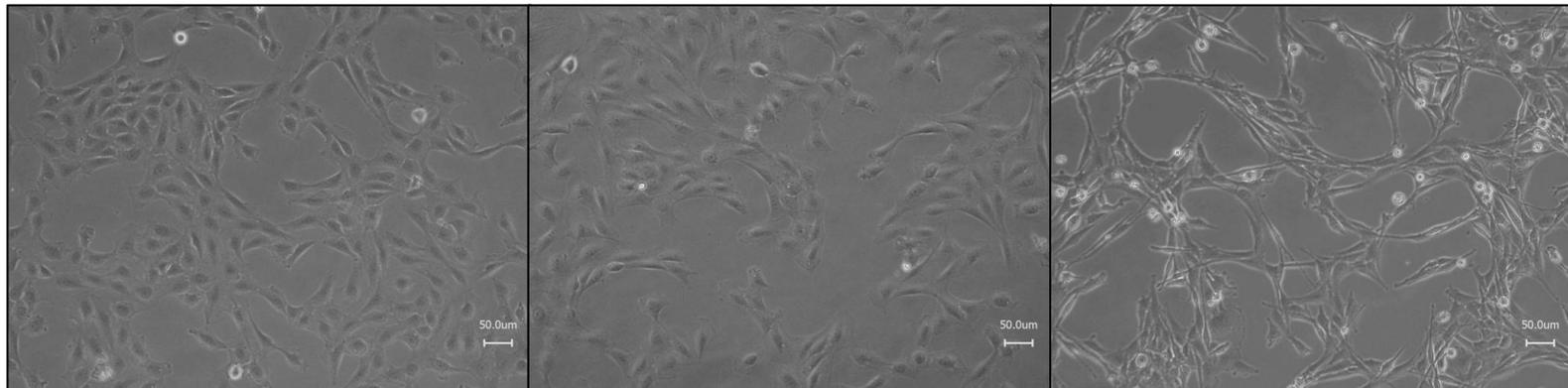


Abbildung 24: Morphologie der 208F-Zellen 7 Tage nach lentiviraler Transduktion

A–F): Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen der mit den verschiedenen MEK1-Konstrukten transduzierten 208F-Populationen und der Negativkontrolle. Zur besseren Darstellung wurden die Aufnahmen mittels digitaler Bildbearbeitung (IrfanView) kontrastiert.

(Maßstab Balken: 50 µm)

Wie in den Abbildungen 23 und 24 erkennbar, zeigte sich bei allen zu untersuchenden Populationen, die nicht zur Kontrolle dienten, die gleiche Morphologie wie bei den nichttransduzierten Zellen. Die Rattenfibroblasten der Negativkontrolle (Abbildungen 23.A und 24.A) zeigten einen großen, spindelförmigen bis dreieckigen Zellkörper und bildeten untereinander Netzstrukturen mit kurzen Zellfortsätzen aus. Die Rattenfibroblasten der Populationen mit dem MEK1-S212N- und dem MEK1-S212D-Konstrukt (Abbildungen 23.C–D und 24.C–D) hatten die typische Form der 208F-Zellen nicht erkennbar verändert. Die Veränderungen in der Positivkontrolle (Abbildungen 23.F und 24.F) äußerten sich vorwiegend durch vergrößerte Lücken im Zellverband, langgestreckte Zellkörper mit Verschmälerung des Zentrums und spitz zulaufende Membranausläufer. Bei den außerdem erkennbaren kugelig/sphärisch erscheinenden Zellen handelte es sich um abgestorbene 208F-Zellen, die im Medium schwammen und bei der Mikroskopie die Zellen am Boden optisch überlagerten. Alle genannten Morphologieänderungen waren in der Negativkontrolle und den übrigen Konstruktträgern nicht zu finden. Auf eine Auszählung der veränderten Zellen wurde verzichtet.

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die in der Kolonkarzinomzelllinie LIM1215 gefundene *MEK1^{S212N}*-Mutation hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz unter Darmkrebspatienten zu ermitteln und ihre Auswirkungen auf die biochemische Funktion des Signalwegs und dadurch induzierte zellmorphologische Änderungen zu untersuchen. Daraus sollten Rückschlüsse auf die Bedeutung der Mutation für die kolorektalen Karzinome gezogen werden.

Dabei konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, dass *MEK1^{S212N}* vereinzelt unter kolorektalen Karzinomen aufzufinden ist. Mit den gewählten Methoden konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass diese Mutation zu einem messbaren Anstieg von phosphoryliertem ERK1 oder ERK2 führt. Eine morphologische Transformation der mutationstragenden Zellen war im Rahmen der gewählten Zellsysteme ebenso nicht nachweisbar.

