

Technische Universität München
Fakultät für Medizin

**Rekombinante Expression des humanen GTP-bindenden
Proteins rab31 in *E. coli*:
Herstellung und Charakterisierung von
polyklonalen rab31-Antikörpern**

Sonja Schäfer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Viktor Magdolen
2. Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 29.12.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2023 angenommen.

Zusammenfassung

Das Protein rab31 (*ras-related protein in brain 31*) gehört zur humanen rab-Familie, die aus 66 monomeren Guanosintriphosphat (GTP)-bindenden Proteinen besteht. Es spielt eine wichtige Rolle beim intrazellulären Vesikeltransport und bei der Organisation des Golgi-Apparates. Eine erhöhte rab31-mRNA-Expression bei Mammakarzinom-Patientinnen ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Zu Beginn dieser Arbeit war über die tumorbiologische Rolle von rab31 noch wenig bekannt. Ziel dieser Dissertation war die Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen rab31, die eine nähere Untersuchung von rab31 auf der Proteinebene erlauben.

Zunächst wurde die kodierende Sequenz einer rab31-cDNA in den Expressionsvektor pQE-30 kloniert, rekombinante rab31-Proteine mit einem N-terminalen Histidin-*tag* (rab31-His) in *E. coli* produziert und über Ni²⁺-NTA-Agarose affinitätschromatographisch gereinigt. Zusätzlich zu rab31-His wurde rab31 auch als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (GST-rab31) in *E. coli* rekombinant exprimiert und mittels Glutathion-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach der Immunisierung mehrerer Kaninchen und Hühner mit dem rab31-His-Protein als Antigen (in Kooperation mit Pineda®-Antikörperservice Berlin) erfolgte die Charakterisierung der Antikörper durch verschiedene immunologische Methoden (*one-sided* ELISA, *sandwich*-ELISA und Westernblot). Alle nach der Immunisierung gewonnenen Tierseren und Eidotter reagierten sowohl in Westernblot- als auch in ELISA-Analysen spezifisch mit GST-rab31 und rab31-His. Vor allem der polyklonale Antikörper aus Kaninchen Tier 3, der als RT3-IgG bezeichnet wird, zeigte eine starke Reaktion mit dem rab31-Antigen, während er nicht bzw. äußerst schwach mit den sehr nah verwandten Proteinen rab5 und rab22A reagierte. Der polyklonale Antikörper gegen rab31-His enthielt auch eine Antikörperfraktion, die mit dem N-terminalen Histidin-*tag* reagierte. Diese Antikörperfraktion konnte erfolgreich durch eine Affinitätschromatographie des Antikörpers gegen GST-rab31 entfernt werden.

Zusätzlich zu den beiden prokaryontischen Expressionsplasmiden wurde der eukaryontische Expressionsvektor pRc/RSV-rab31 hergestellt, womit die niedrig rab31-exprimierende Zelllinie MDA-MB-231 transfiziert wurde. Dabei wurde die rab31-Expression durch eine Westernblot-Analyse verfolgt. Während Kontrollzellen, die mit dem Vektor alleine transfiziert wurden, keine erhöhte rab31-Expression gegenüber der entsprechenden nicht-transfizierten Zelllinie zeigten, kam es in den mit pRc/RSV-rab31 stabil transfizierten MDA-MB-231-

Zellen zu einer deutlichen Erhöhung der rab31-Expression, die mit den rab31-Antikörpern im Westernblot nachgewiesen wurden.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit polyklonale Antikörper gegen rab31 sowie humane rab31-exprimierende Mammakarzinom-Zelllinien hergestellt. Sie dienten als wichtige Werkzeuge für weiterführende Untersuchungen zur tumorbiologischen Rolle von rab31. So konnten in Folgearbeiten zytochemische und immunhistochemische Experimente durchgeführt und rab31-spezifische ELISA-Analysen etabliert werden.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AB	<i>antibody</i>
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AMP	Ampicillin
ASCO	American Society for Clinical Oncology
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BRCA	<i>breast cancer gene</i>
bp	Basenpaare
BRE-Score	Bloom-Richardson-Grading, modifiziert nach Elston und Ellis
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CA15-3	<i>cancer antigen 15-3</i>
CCV	<i>clathrin-coated vesicles</i>
COPI/II	<i>coat protein complex</i> I und II
ChT1-4	<i>chicken</i> Tier 1-4
Da	Dalton
D I	Domäne I von uPAR
D II	Domäne II von uPAR
D III	Domäne III von uPAR
DFS	<i>disease free survival</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMFS	<i>distance metastasis free survival</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dH ₂ O	destilliertes, DNase/RNase freies Wasser
dNTP	Mischung aus Desoxyribonukleotiden
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz

Abkürzungsverzeichnis

EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Östrogenrezeptor (<i>estrogen receptor</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
EthOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	Kalbsfötus-Serum (<i>fetal calf serum</i>)
F _c	Konstanter Teil eines Antikörpers
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
G	Differenzierungsgrad, <i>grading</i>
GAM	antibiotikafreies Zellkulturmedium
GDI	<i>GDP-dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanidine nucleotide exchange factor</i>
GGT	Geranylgeranyltransferase
GLI1	<i>glioma-associated oncogene homolog 1</i>
GLUT4	Glukose-Transporter 4
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSH	Glutathion (oxidiert)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HER2	<i>human epidermal growth factor 2</i>
His-tag	Histidin-tag
HKG	<i>housekeeping</i> -Gen
HR	Hormonrezeptor
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HPRT	<i>hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>
HuR	<i>human antigen R</i>
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

Abkürzungsverzeichnis

Ki-67	Antigen Kiel-67
KLK	Kallikrein ähnliche Peptidase
LiCl	Lithiumchlorid
LB	<i>lysogeny broth</i>
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
Ni ²⁺	Nickel-Ion
NTA	Nitrilotriessigsäure
OCRL-1	<i>oculocerebrorenal syndrome of Lowe phosphatase 1</i>
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OD _Δ	OD 260 nm/OD 280 nm
OS	<i>overall survival</i>
PAA	Polyacrylamid
pAbs	polyklonale Antikörper, <i>polyclonal antibodies</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)
P:C:I	Gemisch aus Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFS	<i>progression free survival</i>
PR	Progesteron-Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
rab31	<i>ras-related protein in brain 31</i>
ras	<i>rat sarcoma virus</i>
RIN	<i>ras and rab interactor</i>
REP	<i>rab escort protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

RT1-4	<i>rabbit</i> Tier 1-4
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Ser	Serin
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TNBC	dreifach negatives Mammakarzinom (ER negativ, PR negativ, HER2 negativ) (<i>triple negative breast cancer</i>)
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TNM	Tumorgröße, Nodalstatus, Metastasierung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator Rezeptor
uPAR-del4/5	uPAR mit Deletion Exon 4/5
ÜNK	Übernachtskultur
WB	Westernblot

Inhaltsverzeichnis

<i>Zusammenfassung</i>	<i>I</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>III</i>
<i>1. Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.1.1 Kanzerogenese, Tumormikroumgebung und Zellzyklus	1
1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie des Mammakarzinoms	1
1.1.3 Klassifizierung des Mammakarzinoms anhand von histologischen Merkmalen und klinisch verwendete Biomarker	2
1.2 Die Rolle des Systems aus uPA, uPAR und PAI bei der Tumorentstehung	3
1.3 Zusammenhang zwischen der Expression der Spleißvariante uPAR-del4/5 und rab31	5
1.4 Rab-Proteine	7
1.4.1 Die Funktion und Regulation von rab-Proteinen in der Zelle	7
1.4.2 Die physiologische Funktion von rab-Proteinen am Golgi-Apparat	10
1.4.3 Rab31 als Mammakarzinom-assoziiertes Biomarker und die Rolle von rab31 und seinen Effektoren bei der Tumorentstehung	13
<i>2. Zielsetzung der Arbeit</i>	<i>16</i>
<i>3. Material und Methoden</i>	<i>17</i>
<i>3.1 Material</i>	<i>17</i>
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	17
3.1.2 Puffer und Lösungen	19
3.1.3 Zelllinien und Bakterienstämme	21
3.1.4 Zellkulturmedium	22
3.1.5 Primer	22
3.1.6 Enzyme	23
3.1.7 Restriktionsendonukleasen	23
3.1.8 Restriktionspuffer	23
3.1.9 Vektoren	23
3.1.10 Antikörper	24
3.1.10.1 Primäre Antikörper	24

3.1.10.2 Sekundäre Antikörper	24
3.1.11 Kits	24
3.1.12 Geräte	25
3.2 Methoden	25
3.2.1 Herstellung der Expressionsplasmide	25
3.2.1.1 cDNA von rab31	25
3.2.1.2 Extension des rab31-Templates mittels doppelter PCR	26
3.2.1.3 DNA-Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	26
3.2.1.4 Restriktion der DNA	27
3.2.1.5 Reinigung der DNA mittels Gel-Elektrophorese	28
3.2.1.6 Ligation	28
3.2.1.7 Transformation von E. coli	29
3.2.1.8 Plasmid-Minipräparation	29
3.2.1.9 Restriktionsanalyse der Plasmide	30
3.2.1.10 Sequenzierung der Plasmide	30
3.2.2 Herstellung eines rekombinanten rab-31-His Fusionsproteins	30
3.2.2.1 Expression des rab31-Gens in E. coli	30
3.2.2.2 Expressionskontrolle	31
3.2.2.3 SDS-Gel-Elektrophorese	31
3.2.2.4 Herstellung von rab31-His in E. coli	32
3.2.2.5 Affinitätschromatographie mit Ni ²⁺ -NTA-Agarose	33
3.2.2.6 Dialyse von rab31-His in Harnstoffpuffer gegen PBS und Konzentrierung	34
3.2.3 Rekombinante Herstellung eines GST-rab31-Fusionsproteins	35
3.2.4 Herstellung der Antikörper	36
3.2.4.1 Immunisierung	36
3.2.4.2 Reinigung der Antikörper aus dem Eidotter (Dextran-Sulfatfällung)	36
3.2.4.3 Affinitätsreinigung der Antikörper mit GST-rab31	37
3.2.5 ELISA	37
3.2.5.1 One-sided ELISA	37
3.2.5.2 Sandwich-ELISA	39
3.2.6 Westernblot	40

3.2.7	Zellkultur	40
3.2.7.1	Auftauen der Zellen	40
3.2.7.2	Einfrieren der Zellen	41
3.2.7.3	Kultivierung der Zellen	41
3.2.7.4	Bestimmung der Zellzahl	41
3.2.7.5	Mykoplasmen-PCR	41
3.2.7.6	Stabile Transfektion	42
3.2.7.7	Analyse des Transfektionserfolges mittels Westernblot	42
4.	Ergebnisse	43
4.1	Herstellung eines rab31-His-Fusionproteins	43
4.1.1	Isolierung der rab31-Sequenz	43
4.1.2	Herstellung des prokaryontischen Expressionsplasmids pQE-30-rab31	44
4.1.3	Produktion des humanen rekombinanten rab31-His-Fusionsproteins	49
4.1.4	Einengung von rab31-His	51
4.2	Herstellung eines rab31-GST-Fusionproteins	52
4.2.1	Herstellung des prokaryontischen Expressionsplasmides pGEX-6P-2-rab31	52
4.2.2	Herstellung des humanen rekombinanten GST-rab31-Fusionsproteins	55
4.3	Generierung der polyklonalen anti-rab31-Antikörper	56
4.4	Charakterisierung der anti-rab31-Antikörper	57
4.4.1	<i>one-sided</i> ELISA	57
4.4.2	<i>Sandwich</i> -ELISA	57
4.4.3	Charakterisierung der affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper RT3-IgG mittels Westernblot	58
4.4.4	Affinitätsreinigung des Antikörpers RT3-IgG	59
4.4.5	Reinigung aus Eidotter	60
4.5	Rab31-Expression in eukaryontischen Zellen	61
4.5.1	Herstellung des eukaryontischen Expressionsvektors pRc/RSV-rab31	62
5.	Diskussion	65
5.1	Rekombinante Expression von rab31 sowie Reinigung und Immunisierung von Kaninchen und Hühnern	65
5.2	Charakterisierung der Antikörper und deren Bedeutung für Folgearbeiten	67

5.3 Analyse der tumorbiologischen Rolle von rab31	68
5.4 Klinische Relevanz von rab31 beim Mammakarzinom	71
5.5 Interaktionen von rab31 mit Rezeptoren	72
5.6 Rab31 – Prognosemarker und potentiell therapeutisches Ziel?	73
5.7 Ausblick	75
<i>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</i>	77
Abbildungen	77
Tabelle	78
<i>Literaturverzeichnis</i>	79
<i>Vorveröffentlichungen</i>	87
<i>Danksagung</i>	88

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Kanzerogenese, Tumormikroumgebung und Zellzyklus

Die Kanzerogenese ist ein Prozess, bei dem gesunde Zellen schrittweise die Eigenschaften von Tumorzellen annehmen. Hierzu gehören die Aufrechterhaltung von proliferativen Signalen, die replikative Unsterblichkeit, die Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, die Umgehung des programmierten Zelltods (Apoptose), die Induktion der Angiogenese und die Fähigkeit zu Invasion und Metastasenbildung (Hanahan und Weinberg, 2000). Des Weiteren weisen Tumorzellen einen veränderten Metabolismus auf und können so einer Eliminierung durch das Immunsystem entgehen (Hanahan und Weinberg, 2011).