6.2 Kritische Betrachtung der Ergebnisse

Wertung der Sanger-Sequenzierung

Die in Kapitel 5.1 gezeigte Vorwärtssequenzierung nach Sanger (Abbildung 8) weist an Aminosäurenstelle 212 (entspricht der Nukleotidposition 1110 im *MEK1*-Gen) drei verschiedenfarbige Peaks in der Sanger-Sequenz auf. Dies deutet auf das Vorhandensein dreier DNA-Basen hin. Neben den Zielzellen könnte die Probe in diesem Fall mit anderen, nicht die Mutation tragenden Zellen verunreinigt worden sein oder die Sequenzierung nicht korrekt verlaufen sein. Es ist in Betracht zu ziehen, dass die Proben im Labor der Arbeitsgruppe kontaminiert worden sein könnten. Dies könnte durch Verunreinigungen bei der Amplifikation der Proben durch im Labor vorhandene Nukleotidsequenzen der Plasmide oder PCR-Produkte bei der Klonierung geschehen sein, auch wenn alle Arbeiten mit großer Sorgfalt durchgeführt worden sind. Somit besteht die Möglichkeit, dass es sich bei dem Nachweis der Mutation im erwähnten Patientenmaterial um ein falsch-positives Ergebnis handelt. Zum Ausschluss solcher Kontaminationen wäre es sinnvoll, Patientenmaterial und geeignete Primer in einem anderen Labor für die Sanger-Sequenzierung vorzubereiten und erneut zu sequenzieren.

Zur Validierung der Ergebnisse wurden jedoch sowohl der rückwärtige DNA-Strang desselben Patientenmaterials sequenziert als auch eine weitere Materialentnahme mit anschließender Sequenzierung nach Sanger mit anderen Primern durchgeführt. Für diese zweite Sequenzierung konnte die Heterozygotie für die *MEK1^{S212N}*-Mutation bestätigt werden. Auch hier kann die

Möglichkeit der Verunreinigung bestehen, da auch diese Proben im Labor der Arbeitsgruppe vorbereitet worden sind.

Zusammenhang zwischen Plasmidexpression und Fluoreszenz

In der Fluoreszenzmikroskopie fiel auf, dass die Fluoreszenz derjenigen Hek293-Populationen deutlich geringer war, deren transduziertes Plasmid das Transgen (MEK1-Variante) enthielt. In der Positivkontrolle hingegen, die ebenfalls mit lentiviralen Partikeln transduziert worden war, konnte in der Fluoreszenzmikroskopie ein deutliches Leuchten detektiert werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass in allen MEK1-tragenden Zellen weniger GFP synthetisiert worden ist als in der Positivkontrolle. Innerhalb der MEK1-tragenden Gruppe waren keine deutlichen Unterschiede in der GFP-Produktion zwischen den einzelnen Varianten zu erkennen. Da die Positivkontrolle eine deutliche Fluoreszenz aufwies, kann die Methode der lentiviralen Transduktion als erfolgreich gewertet werden. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlich starke Fluoreszenz ist, dass die Effizienz der Virusproduktion durch die größeren Plasmide, die die MEK-Sequenzen tragen, reduziert wurde und somit eine geringere Integration des Transgens innerhalb der Hek293-Zellen vermittelt werden konnte.

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie ließ sich demnach lediglich eine ungenaue Aussage darüber treffen, in welchem Maße die Zellen transduziert worden sind, auch wenn die Positivkontrolle deutlich mehr Fluoreszenz aufwies. Daher stellte die manuelle Auszählung der leuchtenden Zellen keine Option zur quantitativen Bestimmung der Transduktionseffizienz dar. Aus diesem Grund wurde zur besseren Analyse der Fluoreszenz eine Auswertung mittels FACS gewählt.

Die FACS-Analyse bestätigte, dass in den Hek293-Mutanten weniger GFP vorhanden war als in der Positivkontrolle. Dennoch war in allen transduzierten Zellreihen eine signifikant erhöhte Fluoreszenz gegenüber der Negativkontrolle detektierbar (siehe Abbildungen 17 und 18).