Die Tumor-Mikroumgebung mit Fibroblasten, Makrophagen, Angiogenese-induzierenden Faktoren, Zytokinen und anderen Komponenten beeinflusst zudem entscheidend die Entwicklung und die biologische Kontrolle der Tumorzellen. Beim Mammakarzinom beispielsweise regulieren Zytokine die Apoptose, das Tumorwachstum und die Angiogenese (Liotta und Kohn, 2001). Proteasen zersetzen die extrazelluläre Matrix, wodurch die Invasion von Tumorzellen erleichtert wird (Duffy, 2004). Die Erforschung von Faktoren der Kanzerogenese sowie von Einflussfaktoren auf den Zellzyklus und die Tumor-Mikroumgebung bildet daher ein herausforderndes und komplexes Themengebiet. Ein besseres Verständnis der Prozesse ist eine Voraussetzung für die Entdeckung neuer Prognosefaktoren für Tumorpatientinnen sowie für die Entwicklung neuer Medikamente, die gezielt in den Zellzyklus und die Tumormikroumgebung eingreifen.

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie des Mammakarzinoms

In Deutschland ist das Mammakarzinom mit über 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr und einem Anteil von 30 % an allen Tumorentitäten die häufigste maligne Erkrankung der Frau. Mit einem Lebenszeitrisiko von ca. 12 % und einem mittleren Erkrankungsalter von 64 Jahren stellt es mit 17,7 % aller tumorassoziierten Todesfälle auch die häufigste krebsbedingte Todesursache von Frauen in Deutschland dar (RKI, 2021). Neue Vorsorgemöglichkeiten führten in den Industriestaaten zu einem vorübergehenden Anstieg der Morbiditätsrate und einer vermehrten Erkennung von Frühstadien (65-70 % der Mammakarzinome). Gleichzeitig wurde

ein Rückgang der Mortalitätsrate um 25-31 % in der Altersklasse von 50 bis 69 Jahren verzeichnet (Nelson et al., 2016). Die Heilungsraten des Mammakarzinoms liegen in den Industriestaaten bei 70-80 % (Ferlay et al., 2019). Bei etwa 5 % aller Mammakarzinome liegt eine Mutation in den *breast cancer* (BRCA)-Genen BRCA 1 (65 % Penetranz) oder BRCA 2 (45 % Penetranz) vor (Antoniou et al., 2003). Andere Mutationen mit erblicher Disposition betreffen verschiedene Gene der Tumor-Suppression (TP 53, SKT 11 und PTEN) (Kobayashi et al., 2013) sowie Gene, die in die DNA-Reparatur involviert sind (PALB 2, ATM, CHK 2, RAD-51-C) (Easton et al., 2015).

1.1.3 Klassifizierung des Mammakarzinoms anhand von histologischen Merkmalen und klinisch verwendete Biomarker

Morphologisch wird das Mammakarzinom in invasive Karzinome ohne speziellen histologischen Typ (*no special type*, NST) sowie in invasive Karzinome mit einem speziellen histologischen Subtyp unterteilt, wobei letztere ca. 25 % der Mammakarzinome ausmachen. Darunter ist das lobuläre Mammakarzinom mit 15 % der häufigste histologische Subtyp (Weigelt et al., 2010).

Die Prognose des Mammakarzinoms ist abhängig von kliniko-pathologischen Parametern wie Tumorausdehnung und Differenzierungsgrad des Tumors. Die Tumorausdehnung kann anhand der TNM-Klassifikation nach der Größe des Primärtumors (T), dem Nodalstatus (N) und dem Ausmaß der Metastasierung (M) beurteilt werden (Giuliano et al., 2017). Einen zusätzlichen prognostischen Wert liefert die pathomorphologische Beurteilung der Tumorzellen nach den Kriterien Tubulus-Ausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate. Beim Bloom-Richardson-Grading, modifiziert nach Elston und Ellis (BRE-Score) (Elston und Ellis, 1991), werden drei Differenzierungsgrade (G1, G2 und G3) unterschieden, wobei vor allem die Unterscheidung zwischen G2 (mäßig differenziert, mäßiger Malignitätsgrad) und G3 (schlecht differenziert, hoher Malignitätsgrad) wichtig für die Prognose und Therapieentscheidungen sind (Galea et al., 1992; Kollias et al., 1997).

Die immunhistochemisch bestimmten Expressionsprofile bestimmter Steroidhormonrezeptoren, ein Östrogenrezeptor (ER) und ein Progesteronrezeptor (PR), des HER2-Rezeptors (*human epidermal growth factor receptor 2*) sowie des Proliferationsmarkers Kiel-67 (Ki-67) sind prädiktive Faktoren für die Therapie des Mammakarzinoms. Aus der Kombination dieser Expressionsprofile werden die folgenden molekularen Subtypen abgeleitet:

- Luminal A: ER und/oder PR positiv (ER/PR+), Ki-67 niedrig und HER2 negativ (HER2-)
- Luminal B/HER2-: ER/PR+, HER2-, Ki-67 hoch
- Luminal B/HER2 positiv (HER2+): ER/PR+, HER2+, Ki-67 (alle Werte)
- HER2+, nicht luminal: ER-, PR- und HER2+
- triple-negativ: ER-, PR-, HER2-

Die vereinfachte klinische Einteilung unterscheidet Hormonrezeptor (HR)-positive (HR+), HER2-positive (HER2+) und triple-negative Mammakarzinome (*triple negative breast cancer*, TNBC) (Coates et al., 2015; Goldhirsch et al., 2011).

Bei der Therapie des Mammakarzinoms gewinnen tumor- und molekularbiologische prognostische sowie prädiktive Faktoren zunehmend an Bedeutung. Dazu gehören kommerziell erhältliche *panels* von Genexpressionsanalysen mit (potentiell) prädiktivem Wert. Sie beinhalten jeweils unterschiedliche Auswahlen von bekannten Tumor-Risikogenen, die in Metastasierung, Zellzyklus, Invasion, Angiogenese, Steroidhormonrezeptor- und HER2-Rezeptoraktivität des Mammakarzinoms involviert sind (Farr et al., 2013). Des Weiteren hat die Proteinbestimmung von *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) und *plasminogen activator inhibitor* Typ I (PAI-1) im hormonrezeptorpositiven und nodalnegativen Mammakarzinom-Gewebe prognostischen (Harbeck et al., 2013) und prädiktiven Wert (Duffy et al., 2014).

1.2 Die Rolle des Systems aus uPA, uPAR und PAI bei der Tumorentstehung

Das uPA-System besteht aus drei Komponenten, nämlich der Serinprotease uPA, ihrem Rezeptor uPAR und den uPA-Inhibitoren (PAI-1/PAI-2) (Abb. 1). Alle drei Komponenten sind an der Tumorentstehung beteiligt.

Durch uPA aktiviertes Plasmin aktiviert die Fibrinolyse und interagiert mit verschiedenen Matrix-Metalloproteasen (MMP 3, MMP 9). So stimuliert es den Abbau der Basalmembran und der extrazellulären Matrix (EZM) und ermöglicht auf diese Weise Invasion und Metastasierung (Andreasen et al., 1997). PAI-1 inaktiviert uPA und somit die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin. Trotz seiner inhibitorischen Funktion auf uPA wirkt auch PAI-1 davon

unabhängig tumorfördernd (Abb. 1). Durch die Bindung an Vitronectin beeinflusst PAI-1 zelluläre Adhäsions- und Migrationsprozesse (Harbeck et al., 2004).

Die uPA-katalysierte Bildung von Plasmin findet nur dann effizient statt, wenn uPA an seinen Rezeptor uPAR gebunden ist (Andreasen et al., 1997). Aktivierter uPAR interagiert mit Integrinen, die wiederum über intrazelluläre Signalwege die Zellproliferation und Angiogenese induzieren. Darüber hinaus interagiert uPAR mit dem adhäsiven EZM-Protein Vitronectin, das wiederum die Migration und Adhäsion reguliert (Abb. 1). Somit werden durch uPAR zusätzlich zur uPA-Aktivität Tumorinvasions- und Metastasierungsprozesse begünstigt (Duffy, 2004).

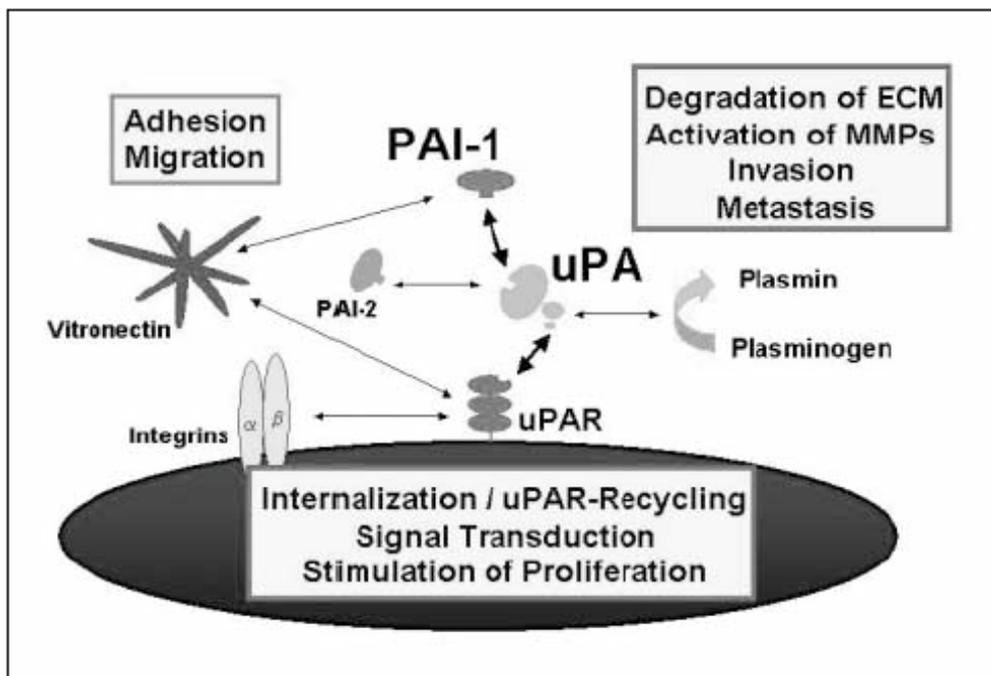


Abb. 1: Die multifunktionale Rolle des uPA-Signalweges bei Tumorwachstum, Invasion und Metastasenbildung

Über die Bindung von uPA an den uPA-Rezeptor (uPAR) interagiert uPAR mit Integrinen und induziert eine Stimulation der Zellproliferation. Durch die Interaktion des uPA-Rezeptors mit Vitronectin wird die Zelladhäsion und Zellmigration reguliert. uPA katalysiert die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin und stimuliert somit durch die Degradation der extrazellulären Matrix und durch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen die Invasion und Metastasenbildung. Neben PAI-2 ist PAI-1 der wichtigste Inhibitor von uPA. Darüber hinaus inhibiert PAI-1 auch Plasmin und bindet an Vitronectin (EZM-Protein), wodurch PAI-1 zelluläre Adhäsions- und Migrationsprozesse beeinflusst. Modifiziert nach Harbeck et al. (2004).