Interpretation von MEK1-Proteinbiosynthese und ERK-Aktivierung

Die mittels SDS-Page bzw. Western Blot ermittelte Überproduktion von MEK1 in den transduzierten Zellpopulationen bestätigte, dass alle Plasmide zur Expression des Transgens führten. Lediglich die gesteigerte Proteinbiosynthese von MEK1-CA entsprach nicht den Erwartungen. Allerdings konnte auf Basis der vorliegenden Daten keine eindeutige Erkenntnis darüber gewonnen werden, ob dies Ausdruck einer starken Überexpression von MEK1-CA oder einer verstärkt ablaufenden Signalkaskade war, einen Mangel an negativer Regulierung der MEK1-Mutante darstellte oder auf mRNA-Ebene eine Stabilisierung erfolgte.

Die für p-ERK1/2 ermittelten Werte wiesen darauf hin, dass in den transduzierten Zellen – mit Ausnahme der MEK1-CA-Mutante – keine verstärkte ERK1/2-Aktivierung in Form von detektierbarem pERK1/2 erfolgte. Der oben beschriebene Zusammenhang zwischen dem Aufbau der MEK1-CA-Mutante und ihrer Fähigkeit, vermehrt ERK zu aktivieren, ohne dabei einer negativen Rückkopplung zu unterliegen, könnte auch den deutlichen Anstieg von phosphoryliertem ERK1/2 erklären.

Zusammenhang zwischen Mutation und Morphologie der Zellen

In der Zellkultur fiel auf, dass unter allen mutierten Zellpopulationen lediglich die Population der MEK1-CA-Mutante Veränderungen im Wachstumsverhalten aufwies. Zudem mussten die Proben mit dieser Mutation häufiger gesplittet werden, weil die Konfluenz der Zellen deutlich schneller anstieg als die der anderen Populationen. Dieses – wenn auch hier nicht dokumentierte – gesteigerte Wachstum lässt sich durch die vermehrte Aktivierung von ERK1/2 und die damit beschleunigte Proliferation erklären. Das Wachstum der anderen Populationen zeigte keine Auffälligkeiten.

In der Lichtmikroskopie konnten keine morphologischen Abweichungen der mutierten Populationen – mit Ausnahme der MEK1-CA-Mutante (Positivkontrolle) – von der Zellmorphologie der Negativkontrolle nachgewiesen werden.

6.3 Methodische Limitationen und Anregungen zur Optimierung/Weiterführung

Auswahl der Zelllinien

Hek293 wurde als Zelllinie für die biochemischen Untersuchungen ausgewählt, weil sie unstimuliert nur geringe Mengen an phosphorylierten ERK1 und ERK2 aufweist und zugleich für die Einschleusung fremder DNA in Form von Transfektion und viraler Transduktion geeignet ist. Allerdings weisen die Zellen zwar eine niedrige, aber immer noch eine detektierbare Menge von phosphoryliertem ERK1 und ERK2 auf. Für eine sensitivere Darstellung möglicher Erhöhungen des phosphorylierten ERK1- und ERK2-Levels wäre es daher sinnvoll, andere Zelllinien zu wählen, bei denen die Mengen an phosphorylierten ERK1 und ERK2 noch geringer sind oder gar nicht detektierbar sind.

Zudem sollte überlegt werden, ob bei der Verwendung von Kolonzellreihen, die das Zielgewebe deutlich besser repräsentieren als Hek293-Zellen, eine bessere Annäherung an die Natur stattfinden würde. Somit ist für weiterführende Arbeiten zu empfehlen, die vorgestellte Mutation in einem Kolonmodell zu untersuchen. Die Zellreihe LIM1215 ist zwar sowohl der Ursprung der Mutation als auch eine Kolonzellreihe, jedoch ist sie durch das Auftreten mehrerer Mutationen

für die explizite und ungestörte Analyse der biochemischen und morphologischen Eigenschaften von *MEK1^{S212N}* nicht geeignet. Ein neues, reines Kolonmodell – beispielsweise eine Organoidkultur des Normalgewebes – würde sich hingegen eignen.

Optimierung der lentiviralen Transduktion und Herstellung stabiler Zellreihen

Um eine weitere Optimierung der lentiviralen Transduktion zu erreichen, könnten verschiedene Verpackungsplasmide untersucht werden. Da die Plasmide mit dem MEK1-Gen deutlich größer waren als das Kontrollplasmid, das nur die IRES und das copGFP-Gen enthielt, sollte für zukünftige Arbeiten in Erwägung gezogen werden, ein anderes Verpackungssystem, das größere Plasmide effizienter aufnehmen kann, vorzuziehen.

Weiterhin könnte durch Anwendung eines Antibiotikumresistenzgens eine bessere Ausbeute an Zellen mit Transgenexpression erreicht werden, da so die transduzierten Zellen selektiert werden könnten.