1.3 Zusammenhang zwischen der Expression der Spleißvariante uPAR-del4/5 und rab31

Der uPA-Rezeptor ist ein glykosyliertes GPI-verankertes Membranprotein (60 kDa), das aus drei strukturgleichen Domänen D I, D II und D III besteht (Andreasen et al., 1997). Neben verschiedenen molekularen uPAR-Varianten (nicht membrangebundener, löslicher uPAR, uPAR D II + D III, freie uPAR D I) ist insbesondere die uPAR-Spleißvariante uPAR-del4/5, der die Exons 4 und 5 und damit die komplette Domäne II fehlen, von besonderer Bedeutung (Kotzsch et al., 2008) (Abb. 2). Bei Mammakarzinom-Patientinnen ist der Nachweis dieser Spleißvariante mit einem kürzeren Gesamtüberleben und einer kürzeren Rezidivfreiheit assoziiert (Kotzsch et al., 2005; Luther et al., 2003).

Kotzsch et al. (2008) haben nach Genen gesucht, die zusammen mit uPAR-del4/5 überexprimiert werden. Durch Genexpressionsanalyse (*microarray*-Technologie) wurde Tumorgewebe eines einheitlichen Patientenkollektivs (280 nicht chemotherapierte, nodalnegative Mammakarzinom-Patientinnen) hinsichtlich der uPAR-del4/5-Expression untersucht. Es wurden jeweils 20 Gewebe mit der höchsten und der niedrigsten uPAR-del4/5-mRNA-Expression ausgewählt, um Gene zu identifizieren, deren Expression sich in den beiden Gruppen unterscheidet. In dieser Studie wurde rab31 als eines von sieben Genen identifiziert, die bei hoher uPAR-del4/5-mRNA-Expression mehr als zweifach überexprimiert wurden (Kotzsch et al., 2008).

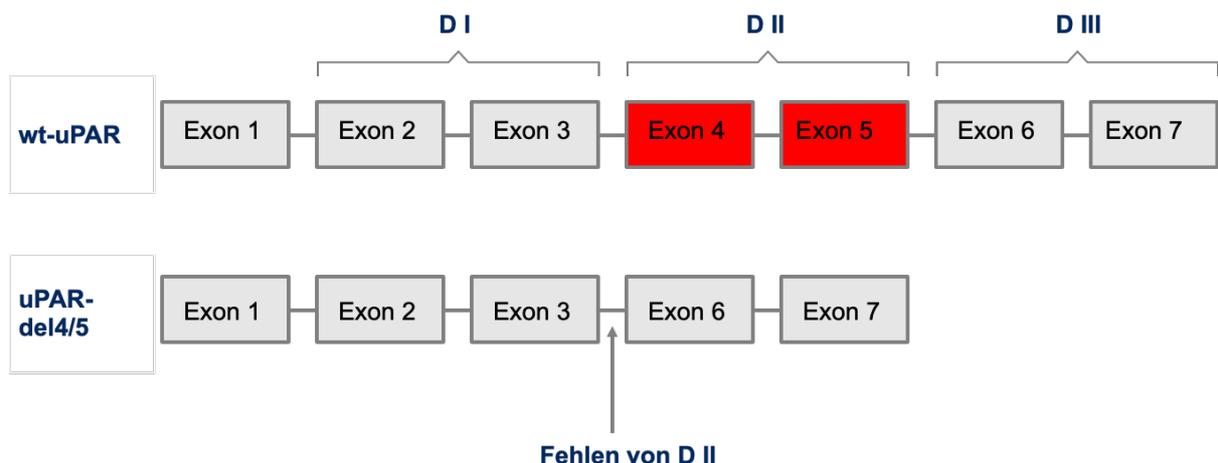


Abb. 2: Schematische Darstellung der Domänen des uPA-Rezeptors

Oben: Wildtyp (wt) mit den Domänen (D) I-III. Jede Domäne wird jeweils durch zwei Exons kodiert. Unten: Spleißvariante uPAR-del4/5: Dieser Variante fehlen Exons 4 und 5, die für Domäne II kodieren. Somit fehlt dieser Variante die komplette Domäne II. Modifiziert nach Luther et al. (2003).

Rab31 wurde für weitere Analysen ausgewählt, da die Familie der rab-Proteine zur großen Gruppe der tumorrelevanten ras-Proteine gehört. Dazu wurden je 70 von insgesamt 280 Patientinnen in vier Quartile mit aufsteigender uPAR-del4/5-mRNA-Expression aufgeteilt. Abbildung 3 zeigt die rab31-mRNA-Expression jeweils relativ zur Expression des *housekeeping*-Gens *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase* (HPRT) in Abhängigkeit von der uPAR-del4/5-mRNA-Expression. Die Expression von uPAR-del4/5 korrelierte dabei positiv mit der rab31-mRNA-Expression (Kotzsch et al., 2008).

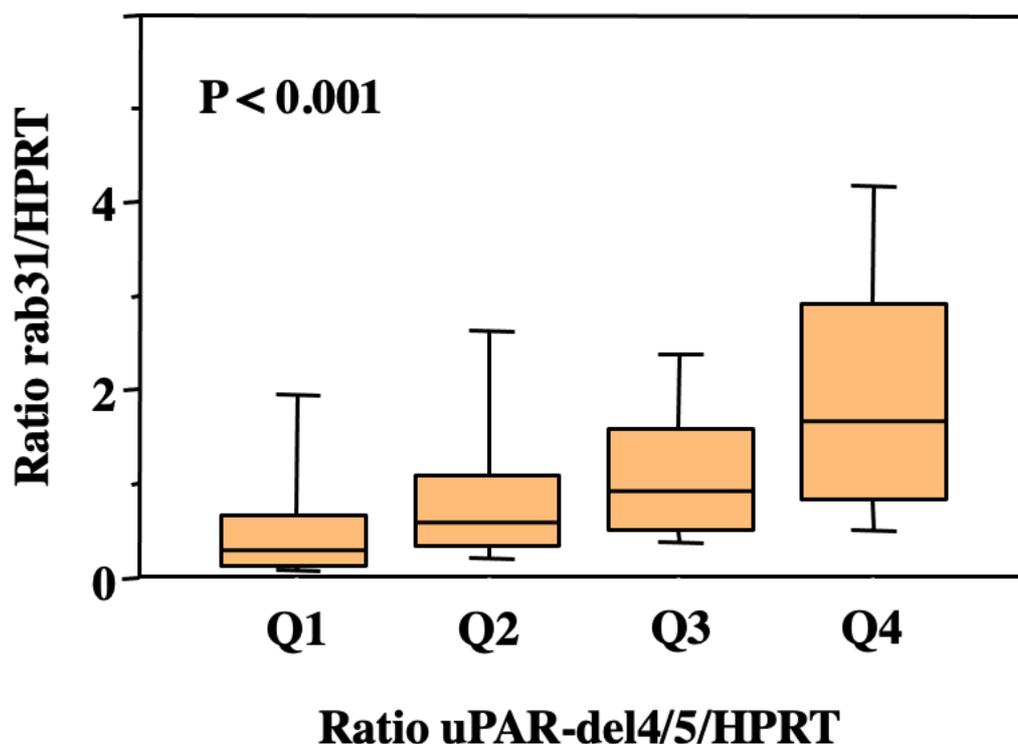


Abb. 3: Expression von rab31-mRNA in Abhängigkeit von der uPAR-del4/5-Expression

Die uPAR-del4/5-mRNA-Konzentration wurde in vier Quartile mit jeweils 70 Patientinnen nach dem Betrag der uPAR-del4/5-Expression in aufsteigender Reihenfolge unterteilt (Q1-Q4). Die rab31-mRNA-Expression ist in Tumorgewebe mit hoher uPAR-del4/5-mRNA-Expression signifikant höher als im Tumorgewebe mit niedriger uPAR-del4/5-Expression. Modifiziert nach Kotzsch et al. (2008).

Die durch quantitative PCR (qPCR) ermittelte rab31-mRNA-Expression im Mammakarzinom-Gewebe stellte sich in Cox-Regressionsanalysen als ein signifikanter Prognosefaktor hinsichtlich des metastasenfrenen Überlebens (DMFS) und des Gesamt-Überlebens (OS) heraus. Hohe rab31-mRNA-Konzentrationen korrelierten signifikant mit einem kürzerem

DMFS (Abb. 4) und OS. Mammakarzinom-Patientinnen mit erhöhter uPAR-del4/5- und rab31-mRNA-Expression hatten ein annähernd vierfach erhöhtes Metastasierungsrisiko gegenüber den Patientinnen der Subgruppe mit niedriger uPAR-del4/5- und rab31-mRNA-Expression im Tumorgewebe. In der Subgruppe mit hoher uPAR-del4/5- und mit hoher rab31-mRNA-Expression betrug die Rezidivrate $> 50\%$. Multivariate Analysen konnten außerdem zeigen, dass uPAR-del4/5 und rab31-mRNA voneinander unabhängige prognostische Biomarker des metastasenfreien Überlebens beim Mammakarzinom sind. Daher ist anzunehmen, dass sie in zwei verschiedenen, aber möglicherweise assoziierten Signaltransduktionswegen agieren (Kotzsch et al., 2008).

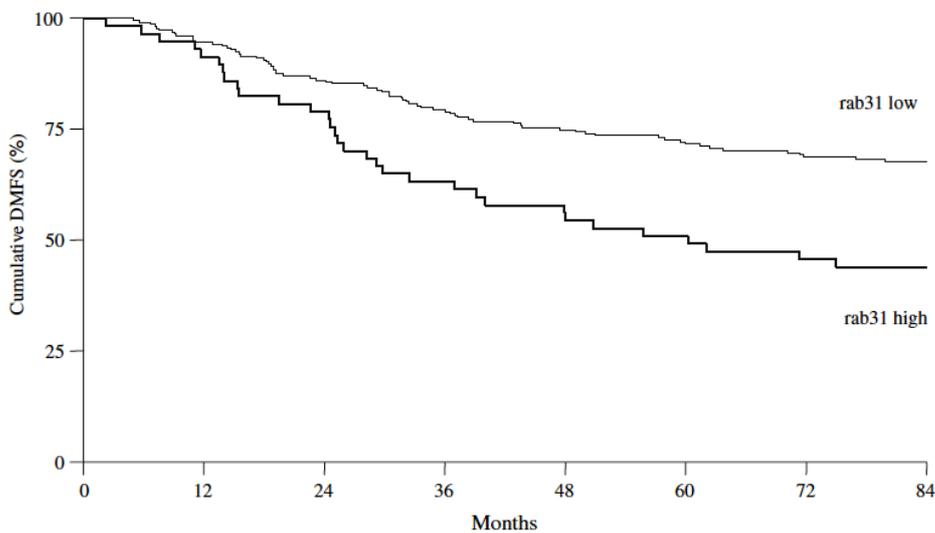


Abb. 4: Metastasenfreie Überlebensrate (*distant metastasis free survival*, DMFS) in Abhängigkeit von der rab31-mRNA-Expression im Tumorgewebe

Die Daten stammen von 280 nodalnegativen, nicht adjuvant-therapierten Patientinnen. Patientinnen mit niedriger rab31-mRNA-Expression (rab31 low), zeigten ein signifikant besseres DMFS als die mit hoher rab31-mRNA-Expression. Entnommen aus Kotzsch et al. (2008).

1.4 Rab-Proteine

1.4.1 Die Funktion und Regulation von rab-Proteinen in der Zelle

Rab-Proteine sind als Mitglieder der *rat sarcoma virus* (ras)-Oberfamilie GTP-bindende Proteine mit GTPase-Funktion. Bei Eukaryonten sind 66 verschiedene rab-Proteine bekannt, die in sechs Subgruppen unterteilt werden. Rab-Proteine werden ubiquitär exprimiert (Subramani und Alahari, 2010). Mutationen in den Genen von rab-Proteinen sind die Ursache von

schwerwiegenden komplexen Erbkrankheiten wie neurodegenerativen Erkrankungen und Fettstoffwechselstörungen (Agola et al., 2012).