Schließlich sollten die Generierung und Untersuchung eines Maus-Modells in Betracht gezogen werden. Durch das Einschleusen der Mutation in einen funktionierenden Organismus könnten realistische Bedingungen für das eventuelle Wachstum eines Tumors geschaffen werden. Jedoch ist ethisch abzuwägen, ob der Einsatz von Versuchstieren gerechtfertigt wäre.

6.4 Klinische Einordnung und Bedeutung für die Forschung

Die in dieser Arbeit untersuchte *MEK1^{S212N}*-Mutation hatte mit den ausgesuchten Methoden in den gewählten Modellen keine signifikante Auswirkung auf nachfolgende Prozesse im MAPK-Signalweg. Dennoch ist vorstellbar, dass eine Konformationsänderung im Molekül Folgen für die Wirksamkeit von Inhibitoren haben kann.

6.5 Schlussfolgerung

Anhand der hier vorgestellten Daten wurde die *MEK1^{S212N}*-Mutation in einzelnen Karzinomen nachgewiesen. Es konnte jedoch keine Veränderung der Signalwegaktivität oder Veränderung der Zellmorphologie durch eine Expression dieser Mutation belegt werden. Die Relevanz für die betroffenen Zellen und das Gewebe bleibt daher unklar.

7 Literaturverzeichnis

Arkun Y & Mohammadreza Y; Thattai, Mukund (Hrsg.) (2018): Dynamics and control of the ERK signaling pathway: Sensitivity, bistability, and oscillations, in: PLOS ONE, Jg. 13, Nr. 4, e0195513, doi: 10.1371/journal.pone.0195513.

Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Di Giacomo AM, Mandalà M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, De la Cruz-Merino L, Dutriaux C, Garbe C, Yan Y, Wongchenko M, Chang I, Hsu JJ, Koralek DO, Rooney I, Ribas A & Larkin J (2016): Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAFV600-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial, in: The Lancet Oncology, Jg. 17, Nr. 9, S. 1248–1260, doi: 10.1016/S1470-2045(16)30122-X.

Bentivegna S, Zheng J, Namsaraev E, Carlton VEH, Pavlicek A, Moorhead M, Siddiqui F, Wang Z, Lee L, Ireland JS, Suyenaga K, Willis TD, Faham M & Seymour AB (2008): Rapid identification of somatic mutations in colorectal and breast cancer tissues using mismatch repair detection (MRD), in: Human Mutation, Jg. 29, Nr. 3, S. 441–450, doi: 10.1002/humu.20672.

Birnboim HC & Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, in: Nucleic Acids Research, Jg. 7, Nr. 6, S. 1513–1523, doi: 10.1093/nar/7.6.1513.

Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K & Hirth P (2012): Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer, in: Nature Reviews Drug Discovery, Jg. 11, Nr. 11, S. 873–886, doi: 10.1038/nrd3847.

Bromberg-White JL, Andersen NJ & Duesbery NS (2012): MEK genomics in development and disease, in: Briefings in Functional Genomics, Jg. 11, Nr. 4, S. 300–310, doi: 10.1093/bfpg/els022.

Brown SR, Hall A, Buckley HL, Flanagan L, Gonzalez de Castro D, Farnell K, Moss L, Gregory R, Newbold K, Du Y, Flux G, & Wadsley J (2019): Investigating the potential clinical benefit of Selumetinib in resensitising advanced iodine refractory differentiated thyroid cancer to

radioiodine therapy (SEL-I-METRY): protocol for a multicentre UK single arm phase II trial, in: *BMC Cancer*, Jg. 19, Nr. 1, S. 582, doi: 10.1186/s12885-019-5541-4.

Brunet A, Pages G & Pouyssegur J (1994): Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1), in: *FEBS Letters*, Jg. 346, Nr. 2–3, S. 299–303, doi: 10.1016/0014-5793(94)00475-7.

Buscà R, Pouyssegur J & Lenormand P (2016): ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy?, in: *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Jg. 4, Nr. 53, doi: 10.3389/fcell.2016.00053.

Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA & McCubrey JA (2003): Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention, in: *Leukemia*, Jg. 17, Nr. 7, S. 1263–1293, [online] <https://www.nature.com/articles/2402945.pdf>.

Cox VL, Saeed Bamashmos AA, Foo WC, Gupta S, Yedururi S, Garg N & Kang HC (2018): Lynch Syndrome: Genomics Update and Imaging Review, in: *RadioGraphics*, Jg. 38, Nr. 2, S. 483–499, doi: 10.1148/rg.2018170075.