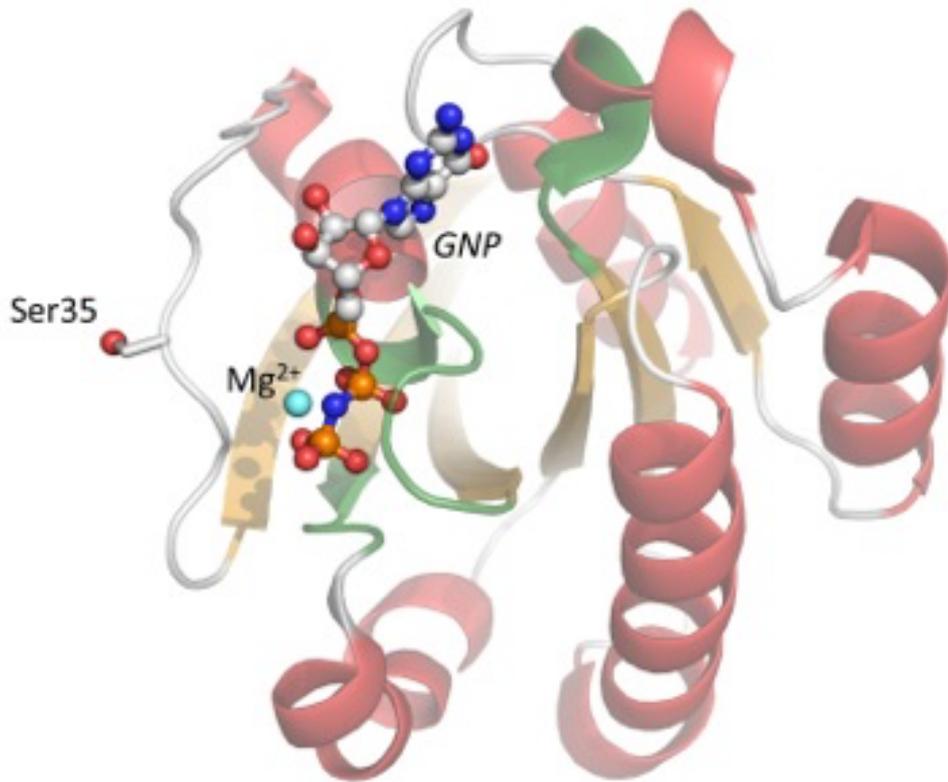


Abb. 5: Struktur von rab31

Folgende Bestandteile von rab31 sind farblich hervorgehoben: β -Faltblätter (gelb), α -Helices (rot), Bindungsstellen für Mg^{2+} (türkis), Guaninnukleotid-Bindestelle (GNP) (grün) und Seitenkette des Serins (Ser35), an der eine Phosphorylierung stattfinden kann. Entnommen aus Kotzsch et al. (2016).

Die typische Struktur von rab-Proteinen besteht aus sechs β -Faltblättern mit fünf α -Helices, wobei die GTP-bindende Region in fünf Schleifen (G1-G5) angeordnet ist (Liu und Storrie, 2012) (Abb. 5). Innerhalb der rab-Proteine sind die Bindungsstellen für Magnesium-Ionen (Mg^{2+}) und Guaninnukleotide (GNP) hochkonservierte Regionen (Stenmark, 2009). Rab-Proteine unterscheiden sich hauptsächlich in der C-terminalen Region. Ihre Funktion ist abhängig von ihrer posttranslationalen Modifikation, von der GTP-Bindung und von ihrer intra-

zellulären Lokalisation. Im Zytosol (intrazelluläre Proteine) bewegen sich rab-Proteine zwischen dem Zytoplasma, der Zellmembran und endozytoplasmatischen Komponenten. Sie können über einen Isopren-Anker, den sie durch posttranslationale Prenylierung erhalten, an die Membran binden und fungieren dann als periphere Membranproteine (Chen et al., 1996; Ng et al., 2007). Exemplarisch wird in Abbildung 5 rab31 gezeigt. Es besitzt eine hypervariable Region mit zwei Cysteinresten. Durch posttranslationale Modifikation am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) können hier Geranylgeranyl-Anker kovalent binden, was zur Prenylierung des Proteins führt (Chua und Tang, 2015).

Rab-Proteine werden zunächst als lösliche Proteine im Zytosol synthetisiert (Abb. 6) und anschließend durch das *rab escort protein* (REP) gebunden. An das REP-gebundene rab-Protein werden durch die rab-Geranylgeranyltransferase (rab-GGT) Geranylgruppen über kovalente Thioesterbindungen an Cysteinreste am C-Terminus angehängt. Rab wird REP-abhängig zur Membran transportiert. In Abwesenheit von REP und/oder rab-GGT verbleibt das rab-Protein in einem inaktiven Status im Zytosol (Corbeel und Freson, 2008). Eine weitere Voraussetzung sowohl für das Anheften an die Membran als auch für die Funktionsausübung ist die Aktivierung des rab-Proteins durch GTP mittels GEF (*guanidine nucleotide exchange factor*). Im GTP-aktivierten Zustand wird das rab-Protein von seinen Effektorproteinen erkannt und kann seine Funktion ausüben. Anschließend wird das rab-Protein durch Hydrolyse wieder in die inaktive Form überführt. Im deaktivierten und GDP-gebundenen Zustand werden die rab-Proteine von der Membran gelöst und im Zytosol recycelt (Barr, 2009). Durch die Bindung mit GDI (*GDP-dissociation inhibitor*) werden rab-Proteine in ihrer inaktiven Form gehalten und somit wird auch ihr Transport durch das Zytosol erleichtert. Sobald GDI vom rab-Protein dissoziiert, kann rab wieder aktiviert werden (Abb. 6) (Corbeel und Freson, 2008).

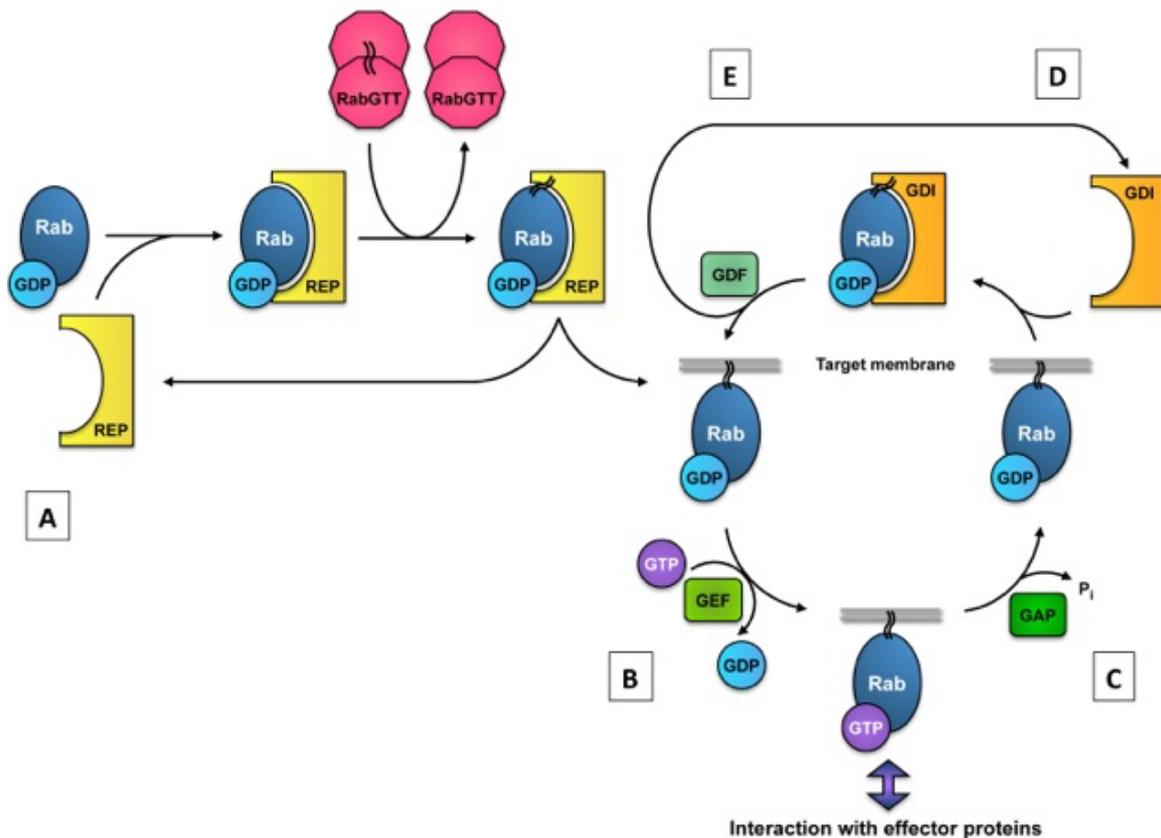


Abb. 6: Rab-Zyklus und rab-Zustandsformen

(A) Neu synthetisierte rab-Proteine sind GDP gebunden. Für die Erkennung durch GGT (Geranylgeranyltransferase) muss zunächst ein Komplex mit *rab escort protein* (REP) (gelb) gebildet werden. (B) Die Konversion von rab-GDP (inaktiv) in rab-GTP (aktiv) geschieht durch den Austausch von GDP durch GTP, der durch den *guanidine nucleotide exchange factor* (GEF) katalysiert wird. Rab-GTP wird von verschiedenen Effektoren erkannt und kann so seine Funktion ausüben. (C) rab-GTP wird durch Hydrolyse in die inaktive Form überführt. (D) *GDP dissociation inhibitor* (GDI) (orange) hält rab-Proteine in ihrer inaktiven Form und erleichtert somit ihren Transport durch das Zytosol. (E) Sobald GDI vom rab-Protein dissoziiert, kann rab wieder aktiviert werden. Entnommen aus Kotzsch et al. (2016).

1.4.2 Die physiologische Funktion von rab-Proteinen am Golgi-Apparat

Rab-Proteine regulieren unter anderem die Internalisations- und Recyclingwege von Integri- nen oder Wachstumsfaktorrezeptoren, wie beispielsweise epidermalen Wachstumsfaktor- Rezeptor EGFR (Subramani und Alahari, 2010). Sie spielen eine Schlüsselrolle beim intrazel- lulären Transport und beim Membran-Transport wie etwa beim Vesikeltransport (Vesikelfor- mation, Vesikelbewegung, Anheften und Fusion mit der Akzeptormembran) (Stenmark, 2009), beim Recycling von Lysosomen (Recchi und Seabra, 2012), bei der Signaltransduktion zu anderen Zellen sowie bei der Endo- und Exozytose (Zerial und McBride, 2001). So ist bei- spielsweise rab5 maßgeblich am Prozess der Endosomenbildung beteiligt (Zeigerer et al.,

2012). Dabei interagieren rab-Proteine mit verschiedenen Zellstrukturen. Rab-Proteine scheinen mit *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE)-Komplexen zu interagieren, die eine Schlüsselrolle bei der Membran-Fusion und der Endo- bzw. Exozytose spielen. Des Weiteren wurden bereits verschiedene rab-Proteine am Golgi-Apparat lokalisiert (Liu und Storrie, 2012).

Der eukaryontische Golgi-Apparat besteht aus gestapelten Zisternen (Dictyosomen). Seine vielfältigen Funktionen umfassen den Transport von Substanzen innerhalb der Zelle (Vesikeltransport), die Biosynthese von Lipiden, Sphingo- und Glykoproteinen und Lysosomen sowie die Sortierung und posttranslationale Modifikation von am endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Proteinen. Der Golgi-Apparat ist daher maßgeblich an der Sekretion und am Transport von Proteinen beteiligt (Karlson, 2005). Dabei steuert er zellsekretorische Abläufe und interagiert mit dem endoplasmatischen Retikulum sowie verschiedenen Proteinen des Zytoskeletts, wie den Mikrotubuli, den Aktinfilamenten, den Intermediärfilamenten sowie Ankyrin und Spektrin. Bei dieser Interaktion sind rab-Proteine essentiell. Verschiedene rab-Proteine wie beispielsweise rab6 sind an den Zisternen angesiedelt (Liu und Storrie, 2012).

Daneben ist der Golgi-Apparat maßgeblich an Apoptose, Mitose, Zellmigration, an der Koordination von Sortierungs-, Prozessierungs- und Zellzyklusprozessen sowie an der Koordination von Stoffwechselwegen beteiligt (Millarte und Farhan, 2012; Pfeffer, 2010a, b).

Die klassische Einteilung des Golgi-Apparats in eine *cis*-, eine *mediale*- und eine *trans*-Seite sowie das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) ergibt sich aus der Vesikel-Transportrichtung. Der anterograde Transport (endoplasmatisches Retikulum – Golgi – TGN) verläuft von der *cis*- zur *trans*-Seite, der retrograde Transport erfolgt in der entgegengesetzten Richtung. Während sekretorische Proteine anterograd transportiert werden, wird vermutet, dass beim retrograden Transport vor allem Golgi- und endoplasmatisches Retikulum-eigene Proteine transportiert werden. Zwei Modelle beschreiben den Transport am Golgi-Apparat – das stabile Kompartiment- und das Zisternenreifungs-Modell. Bei beiden Modellen werden Proteine, Lipide und Polysaccharide vom endoplasmatischen Retikulum durch COPII-Vesikel (COP: *coat protein complex*) an die *cis*-Seite geliefert. Laut dem stabilen Kompartiment-Modell werden sekretorische Proteine anterograd transportiert, indem sie in der Form von COPI-Vesikeln entlang der Membranen von der *cis*- über die *trans*-Seite zum TGN wandern. Dort werden Sie in *clathrin-coated vesicles* (CCV) oder mit anderen Trägern entlassen (Abb. 7a) (Glick und Nakano, 2009). Das Zisternenreifungs-Modell erklärt sowohl eine Möglichkeit zum anterograden als

auch zum retrograden Transport. Hierbei werden die Zisternen als transiente Strukturen betrachtet, die sich beim Zusammentreffen mit COPII-Vesikeln neu bilden (Abb. 7b). Eine neu gebildete Zisterne wandert demnach mit der vom ER im COPII-Vesikel erhaltenen Fracht entlang der Dictyosomen von der *cis*- zur *trans*-Seite (Glick und Nakano, 2009). Schließlich wird die Fracht ans TGN weitergereicht, dort sortiert und an die verschiedenen post-Golgi-Kompartimente (Endosomen, Lysosomen, Plasma-Membran und Sekretionsvesikel) weiterverteilt (Munro, 2011). Der Prozess des retrograden Transports von der *trans*- zur *cis*-Seite (Abb. 7b) ist neben dem Wiederverwerten von Golgi-eigenen Proteinen und Rücktransport zum ER auch insbesondere für Endozytose-Prozesse wichtig (Pfeffer, 2010a). Proteine, die zum endoplasmatischen Retikulum oder zu Golgi-Kompartimenten zurückgeführt werden, werden in COPI-ummantelte Vesikel verpackt, die vermutlich an den *trans*-Golgi Zisternen gebildet und dann über *cis*-Golgi Zisternen zum endoplasmatischen Retikulum transportiert werden (Glick und Nakano, 2009).

Die genaue intrazelluläre Lokalisation von rab31 ist nicht abschließend geklärt. Das rab31-Protein konnte vor allem am Golgi-Apparat, am TGN und in Endozytose-Kompartimenten von transfizierten HeLa-Zellen, Gliazellen und Glioblastomzellen nachgewiesen werden (Ng et al., 2007). Rab31 scheint wie rab22A sowohl beim anterograden als auch beim retrograden Transport beteiligt zu sein. Dabei ist rab31 wichtig für den Transport von Proteinen vom TGN zur Plasmamembran und zu den Endosomen (Ng et al., 2007). Hier ist rab31 am Stoffwechsel des frühen Endosoms beteiligt (Bao et al., 2002). Außerdem unterstützt rab31 die Glukoseaufnahme der Zellen, die bei Tumoren in der Regel dysreguliert ist. Lodhi et al. konnten zeigen, dass rab31 mit dem Stoffwechsel von GLUT4 (Glukose Transporter 4) interagiert. Dabei fördert eine verminderte Aktivität von TGN-assoziiertem rab31 die GLUT4-Translokation zur Membran und führt damit zu einer vermehrten Glukose-Aufnahme (Lodhi et al., 2007).

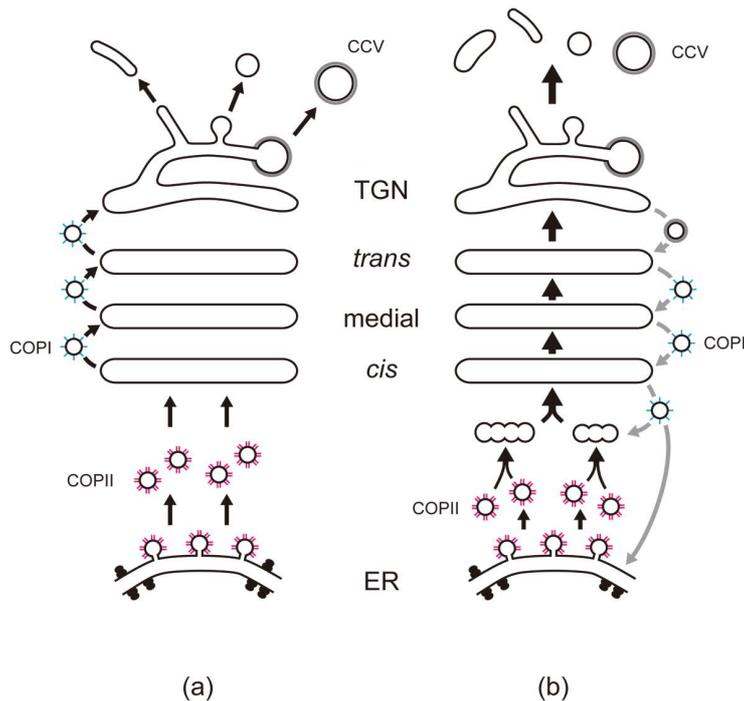


Abb. 7: Zwei Modelle des Membrantransportes am Golgi-Apparat und Trans-Golgi-Netzwerk (TGN)

(a) Stabiles Modell: anterograde Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat über COPII-Vesikel, weiter von der *cis*- über die *medial*- zur *trans*-Seite mittels COPI-Vesikel zwischen den Zisternen. (b) Zisternenreifungs-Modell: Zisternen werden als transiente Strukturen betrachtet, die sich beim Zusammentreffen mit COPII-Vesikeln neu bilden. Der anterograde Transport von sekretorischen Vesikeln vom endoplasmatischen Retikulum über die *cis*- zu *trans*-Seite erfolgt durch Zisternen-Reifung. Das angeschlossene Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) erhält Proteine in Clathrin-ummantelten Vesikeln (CCV: *clathrin coatet vesicle*) vom Golgi-Apparat und spielt eine wichtige Rolle bei der Proteinverteilung. Rab31 wurde am *trans*-Golgi Netzwerk lokalisiert. Beim retrograden Transport werden Proteine zum endoplasmatischen Retikulum oder zu den Golgi-Kompartimenten zurückgeführt. Dazu werden sie in COPI-ummantelte Vesikel verpackt, die von der *trans*- über die *cis*-Seite zum endoplasmatischen Retikulum transportiert werden oder am Golgi verbleiben. Entnommen aus Glick und Nakano (2009).

1.4.3 Rab31 als Mammakarzinom-assoziiertes Biomarker und die Rolle von rab31 und seinen Effektoren bei der Tumorentstehung

Rab31 (rab22B) wird ubiquitär exprimiert. Es gehört zur rab5-Unterfamilie, der sogenannten Gruppe II der rab-Proteine. Diese umfasst insgesamt neun rab-Proteine: rab5a, 5b, 5c, 17, 20, 21, 22A, 24 und 31. Das rab31-Gen ist auf Chromosom 18 lokalisiert und die kodierende Sequenz 582 bp lang. Das rab31-Protein besteht aus 194 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 21,6 kDa (Chen et al., 1996). Rab31 weist eine mässige Homologie zu den meisten anderen rab-Proteinen auf (Bao et al., 2002). Die größte Homologie (71 %) besteht zu rab22A, das wichtige Funktionen bei der Endozytose und Abläufen am TGN ausübt. Beide

rab-Proteine unterscheiden sich hauptsächlich durch 30 Aminosäuren am C-terminalen Ende (Ng et al., 2007).

Wie verschiedene andere rab-Proteine, beispielsweise rab25 und rab5, ist auch rab31 in Tumoren häufig dysreguliert. Rab-Proteine sind mit verschiedenen Prozessen der Tumorentstehung assoziiert. Dazu zählen Apoptose, Zelladhäsion, Proliferation, Tumorzellmigration, Invasion der extrazellulären Matrix, Signalwege zwischen Stromazellen, Resistenz gegenüber Medikamenten (Recchi und Seabra, 2012) und der Transport von Tumor-assoziierten Proteinen am Golgi-Apparat (Subramani und Alahari, 2010).

Hohe rab31-Expressionen wurden im Glioblastom (Ng et al., 2007), in Mamma- (Abba et al., 2005; Kotzsch et al., 2008), Schilddrüsen-, Ovarial- (Hwang et al., 2011), Zervix- (Pan et al., 2015) und Leberkarzinomen (Sui et al., 2015) nachgewiesen. Außerdem zeigte sich auch bei gutartigen Hauterkrankungen wie Psoriasis (Suarez-Farinas et al., 2011) und atopischer Dermatitis (Rebane et al., 2012) eine erhöhte rab31-Expression. Es liegt daher nahe, dass eine hohe rab31-Expression mit der Tumorentstehung und anderen systemischen Erkrankungen zusammenhängt.

Rab31 wurde mit *oculocerebrorenal syndrome of Lowe phosphatase 1* (OCRL-1) und Manno-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR)-Transport am TGN und an Endosomen lokalisiert. Es ist anzunehmen, dass ein Zusammenspiel von rab31 mit OCRL-1 für den M6PR-Transport vom TGN zu den Endosomen erforderlich ist. Er ist verantwortlich für die Markierung lysosomaler Proteine (Rodriguez-Gabin et al., 2009), was im Falle der Dysregulation eine Tumorentstehung begünstigt.

Wie alle rab-Proteine wird auch rab31 durch verschiedene *guanine exchange factors* (GEF) aktiviert. Als solche GEFs für rab31 dienen *ras and rab interactor* (RIN) 2 und 3 sowie *amyotrophic lateral sclerosis 2* (ALS2) und *ALS 2 C-terminal like* (ALS2CL) (Kajiho et al., 2011). Wichtig für die Interaktion von rab31 und verschiedenen GEFs sind die Vps9-Domäne (Carney et al., 2006) und *GTPase activating protein* (Gapex-5) (Lodhi et al., 2007). Im Falle des rab31-abhängigen M6PR-Transportes dient besonders RIN3 als GEF (Kajiho et al., 2011). Im Stoffwechsel des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) spielt rab31 zusammen mit *early endosome antigen 1* (EEA1) eine Rolle beim retrograden Transport in A431-Zellen (Ng et al., 2009), indem es den EGFR-vermittelten Übergang zwischen frühem und spätem Endosom beeinflusst. Eine experimentelle Aufhebung der Gapex-5-Funktion führt zur Verminderung der Interaktion zwischen EGFR und rab31 und damit zur Aufhebung der

rab31-abhängigen Induktion des EGFR-Stoffwechsels. Dies ist ein weiteres Beispiel für die Wirkung von rab31 am Endosom und bei der Regulation des EGFR. Tatsächlich spielt die Dysregulation von EGFR eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von verschiedenen Tumoren (Chua und Tang, 2014).