Danna K & Nathans D (1971): Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 68, Nr. 12, S. 2913–2917, doi: 10.1073/pnas.68.12.2913.

Dombi E, Baldwin A, Marcus LJ, Fisher MJ, Weiss B, Kim A, Whitcomb P, Martin S, Aschbacher-Smith LE, Rizvi TA, Wu J, Ershler R, Wolters P, Therrien J, Glod J, Belasco JB, Schorry E, Brofferio A, Starosta AJ, Gillespie A, Doyle AL, Ratner N & Widemann BC (2016): Activity of Selumetinib in Neurofibromatosis Type 1–Related Plexiform Neurofibromas, in: *New England Journal of Medicine*, Jg. 375, Nr. 26, S. 2550–2560, doi: 10.1056/nejmoa1605943.

Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandala M, Liskay G, Garbe C, Schadendorf D, Krajsova I, Gutzmer R, Chiarion-Sileni V, Dutriaux C, de Groot JW, Yamazaki N, Loquai C, Moutouh-de Parseval LA, Pickard MD, Sandor V, Robert C & Flaherty KT (2018): Encorafenib

plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF -mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial, in: *The Lancet Oncology*, Jg. 19, Nr. 5, S. 603–615, doi: 10.1016/S1470-2045(18)30142-6.

Estep AL, Palmer C, McCormick F & Rauen KA; Toland, Amanda (Hrsg.) (2007): Mutation Analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 Ovarian Cancer Cell Lines: Implications for Therapy, in: *PLoS ONE*, Jg. 2, Nr. 12, e1279, doi: 10.1371/journal.pone.0001279.

Fearon ER & Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis, in: *Cell*, Jg. 61, Nr. 5, S. 759–767, doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-i.

Fischmann TO, Smith CK, Mayhood TW, Myers JE, Reichert P, Mannarino A, Carr D, Zhu H, Wong J, Yang RS, Le HV & Madison VS (2009): Crystal Structures of MEK1 Binary and Ternary Complexes with Nucleotides and Inhibitors, in: *Biochemistry*, Jg. 48, Nr. 12, S. 2661–2674, doi: 10.1021/bi801898e.

Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N, Kudchadkar R, Burris III HA, Falchook G, Algazi A, Lewis K, Long GV, Puzanov I, Lebowitz P, Singh A, Little S, Sun P, Allred A, Ouellet D, Kim KB, Patel K & Weber J (2012a): Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations, in: *New England Journal of Medicine*, Jg. 367, Nr. 18, S. 1694–1703, doi: 10.1056/NEJMoa1210093.

Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JMG, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton MR, Becker JC, Casey M, Sherman LJ, Wu FS, Ouellet D, Martin AM, Patel K & Schadendorf D (2012b): Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma, in: *New England Journal of Medicine*, Jg. 367, Nr. 2, S. 107–114, doi: 10.1056/NEJMoa1203421.

Fukuda M (1997): Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase, in: *The EMBO Journal*, Jg. 16, Nr. 8, S. 1901–1908, doi: 10.1093/emboj/16.8.1901.

Fukui K (2010): DNA Mismatch Repair in Eukaryotes and Bacteria, in: *Journal of Nucleic Acids*, Jg. 2010, S. 1–16, doi: 10.4061/2010/260512.

Gao Y, Maria A, Na N, Da Cruz Paula AF, Gorelick AN, Hechtman JF, Carson J, Lefkowitz RA, Weigelt B, Taylor BS, Zhao H, Reis-Filho JS, de Stanchina E, Rosen N, Yao Z & Yaeger R (2019): V211D Mutation in MEK1 Causes Resistance to MEK Inhibitors in Colon Cancer, in: *Cancer Discovery*, Jg. 9, Nr. 9, S. 1182–1191, doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0356.

Gopalbhai K, Jansen G, Beauregard G, Whiteway M, Dumas F, Wu C & Meloche S (2002): Negative Regulation of MAPKK by Phosphorylation of a Conserved Serine Residue Equivalent to Ser212 of MEK1, in: *Journal of Biological Chemistry*, Jg. 278, Nr. 10, S. 8118–8125, doi: 10.1074/jbc.M211870200.

Graham FL, Russell WC, Smiley J & Nairn R (1977): Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5, in: *Journal of General Virology*, Jg. 36, Nr. 1, S. 59–72, doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59.

Hanahan D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, in: *Journal of Molecular Biology*, Jg. 166, Nr. 4, S. 557–580, doi: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.