Bei der Untersuchung der tumorbiologischen Rolle von rab31 wurden vermehrt Interaktionen mit Mammakarzinom-assoziierten Proteinen gefunden. So bindet rab31 das mRNA-bindende Protein *human antigen R* (HuR), das mit einer schlechteren Prognose von verschiedenen Tumorerkrankungen korreliert (Wang et al., 2013). HuR ist auch mit der Tamoxifen-Resistenz von MCF-7-Mammakarzinom-Zellen assoziiert (Hostetter et al., 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass rab31-mRNA in verschiedenen Mammakarzinom-Geweben überexprimiert wird (Kotzsch et al., 2008; Subramani und Alahari, 2010). Abba et al. (2005) zeigten, dass rab31 in ER⁺-Mammakarzinomen spezifisch überexprimiert wird. Jin et al. (2012) belegten, dass das Onkoprotein Mucin 1-C (MUC1-C) die rab31-Expression in ER⁺-Mammakarzinom-Zellen induziert. MUC1-C wird bei 90 % der Mammakarzinome überexprimiert und ist unter dem Namen CA15-3 als Serum-Tumormarker bekannt.

Die Tatsache, dass rab31 mit unterschiedlichen Wegen der Tumorentstehung verknüpft ist und am Endosom und am Golgi-Apparat lokalisiert ist, lässt vermuten, dass rab31 eine Schnittstelle für verschiedene Wege der Tumorentstehung bildet. Da zusätzlich die rab31-Expression mit der Prognose von Mammakarzinom-Patientinnen korreliert, ist die Untersuchung seiner tumorbiologischen Rolle von großer Bedeutung.

2. Zielsetzung der Arbeit

Hohe rab31-mRNA-Konzentrationen im Tumorgewebe korrelieren mit einem kürzeren Gesamtüberleben und kürzeren DMFS von Mammakarzinom-Patientinnen (Kotzsch et al., 2008). Daher ist rab31 ein klinisch relevanter Prognosefaktor. Für die weitergehende Analyse der tumorbiologischen Rolle des rab31-Proteins war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Herstellung und Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern gegen rab31 als Werkzeuge für dessen weitere tumorbiologische Charakterisierung.

Hierzu wurden die folgenden Aufgaben definiert:

- Herstellung eines rekombinanten humanen rab31-Proteins mit einem Histidin-tag, der eine einfache und effiziente Proteinreinigung erlaubt.
- Generierung von polyklonalen Antikörpern in Hühnern und Kaninchen gegen das rab31-His-Fusionsprotein.
- Herstellung eines rekombinanten rab31-Proteins mit einem *Glutathion-S-Transferase-Tag* (GST) als Kontrollprotein zum Nachweis der Reaktivität der generierten Antikörper gegen rab31.
- Reinigung der Antikörper und Charakterisierung mittels Westernblot-Analyse sowie Test auf Eignung der Antikörper für ELISA-Anwendungen.
- Herstellung eines eukaryontischen rab31-Expressionsvektors und Nachweis der Plasmid-vermittelten rab31-Protein-Expression nach der Transfektion von eukaryontischen Zellen mittels der polyklonalen anti-rab31-Antikörper.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

<i>Chemikalie/Reagenz</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Anwendung</i>
Acrylamid-Lösung (AA), (29:1 Acrylamid: Bisacrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Protein-Elektrophorese
Agar	BD-Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	Bakterienkultur
Agarose	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland	DNA-Analyse
Agarose Ni ²⁺ -NTA Superflow	Qiagen, Hilden, Deutschland	Proteinreinigung
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Protein-Elektrophorese
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Bakterienkultur
Bacto-Trypton	BD-Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	Bakterienkultur
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Westernblot
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland	Protein-Elektrophorese
BSA (Bovines Serum Albumin)- Lösung 100 x, (NEBuffer™-Kit), ge- reinigt	NE Biolabs, Frankfurt a. M., Deutsch- land	DNA-Restriktionsverdau
BSA-Pulver > 98 %	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Zellkultur
BSA-Pulver 96 %	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Westernblot, ELISA
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Bakterienkultur
Complete™ –Protease Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mann- heim, Deutschland	GST- Reinigung
Coomassie Brilliant Blau® R250	Merck, Darmstadt, Deutschland	Protein-Färbung
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	Zellkultur
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland, München	Protein-Elektrophorese
DNA-Marker peqGOLD 1 kb DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen, Deutschland	DNA-Elektrophorese
EDTA	Fluka, München, Deutschland	Proteindialyse
Essigsäure (10 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Protein-Färbung
Ethanol (99,8 %)	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland	Protein-Färbung
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	DNA-Elektrophorese
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	Zellkultur

3. Material und Methoden

<i>Chemikalie/Reagenz</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Anwendung</i>
Geneticin G-418-Sulfat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	Zellkultur
Gentamycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Antibiotikum
Glutathion (GSGH: oxidiert, GSH: reduziert)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Protein-Dialyse
Glycerin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Trocknen von Gelen
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Westernblot
Guanidin-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Bakterien-Lyse
Harnstoff	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Puffer
HCl (Salzsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	pH-Einstellung
Hefeextrakt	BD-Biosciences, Frankin Lakes, NJ, USA	Bakterienkultur
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	Zellkultur
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Protein-Expression
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Bakterienkultur
KCl (Kaliumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Puffer
L-Arginin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Puffer
LiCl (Lithiumchlorid)	Merck, Darmstadt, Deutschland	DNA-Reinigung
Lade-Puffer Roti-Load®I, nicht reduzierend 4x	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Protein-Elektrophorese
Lade-Puffer Roti-Load®II, reduzierend 4x	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Protein-Elektrophorese
LB-Medium	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Bakterienkultur
Lipofektin®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	Zellkultur
Lysozym	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	GST-Reinigung
Magermilchpulver	Fluka, München, Deutschland	Westernblot
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland	Westernblot
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Dialyse-Puffer
Na ₂ CO ₃ (Natriumcarbonat)	Merck, Darmstadt, Deutschland	ELISA
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Puffer
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Merck, Darmstadt, Deutschland	ELISA
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck, Darmstadt, Deutschland	pH Einstellung
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Protein-Elektrophorese
Nickel ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen, Hilden, Deutschland	Protein-Affinitätsreinigung
N-Lauroylsarcosin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	GST- Reinigung
Nukleotide (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland	PCR
Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol	Merck, Darmstadt, Deutschland	DNA-Reinigung

3. Material und Methoden

<i>Chemikalie/Reagenz</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Anwendung</i>
25:24:1		
Protein-Marker I PeqGOLD (14,4-116 kDa)	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland	Protein-Elektrophorese
Rotiphorese® Gel 40 (Acrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Protein-Elektrophorese
TEMED	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Protein-Elektrophorese
Tetracyclin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Antibiotikum
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Protein-Elektrophorese
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Zelllyse
Trypanblau-Lösung	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Proteinanalyse
Trypsin	Invitrogen Gibco, Karlsruhe, Deutschland	Zellkultur
Tween®20	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Protein-Konzentrierung
Ultrapure™	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	PCR
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland	Protein-Elektrophorese

3.1.2 Puffer und Lösungen

<i>Lösung/ Puffer</i>	<i>Zusammensetzung / Herstellung</i>	<i>Anwendung</i>
Medium 2xTY	16 g Trypton; 10 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; pH 7,0; ad 1 L	Bakterienkultur
Agarose-Gel	1 %: 0,4 g Agarose in 40 ml 1xTBE-Puffer bei 100 °C gelöst und unter Rühren abgekühlt. Bei T = 50 °C Ethidiumbromid 0,25 µg/ml zugeben, in Schale gießen und erkalten lassen	DNA-Elektrophorese
Agarplatte	LB + 15 % Agar bei 100 °C gelöst und unter Rühren abgekühlt, nach Abkühlen Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml), ca. 25 ml pro Petrischale abfüllen	Bakterienkultur
Coating-Puffer	50 mM NaHCO ₃ ; 50 mM Na ₂ CO ₃ mischen bis Erreichen von pH 9,5	ELISA
Coomassie Brilliant Blau®-Färbelösung	0,1 % Coomassie Brilliant Blau® R250; 10 % Essigsäure	Protein-Färbung
Cracking-Puffer / Aufschluss-Puffer	8 M Harnstoff; 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,01 M Tris-HCl; 1 % β-Mercaptoethanol; 1 % SDS; pH 8,0	Bakterienaufschluss, Gel-Elektrophorese
BSA-Puffer aus NEBuffer™-Kit	BSA: 10 mg/ml Puffer laut Herstellerangabe: KPO ₄ ; Tris-HCL (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0.1 mM EDTA; 5 % Glycerol	DNA-Restriktionsverdau (NEB-Lieferumfang)
Dialyse-Puffer	100 mM KCl; 20 mM Hepes; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 mM MgCl ₂ ; pH 7,5	Proteindialyse

3. Material und Methoden

<i>Lösung/ Puffer</i>	<i>Zusammensetzung / Herstellung</i>	<i>Anwendung</i>
Master Mix PCR (Taq Polymerase)	5 µl 10x DNA Reaktionspuffer; 0,15 mM dNTP; jeweils 1,2 mM Primer 3' und 5'; 1 U Taq Polymerase; 1 µl DNA Template; ad 50 µl dH ₂ O	Mykoplasmen-PCR
Master Mix PCR (Herculase DNA Polymerase Fusion II®)	4 µl Herculase II <i>reaction buffer</i> ; 3,2 µl dNTP (2,5 mM je dNTP); 0,4 µl Primer (0,2 µM / Primer); 1 µl DNA Template; ad 20 µl dH ₂ O	<i>Nested</i> -PCR
Master Mix PCR (PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase®)	2 µl Puffer PfuUltra II Kit; 2 µl dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP); 0,4 µl Primer (0,2 µM/ Primer); 0,5 µl Polymerase Pfu Ultra II; 1 µl DNA Template; ad 20 µl dH ₂ O	Doppelte PCR
Fixierlösung	45 % Ethanol; 10 % Essigsäure	Protein-Färbung
Guanidin-Puffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris-HCl; 6 M Guanidin HCl; pH 8,0; ad 1 L; pH 8,0	Lyse von Bakterien für Affinitätschromatographie
DNA-Lade-Puffer	Glycerin 30 %; Bromphenolblau 0,25 %	DNA-Elektrophorese
Harnstoff-Puffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff; unmittelbar vor Gebrauch mit HCl den pH-Wert einstellen	Affinitätschromatographie mit Ni ²⁺ -NTA
Ligase-Puffer	50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM Dithiothreitol; 1 mM ATP; pH 7,5	Klonierung
LB-Medium	Bacto-Trypton 10 g; Hefeextrakt 5 g; NaCl 10 g; pH 7,0; ad 1L	Bakterienkultur
PBS	10 mM NaH ₂ PO ₄ ; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,3	Affinitätsreinigung der Antikörper
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (P:C:I) (Verhältnis 25:24:1)	gesättigt mit 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA	DNA-Reinigung
<i>Reducing</i> -Puffer (reduzierender Puffer für SDS-PAGE) (3x)	15 g SDS; 15 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8; 45 g Glycerol; 10 mg Bromphenolblau; 6 ml β-Mercaptoethanol; ad 100 ml H ₂ O; pH 6,8	Protein-Elektrophorese
SDS-PAA-Trenngel 12 %	6,5 ml H ₂ O; 3,8 ml 1,5 M Tris; 4,5 ml 40%ige Acrylamidlösung (AA); 1,5 ml 10 % SDS; pH 8,8 zum Polymerisieren: 120 µl 10 % APS; 16 µl TEMED	Protein-Elektrophorese
SDS-PAA-Sammelgel 5 %	7,2 ml 0,5 M Tris; 3,6 ml 40 % AA; 17,2 ml H ₂ O; 280 µl 10 % SDS; zum Polymerisieren: 50 µl 10 % APS; 20 µl TEMED, pH 6,8	Protein-Elektrophorese
SDS-PAGE -Laufpuffer (10 x)	Glycin 280 g; Tris 60 g; SDS 20 g; ad 2 l H ₂ O	Protein-Elektrophorese
<i>Storage</i> -Puffer	100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 0,005 % Tween-20; pH 8,0	Protein-Aufbewahrung
<i>Stripping</i> -Puffer	4,5 g Glycin; 0,3 g SDS; 3 ml Tween-20; lösen in 200 ml H ₂ O; anschließend mit HCl pH 2,2 einstellen; dann H ₂ O auf 300 ml auffüllen	Westernblot

3. Material und Methoden

<i>Lösung/ Puffer</i>	<i>Zusammensetzung / Herstellung</i>	<i>Anwendung</i>
TBE-Puffer	90 mM Tris-HCl; Borsäure 90 mM; 2,5 mM EDTA; pH 8,3	Agarose-Gel-Elektrophorese
TBS	10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5	Westernblot
TBS-T	TBS + 1 % Tween-20	Westernblot, Wasch- und Verdünnungspuffer für Antikörper
TE-Puffer	25 mM Tris-HCl; pH 7,5; 10 mM EDTA; pH 8,0	DNA-Aufbewahrung
Kathoden-Puffer	50 mM Borsäure; 5 % Ethanol ad pH 8,8	Westernblot
Entfärbelösung	10 % Essigsäure	Protein-Färbung
GST-Waschpuffer 1	0,1 M Tris; 0,5 M NaCl; 0,1 % SDS; pH 8,5	GST- Affinitätsreinigung
GST-Waschpuffer 2	0,1 M Natriumacetat; 0,5 M NaCl; 0,1 % SDS; pH 4,5	GST- Affinitätsreinigung
dNTP-Mix	360 µl H ₂ O; 10 µl dATP; 10 µl dTTP; 10 µl dCTP; 10 µl dGTP (jeweils 100 mM)	PCR
Anoden-Puffer	50 mM Borsäure; 20 % Ethanol ad pH 8,8	Westernblot
Einfriermedium	90 % (v/v) FCS 10 % (v/v) DMSO	Zellkultur
Trenn-Lösung	0,2 % (v/v) EDTA in PBS	Zellkultur
<i>Blocking</i> -Puffer	1x TBS pH 7,4; 0,1 % Tween-20; 5 % Magermilchpulver	Westernblot

3.1.3 Zelllinien und Bakterienstämme

<i>Zelllinie</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Hersteller</i>
MDA-MB-231	Humane, hochinvasive, triple negative (HR-, ER-, HER2-) <i>basal-cell-like</i> Mammakarzinom-Zelllinie	American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA)
MCF 7	Humane Mammakarzinom-Zelllinie, luminal A (ER+, PR+, HER2-)	American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA)
CAMA-1	Luminale Mammakarzinom-Zelllinie	American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA)
MDA-MB-435	Spindelzellförmige Karzinom-Zelllinie, aus einem Pleura-Erguss isoliert	American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA)
ZR-75	Humane Mammakarzinom-Zelllinie, aus Aszites isoliert	American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA)
XL1 <i>blue</i>	<i>E. coli</i> -Bakterienstamm	Agilent Santa Clara, Kalifornien, USA
M15 [pREP4]	<i>E. coli</i> -Bakterienstamm	Qiagen Hilden, Deutschland
BL21-RIPL	<i>E. coli</i> -Bakterienstamm	Agilent Santa Clara, Kalifornien, USA

3.1.4 Zellkulturmedium

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>
500 ml DMEM + GlutaMAX™	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
10 mM HEPES (1M)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
550 mM L-Arginin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
272 mM L-Asparagin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
10 % (v/v) FCS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.1.5 Primer

<i>Anwendung</i>	<i>5'</i>	<i>3'</i>	<i>Hersteller</i>
Nested PCR rab31-Do1/Up1	5' GCA CTG CCT GGC TGC GAG 3'	5' GTG GGC TCT GGC TTC TTC A3'	Metabion Martinsried nach eigenen Vorgaben <i>Annealing T</i> : 49 °C
Nested PCR rab31-Do2/Up2	5' CTG GCT GCG AGC ACA TG 3'	5' TCT GGC TTC TTC AAG TAC C3'	Metabion Martinsried nach eigenen Vorgaben <i>Annealing T</i> : 44 °C
Doppelte PCR rab31-His-B1/H1	5' GAT CCG CGA TAC GGG AGC TCA AAG 3'	5' AGC TTC AAC AGC ACC GGC GGC TGG 3'	Metabion Martinsried nach eigenen Vorgaben <i>Annealing T</i> : 57 °C
Doppelte PCR His-rab31-B2/H2	5' TTT GTG GAT CCG CGA TAC GGG AGC3'	5' TTT GTA AGC TTC AAC AGC ACC GGC 3'	Metabion Martinsried nach eigenen Vorgaben <i>Annealing T</i> : 54 °C
Doppelte PCR GST-rab31-B1/ Xh1	5' GAT CCG CGA TAC GGG AGC TCA A 3'	5' CGA GTC AAC AGC ACC GGC GGC 3'	Metabion Martinsried nach eigenen Vorgaben <i>Annealing T</i> : 55 °C
Doppelte PCR GST-rab31-B2/ Xh2	5' TTT GTT GGA TCC GCG ATA CGG GAG 3'	5' TTT GTT CTC GAG TCA ACA GCA CCG 3'	Metabion Martinsried nach eigenen Vorgaben <i>Annealing T</i> : 56 °C
Doppelte PCR RSV-rab31-H1/ Xb1	5' AGC TTA TGG CGA TAC GGG AGC TCA A 3'	5' CTA GAT TAT CAA CAG CAC CGG CGG C 3'	Metabion Martinsried nach eigenen Vorgaben <i>Annealing T</i> : 58°C
Doppelte PCR RSV-rab31-H2/ Xb2	5' TTT GTTAAG CTT ATG GCG ATA CGG 3'	5' TTT GTT TCT AGA TAA TCA ACA GCA 3'	Metabion Martinsried nach eigenen Vorgaben <i>Annealing T</i> : 50°C
Mycoplasma-PCR	5' CGC CTG AGT AGT ACG TTC GC- 3'	5' GCG GTG TGT ACA AGA CCC GA-3'	<i>High pure-Kit</i> , Roche Diag- nostics®

3.1.6 Enzyme

<i>Enzym</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Anwendung</i>
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA	PCR
Herculase DNA Polymerase Fusion II®	Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA	PCR
Rekombinante Taq-Polymerase	Invitrogen Gibco, San Diego, USA	Mykoplasmen-PCR
T4-DNA-Ligase	NE Biolabs, Frankfurt AM, Deutschland	Vektor-Ligation
Proteinase K (20 mg/ml)	NE Biolabs, Frankfurt AM, Deutschland	DNA-Aufreinigung
Pierce™ ECL (<i>enhanced chemilumnescent substrate</i>)	Thermoscientific	Westernblot
5,5'-Tetramethylbenzidin Pierce™ TMB-Substrat	Thermoscientific	ELISA

3.1.7 Restriktionsendonukleasen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Schnittstelle</i>	<i>Puffer lt. Hersteller</i>
Bam HI	NE Biolabs, Frankfurt AM, Deutschland	5'-G↓GATCC-3'	NEBuffer™ 3 + BSA
Hind III	NE Biolabs, Frankfurt AM, Deutschland	5'-A↓AGCTT-3'	NEBuffer™ 2
Xba I	NE Biolabs, Frankfurt AM, Deutschland	5'-T↓CTAGA-3'	NEBuffer™ 2 + BSA
Xho I	NE Biolabs, Frankfurt AM, Deutschland	5'-C↓TCGAG-3'	NEBuffer™ 3

3.1.8 Restriktionspuffer

<i>Puffer Bezeichnung</i>	<i>Bestandteile</i>	<i>Hersteller</i>
NEBuffer™ 2	50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9	NE Biolabs, Frankfurt AM, Deutschland
NEBuffer™ 3	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9	NE Biolabs, Frankfurt AM, Deutschland

3.1.9 Vektoren

<i>Vektor</i>	<i>Firma</i>	<i>Schnittstellen für Restriktionsenzyme</i>
pQE-30	Qiagen, Hilden, Deutschland	Bam HI, Hind III
pGEX-6P-2	GE Health Care, Little Chalfont, England	Bam HI, Xho I

3. Material und Methoden

<i>Vektor</i>	<i>Firma</i>	<i>Schnittstellen für Restriktionsenzyme</i>
pRc/RSV	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	Hind III, Xba I

3.1.10 Antikörper

3.1.10.1 Primäre Antikörper

<i>Antikörper (Bezeichnung)*</i>	<i>Antigen</i>	<i>Firma</i>	<i>Anwendung</i>
RT1-IgG, Kaninchen pAb	Humanes rab31	Eigenproduktion	WB, ELISA
RT2-IgG, Kaninchen pAb	Humanes rab31	Eigenproduktion	WB, ELISA
RT3-IgG, Kaninchen pAb	Humanes rab31	Eigenproduktion	WB, ELISA
RT4-IgG, Kaninchen pAb	Humanes rab31	Eigenproduktion	WB, ELISA
ChT1-IgY, Huhn pAb	Humanes rab31	Eigenproduktion	WB, ELISA
ChT2-IgY, Huhn pAb	Humanes rab31	Eigenproduktion	WB, ELISA
ChT3-IgY, Huhn pAb	Humanes rab31	Eigenproduktion	WB, ELISA
ChT4-IgY, Huhn pAb	Humanes rab31	Eigenproduktion	WB, ELISA

*ChT1-4: *chicken* Tier 1-4; RT1-4: *rabbit* Tier 1-4, pAb: *polyclonal antibody*

3.1.10.2 Sekundäre Antikörper

<i>Quelle</i>	<i>Antigen</i>	<i>Konjugation</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Firma</i>
Ziege	Maus-IgG	<i>horseradish peroxidase</i> (HRP)	WB ELISA	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
Ziege	Kaninchen-IgG	HRP	WB ELISA	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
Hase	Huhn-IgY	HRP	WB ELISA	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

3.1.11 Kits

<i>Kit</i>	<i>Firma</i>	<i>Verwendung</i>
NucleoSpin®Plasmid	Marchery-Nagel, Düren, Deutschland	DNA-Präparation aus Zellmaterial
The QIAexpressionist®	Qiagen, Hilden, Deutschland	Reinigung von rab31-His
Pierce® immobilized Glutathione	Thermoscientific, Waltham MA, USA	Rab31-GST- Reinigung
RNeasy®	Qiagen, Hilden, Deutschland	RNA Präparation aus Zelllysate
FastLane cell cDNA®	Qiagen, Hilden, Deutschland	Präparation der cDNA

3. Material und Methoden

<i>Kit</i>	<i>Firma</i>	<i>Verwendung</i>
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	Mykoplasmen-Test in Zellkultur

3.1.12 Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Anwendung</i>
Centrifuge Labofuge 400R	Heraeus, Hanau, Deutschland	Zentrifugation
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Zentrifugation
Compact XS/S gel electrophoresis	Biometra, Göttingen, Deutschland	DNA-Elektrophorese
ELISA Reader	SLT Spectra, Crailsheim, Deutschland	Photospektrometer
Thermocycler®/Labcycler®	Sensoquest, Göttingen, Deutschland	PCR
pH-Meter	Schott, Mainz, Deutschland	pH Einstellung
Power supply BLUE POWER 500	Serva, Heidelberg, Deutschland	Elektrophorese
Power supply EV 231	Consort, Turnhout, Belgien	Elektrophorese; Westernblot
Purelab classic	Elga GmbH, Wien, Österreich	Wasseraufbereitung
REAXtop	Heidolph, Schwabach, Deutschland	Schüttler
Rotator	Brand, Wertheim, Deutschland	Mischung von Reaktionslösungen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Heizblock und Mischung
Ultrasonic Handsonde	Biometra, Göttingen, Deutschland	Zellaufschluss
UV Transiluminator	Biometra, Göttingen, Deutschland	Gel-Dokumentation
Xcell Sure Lock	Invitrogen Gibco, Carlsbad, USA	Protein-Elektrophorese

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der Expressionsplasmide

3.2.1.1 cDNA von rab31

Die Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 wurde auf 12-Napf-Mikrotiterplatten kultiviert (Protokoll siehe Kapitel 3.2.7.), anschließend nach der Herstelleranweisung für das FastLane cell cDNA®-Kits (Qiagen) lysiert und die cDNA synthetisiert. Zur Amplifikation der rab31-Sequenz aus dieser Gesamt-cDNA wurde eine *nested*-PCR durchgeführt. Die verwendete Zelllinie, die Polymerasen, die Primer rab31-Do1 und 2 sowie Up1 und 2 und der Mastermix werden in den Kapitel 3.1.3, 3.1.4 und 3.1.5 beschrieben. Die Primer (0,1 mM) wurden 1:10 mit Ultrapure™ destilliertem, DNase/RNase-freiem Wasser (dH₂O) und die

cDNA wurde 1:5 mit dH₂O verdünnt. Die erste PCR wurde unter Verwendung der cDNA aus MDA-MB-231 als *template* und Do1 und Up1 als Primer nach Hersteller-Angaben des Hercules DNA Polymerase Fusion II®-Kits im Thermocycler® unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen thermalen Profils mit einer *annealing*-Temperatur von 49 °C (25 Zyklen) durchgeführt. Anschließend wurde eine zweite PCR unter Verwendung des Endproduktes der ersten PCR als *template* der zweiten PCR mit den Primern Do2 und Up2 mit einer *annealing*-Temperatur von 44 °C (25 Zyklen) unter Verwendung des restlichen thermalen Profils des Herstellerprotokolls durchgeführt.