Hanahan D & Weinberg RA (2000): The Hallmarks of Cancer, in: *Cell*, Jg. 100, Nr. 1, S. 57–70, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

Hao YH, Wang Y, Burdette D, Mukherjee S, Keitany G, Goldsmith E & Orth K; Kobe, Bostjan (Hrsg.) (2008): Structural Requirements for *Yersinia* YopJ Inhibition of MAP Kinase Pathways, in: *PLoS ONE*, Jg. 3, Nr. 1, e1375, doi: 10.1371/journal.pone.0001375.

Ho AL, Grewal RK, Leboeuf R, Sherman EJ, Pfister DG, Deandreis D, Pentlow KS, Zanzonico PB, Haque S, Gavane S, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Domínguez JM, Shen R, Tuttle RM, Larson SM & Fagin JA (2013): Selumetinib-Enhanced Radioiodine Uptake in Advanced Thyroid Cancer, in: *New England Journal of Medicine*, Jg. 368, Nr. 7, S. 623–632, doi: 10.1056/NEJMoa1209288.

Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-I S, Wada H, Fujimoto J & Kohno M (1999): Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors, in: *Oncogene*, Jg. 18, Nr. 3, S. 813–822, doi: 10.1038/sj.onc.1202367.

Hsieh P & Yamane K (2008): DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing, in: *Mechanisms of Ageing and Development*, Jg. 129, Nr. 7–8, S. 391–407, doi: 10.1016/j.mad.2008.02.012.

Jacobsen H, Klenow H & Overgaard-Hansen K (1974): The N-Terminal Amino-Acid Sequences of DNA Polymerase I from *Escherichia coli* and of the Large and the Small Fragments Obtained by a Limited Proteolysis, in: *European Journal of Biochemistry*, Jg. 45, Nr. 2, S. 623–627, doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03588.x.

Jindal GA, Goyal Y, Humphreys JM, Yeung E, Tian K, Patterson VL, He H, Burdine RD, Goldsmith EJ & Shvartsman SY (2017): How activating mutations affect MEK1 regulation and function, in: *Journal of Biological Chemistry*, Jg. 292, Nr. 46, S. 18814–18820, doi: 10.1074/jbc.c117.806067.

Karnoub AE & Weinberg RA (2008): Ras oncogenes: split personalities, in: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Jg. 9, Nr. 7, S. 517–531, doi: 10.1038/nrm2438.

Katz M, Amit I & Yarden Y (2007): Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases, in: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Jg. 1773, Nr. 8, S. 1161–1176, doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.01.002.

Kinzler KW & Vogelstein B (1996): Lessons from Hereditary Colorectal Cancer, in: *Cell*, Jg. 87, Nr. 2, S. 159–170, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81333-1.

Kolch W (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions, in: *Biochemical Journal*, Jg. 351, Nr. 2, S. 289–305, [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1221363/pdf/11023813.pdf>.

Laemmli UK (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, in: *Nature*, Jg. 227, Nr. 5259, S. 680–685, doi: 10.1038/227680a0.

Lebkowski JS, Clancy S & Calos MP (1985): Simian virus 40 replication in adenovirus-transformed human cells antagonizes gene expression, in: *Nature*, Jg. 317, Nr. 6033, S. 169–171, doi: 10.1038/317169a0.

Legouill C, Parent JL, Rolapleszczynski M & Stankova J (1994): Analysis of Recombinant Plasmids by a Modified Alkaline Lysis Method, in: *Analytical Biochemistry*, Jg. 219, Nr. 1, S. 164, doi: 10.1006/abio.1994.1250.

Lemieux E, Bergeron S, Durand V, Asselin C, Saucier C & Rivard N (2009): Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis, in: *International Journal of Cancer*, Jg. 125, Nr. 7, S. 1575–1586, doi: 10.1002/ijc.24485.

Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, De Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, Chiarion-Sileni V, Lebbe C, Mandalà M, Millward M, Arance A, Bondarenko I, Haanen JB, Hansson J, Utikal J, Ferraresi V, Kovalenko N, Mohr P, Probachai V, Schadendorf D, Nathan P, Robert C, Ribas A, DeMarini DJ, Irani JG, Casey M, Ouellet D, Martin AM, Le N, Patel K & Flaherty K (2014): Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma, in: *New England Journal of Medicine*, Jg. 371, Nr. 20, S. 1877–1888, doi: 10.1056/NEJMoa1406037.

Mansour SJ, Candia JM, Gloor KK & Ahn NG (1996): Constitutively Active Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1 (MAPKK1) and MAPKK2 Mediate Similar Transcriptional and Morphological Responses, in: *Cell Growth & Differentiation*, Jg. 7, Nr. 2, S. 243–250, [online] <https://pdfs.semanticscholar.org/2e53/b0e9047f881bf17f386136e13beb505410ce.pdf>.

Markowitz SD & Bertagnolli MM (2009): Molecular Basis of Colorectal Cancer, in: *New England Journal of Medicine*, Jg. 361, Nr. 25, S. 2449–2460, doi: 10.1056/NEJMra0804588.

Marks JL, Gong Y, Chitale D, Golas B, McLellan MD, Kasai Y, Ding L, Mardis ER, Wilson RK, Solit D, Levine R, Michel K, Thomas RK, Rusch VW, Ladanyi M & Pao W (2008): Novel

MEK1 Mutation Identified by Mutational Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway Genes in Lung Adenocarcinoma, in: *Cancer Research*, Jg. 68, Nr. 14, S. 5524–5528, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0099.

Meloche S & Pouyssegur J (2007): The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition, in: *Oncogene*, Jg. 26, Nr. 22, S. 3227–3239, doi: 10.1038/sj.onc.1210414.

Murugan AK, Dong J, Xie J & Xing M (2009): MEK1 mutations, but not ERK2 mutations, occur in melanomas and colon carcinomas, but none in thyroid carcinomas, in: *Cell Cycle*, Jg. 8, Nr. 13, S. 2122–2124, doi: 10.4161/cc.8.13.8710.

Nandan MO & Yang VW (2011): An Update on the Biology of RAS/RAF Mutations in Colorectal Cancer, in: *Current Colorectal Cancer Reports*, Jg. 7, Nr. 2, S. 113–120, doi: 10.1007/s11888-011-0086-1.

Nikolaev SI, Rimoldi D, Iseli C, Valsesia A, Robyr D, Gehrig C, Harshman K, Guipponi M, Bukach O, Zoete V, Michielin O, Muehlethaler K, Speiser D, Beckmann JS, Xenarios I, Halazonetis TD, Jongeneel CV, Stevenson BJ & Antonarakis SE (2011): Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma, in: *Nature Genetics*, Jg. 44, Nr. 2, S. 133–139, doi: 10.1038/ng.1026.

Nowell P (1976): The clonal evolution of tumor cell populations, in: *Science*, Jg. 194, Nr. 4260, S. 23–28, doi: 10.1126/science.959840.

Orton RJ, Sturm OE, Vysheirsky V, Calder M, Gilbert DR & Kolch W (2005): Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway, in: *Biochemical Journal*, Jg. 392, Nr. 2, S. 249–261, doi: 10.1042/BJ20050908.

Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland Å, Giannone V, D'Amelio AM Jr, Zhang P, Mookerjee B & Johnson BE (2017): Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial, in: *The Lancet Oncology*, Jg. 18, Nr. 10, S. 1307–1316, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30679-4.

Rodriguez-Viciano P (2006): Germline Mutations in Genes Within the MAPK Pathway Cause Cardio-facio-cutaneous Syndrome, in: *Science*, Jg. 311, Nr. 5765, S. 1287–1290, doi: 10.1126/science.1124642.

Sachs AB, Sarnow P & Hentze MW (1997): Starting at the Beginning, Middle, and End: Translation Initiation in Eukaryotes, in: *Cell*, Jg. 89, Nr. 6, S. 831–838, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80268-8.

Sasaki H, Hikosaka Y, Kawano O, Moriyama S, Yano M & Fujii Y (2010): MEK1 and AKT2 Mutations in Japanese Lung Cancer, in: *Journal of Thoracic Oncology*, Jg. 5, Nr. 5, S. 597–600, doi: 10.1097/JTO.0b013e3181d35236.

Schaefer R, Iyer J, Iten E & Nirkko AC (1988): Partial reversion of the transformed phenotype in HRAS-transfected tumorigenic cells by transfer of a human gene., in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 85, Nr. 5, S. 1590–1594, doi: 10.1073/pnas.85.5.1590.

Smith HO & Welcox KW (1970): A Restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*, in: *Journal of Molecular Biology*, Jg. 51, Nr. 2, S. 379–391, doi: 10.1016/0022-2836(70)90149-x.

Topp WC (1981): Normal rat cell lines deficient in nuclear thymidine kinase, in: *Virology*, Jg. 113, Nr. 1, S. 408–411, doi: 10.1016/0042-6822(81)90168-9.

Vogelstein B (1990): A deadly inheritance, in: *Nature*, Jg. 348, Nr. 6303, S. 681–682, doi: 10.1038/348681a0.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Smits AMM & Bos JL (1988): Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development, in: *New England Journal of Medicine*, Jg. 319, Nr. 9, S. 525–532, doi: 10.1056/NEJM198809013190901.

Vogelstein B & Kinzler KW(1993): The multistep nature of cancer, in: *Trends in Genetics*, Jg. 9, Nr. 4, S. 138–141, doi: 10.1016/0168-9525(93)90209-z.

Whitehead RH, Macrae FA, St John DJ & Ma J (1985): A Colon Cancer Cell Line (LIM1215) Derived From a Patient With Inherited Nonpolyposis Colorectal Cancer, in: Journal of the National Cancer Institute, Jg. 74, Nr. 4, S. 759–765, doi: 10.1093/jnci/74.4.759.

Xu BE, Stippec S, Robinson FL & Cobb MH (2001): Hydrophobic as Well as Charged Residues in Both MEK1 and ERK2 Are Important for Their Proper Docking, in: Journal of Biological Chemistry, Jg. 276, Nr. 28, S. 26509–26515, doi: 10.1074/jbc.M102769200.

Zheng CF & Guan KL (1994): Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues, in: The EMBO Journal, Jg. 13, Nr. 5, S. 1123–1131, [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC394921/pdf/emboj00053-0131.pdf>.

Fachbücher

Kumar V, Abbas AK, Aster JC & Perkins JA (2018): Robbins basic pathology, 10. Ausgabe, Philadelphia: Elsevier.

Rassow J, Hauser K, Netzker R & Deutzmann R (2006): Duale Reihe Biochemie, 1. Ausgabe, Stuttgart: Thieme.

Internetquellen

European Medicines Agency (2018): Public summary of opinion on orphan designation - Selumetinib for the treatment of neurofibromatosis type 1, [online] https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-designation/eu/3/18/2050-public-summary-opinion-orphan-designation-selumetinib-treatment-neurofibromatosis-type-1_en.pdf
[13.09.2020]

Gemeinsamer Bundesausschuss (2017): Anlage XII – Beschlüsse über die Nutzenbewertung von Arzneimitteln mit neuen Wirkstoffen nach § 35a SGB V – Trametinib (neues Anwendungsgebiet: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom), [online] https://www.g-ba.de/downloads/39-261-3095/2017-10-19_AM-RL-XII_Trametinib_D-284_BAnz.pdf
[13.09.2020]

Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (2016): Kurzfassung der Nutzenbewertung A15-40 (Trametinib in Kombination mit Dabrafenib sowie als Monotherapie), [online] https://www.iqwig.de/download/A15-40_Trametininib_Kurzfassung_Nutzenbewertung-35a-SGB-V.pdf [03.09.2020].

Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2019): Krebs in Deutschland für 2015/2016, 12. Ausgabe, Berlin, [online] https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile [04.09.2020].

Zu Abbildung 4: [online] <http://www.biomyx.net/Manual/pMEV-2HA.pdf> [03.09.2020].

Zu Abbildung 5: [online] <https://systembio.com/shop/pcdh-ef1%CE%B1-mcs-ires-gfp-cdna-single-promoter-cloning-and-expression-lentivector/> [03.09.2020].

Zu Abbildung 6: [online] <http://n2t.net/addgene:12260> [03.09.2020].

Zu Abbildung 7: [online] <http://n2t.net/addgene:12259> [03.09.2020].

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Anna Xylander, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse der Effekte der *MEK1^{S212N}*-Mutation hinsichtlich Signaltransduktion und Phänotyp in Rattenfibroblasten und HEK293-Zellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich erkläre, dass im Rahmen dieser Dissertation bisher keine Publikation entstanden ist.

Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Tabellarischer Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Nils Blüthgen, der mir nicht nur bei der Erstellung eine große Hilfe war, sondern mich auch immer wieder moralisch unterstützt und mir in schwierigen Phasen Mut gegeben hat.

Des Weiteren danke ich vor allem Dr. Raphaela Fritsche, die mich in den Anfängen und bei allen Experimenten begleitet hat.

Außerdem danke ich den stets freundlichen und hilfsbereiten Labormitarbeiterinnen für all die Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Für den emotionalen Rückhalt danke ich vor allem meinem Ehemann und meiner Familie, die mir, egal ob am Tage oder in der Nacht, mit viel Verständnis und lieben Worten in allen Phasen dieser Arbeit geholfen haben.