Zur Kontrolle der PCR wurden die cDNA und der Marker 1 kb DNA-Leiter PeqGOLD (Peqlab) im 1 %igen Agarose-Gel im elektrischen Feld (90 V, 50 min) in TBE-Puffer (90 mM Tris-HCl; Borsäure 90 mM; EDTA 2,5 mM; pH 8,3) aufgetrennt und anschließend im Ethidiumbromid (EtBr)-TBE-Bad mit 0,25 µg/ml EtBr gefärbt. Danach wurde die EtBr-Emission im UV-Licht detektiert. Die zu erwartende Größe von 600 bp der rab31-DNA konnte somit verifiziert werden.

3.2.1.2 *Extension des rab31-Templates mittels doppelter PCR*

Polymerasen, Primer, *annealing*-Temperaturen und Mastermix werden in den Kapiteln 3.1.2 und 3.1.3. beschrieben. Als *template* diente das Produkt aus der *nested*-PCR, das die aus MDA-MB-231-Zellen gewonnene Volllänge-sequenz von rab31 enthielt. Mit der PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase® wurde eine doppelte PCR unter Verwendung des thermalen Profils des Herstellerprotokolls durchgeführt, wobei die *annealing*-Temperatur angepasst wurde. Auf 10 Zyklen mit einer *annealing*-Temperatur von 37 °C folgten 15 Zyklen bei 57 °C im ersten PCR-Durchgang und auf 10 Zyklen bei 37 °C folgten 15 Zyklen bei 54 °C im zweiten PCR-Durchgang. Die doppelte PCR wurde wiederholt, um DNA-Fragment mit bestimmten Kombinationen von Schnittstellen zu erzeugen (Bam H1 und Hind III; Bam H1 und Xba I). Dazu wurden Primer mit den entsprechenden Sequenzanhängen am 5'-Ende verwendet.

3.2.1.3 *DNA-Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol*

DNA und Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (P:C:I) wurden im Verhältnis 1:1 mit einem Vortex-Gerät gemischt. Nach Zentrifugation des Gemisches (3 min, 14000 rpm, Biofuge) wurde die obere DNA-haltige, wässrige Phase mit einer Pipette abgenommen und anschließend wurde die DNA mit Proteinase K zur weiteren Reinigung der DNA inkubiert. Dazu

wurden 180 µl der wässrigen DNA-Phase mit 4 µl Proteinase K (20 mg/ml) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch Erhitzen auf 68 °C für 10 min inaktiviert. Nach dem Abkühlen der Probe (5 min bei 4 °C) wurde zur Entfernung von Proteinresten erneut eine P:C:I-Extraktion durchgeführt (siehe oben).

Es folgte eine Ethanol-Fällung mit 2 x Vol. 100 % Ethanol (EthOH) und 1/10 Vol. 4 M LiCl für 10 min bei 4 °C. Durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm bei 4 °C, Biofuge) wurde die ausgefallene DNA pelletiert und der Überstand wurde entfernt. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 300 µl 70 %igem und unvergälltem Ethanol nochmals gewaschen, um Phenol-Reste und Salze (LiCl) zu entfernen. Schließlich wurde das DNA-Pellet im Vakuum getrocknet und bei -20 °C für weitere Analysen aufbewahrt.

3.2.1.4 Restriktion der DNA

Vor der geplanten Ligation eines DNA-Produkts in einen Vektor ist das Schneiden und Reinigen beider Bestandteile (Vektor und Insertion) notwendig. Dazu wurde die Konzentration der Vektoren zunächst photometrisch bestimmt und das notwendige Volumen für eine Soll-Masse von 2 µg Vektor berechnet. Für 1 µg DNA wurden 20 U der Restriktionsenzyme für einen Ansatz von 100 µl verwendet.

Für den Verdau des Vektors pQE-30 wurde auf Eis ein Ansatz von 20 µl pQE-30 (0,1 µg/ µl) mit 2 µl Bam HI (20 U/µl), 2 µl Hind III (20 U/µl), 10 µl NEBuffer™ 2, 1 µl BSA 100 x (Lieferumfang NEBuffer™, 10 mg/ml) und 65 µl H₂O hergestellt und anschließend bei 37 °C für 3 h im Heizblock inkubiert. Für den Verdau der rab-31-Fragments wurde zu dem getrockneten Pellet auf Eis ein Ansatz von 5 µl NEBuffer™ 2, 2 µl Bam HI (20 U/µl), 2 µl Hind III (20 U/µl), 0,5 µl BSA 100 x und 40,5 µl H₂O pipettiert und anschließend wurde das Gemisch für 3 h bei 37 °C auf dem Heizblock inkubiert.

Der Transformationsvektor pGEX-6P-2 (1.9 µg/µl) wurde mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Xho I geschnitten: Dazu wurde ein Ansatz von 2 µl pGEX-6P-2 (3,8 µg) mit 3 µl Bam HI (20 U/µl), 3 µl Xho I (20 U/µl), 10 µl NEBuffer™ 3, 10 µl BSA 100 x und 72 µl H₂O bei 37 °C für 3 h im Heizblock inkubiert. Für das zugehörige rab31-Fragment wurde zum getrockneten Pellet der Restriktionsansatz von 5 µl Puffer, 3,5 µl BSA 100 x, 2 µl Bam HI (20 U/µl), 2 µl Xho I (20 U/µl) und 36 µl H₂O auf Eis pipettiert und die Mischung wurde dann für 3 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert.

In gleicher Weise wurde der Transfektionsvektor pRc/RSV (0,33 µg/µl) nach Herstellerangaben mit den Restriktionsenzymen Hind III (20 U/µl) und Xba I (20 U/µl) geschnitten: 6 µl Vektor (1,98 µg), 10 µl NEBuffer™ 2, 10 µl BSA 100 x, 3 µl Hind III, 3 µl Xba I, 68 µl H₂O und die zugehörige rab31-Insertion mit 5 µl Puffer, 2,5 µl BSA 100 x, 2 µl Hind III, 2 µl Xba I und 36 µl H₂O wurden angesetzt und anschließend wie vorher beschrieben bei 37 °C für 3 h im Heizblock inkubiert.

3.2.1.5 *Reinigung der DNA mittels Gel-Elektrophorese*

Nach den Restriktionsverdauen wurden die geschnittenen Fragmente für jedes herzustellende Plasmid (Fragment für pQE-30, pGEX-6P-2, pRc/RSV) jeweils durch eine Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt, um Verunreinigungen in der Plasmid-Präparation zu entfernen. Dazu wurden für jedes Fragment (rab31 mit der passenden Schnittstelle) jeweils 50 µl des Ansatzes vom Restriktionsverdau (Produkt von 3.3.6) auf einem 1 %igen Agarose-Gels getrennt (80 V, 30 min, 1 kb-Marker, TBE-Puffer: 90 mM Tris-HCl; Borsäure 90 mM; EDTA 2,5 mM; pH 8,3) und unter Zugabe von 0,25 µg/ml Ethidiumbromid im UV-Licht visualisiert. Die rab-31-Bande (ca. 600 bp) wurde daraufhin mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend für 20 min in 0,3 M NaAc, 1 mM EDTA, pH 7,0 in einem 1,5 ml Gefäß bei RT inkubiert. Das Gel-Stück wurde dann mit einer Pipette in einen Costar Spin-X® Zentrifugen-Filter (Vitaris, Baar) überführt und dreimal für je 20 min abwechselnd bei -80 °C und bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Probe für 15 min bei 10000 x g (Biofuge Fresco, Heraeus) zentrifugiert. Während sich das Gel dabei im Filter sammelte, konnte die isolierte DNA anschließend in der löslichen Phase am Boden gewonnen werden.

Zur weiteren Aufreinigung wurde die DNA erneut einer P:C:I-Extraktion (siehe Kapitel 4.3.5) unterzogen, anschließend mit EthOH gefällt und in H₂O aufgenommen.

3.2.1.6 *Ligation*

Die DNA-Konzentrationen der Vektoren pQE-30, pGEX-6P-2, pRc/RSV zusammen mit den Aliquots der zugehörigen Fragmente wurden anhand der Konzentration des 1 kb Markers mittels Gel-Elektrophorese abgeschätzt. Danach wurde die Vektor-DNA (50 ng) mit dem rab31-Fragment (250 ng) im ATP-haltigen Ligase-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 1 mM ATP, pH 7,5) gemischt. Die Ligation wurde durch Zugabe von T4-DNA-

Ligase gestartet (Endvolumen von 20 µl) und für 2 h bei 25 °C im Wasserbad durchgeführt. Schließlich wurde die DNA bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.1.7 Transformation von *E. coli*

Zunächst wurden kompetente Bakterien-Zellen (*E. coli* XL1 blue strain) langsam (ca. 20 min) auf Eis aufgetaut. Während der Vorbereitung der Transformation wurden alle Ansätze auf Eis pipettiert. Vom Ligationsansatz wurden 8 µl zu 30 µl TE-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA, pH 8,0) pipettiert. Danach wurden 80 µl kompetente *E. coli* zugegeben und sanft gemischt. Der Ansatz wurde 25 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz in einem Heizblock für 105 sec auf 37 °C erwärmt. Bei dieser Temperatur erfolgt der Durchtritt des Plasmids durch die Bakterienmembran ins Zellinnere. Sofort danach wurde der Ansatz für 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde 1 ml 2 x TY-Medium zugegeben und der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation (1000 x g, 1 min, RT) wurde der Überstand bis auf 200 µl verworfen und das Pellet, das die transformierten Bakterien enthielt, wurde in diesem Rest resuspendiert. Schließlich wurden die transformierten Bakterien auf ampicillinhaltigen (100 µg/ml) Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Selektiert wurden die Bakterien, die die Plasmidvektoren und somit das enthaltene Ampicillin-Resistenz-Gen aufgenommen haben. Am nächsten Morgen wurden dann jeweils acht Klone für weitere Analysen ausgewählt.

3.2.1.8 Plasmid-Minipräparation

Die Plasmid-DNA wurde aus den Bakterien mit dem Mini-Präparationskit NucleoSpin® von Macherey Nagel isoliert. Dazu wurden 8 ausgewählte Klone der Transformation pro Agarplatte in je 5 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin im Inkubator bei 37 °C in einer Übernachtskultur (ÜNK) vermehrt.

Am nächsten Tag wurden 2 x 2 ml der ÜNK zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die DNA wurde aus dem Zellpellet gemäß den Herstellerangaben aus dem Protokoll NucleoSpin®-Plasmid extrahiert. Die Elution der DNA aus der NucleoSpin®-Säule wurde wiederholt, um den Ertrag zu erhöhen. Anschließend wurde die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt.

3.2.1.9 Restriktionsanalyse der Plasmide

Die Klonierungen wurden mittels Restriktionsanalyse überprüft. Hierbei wurden die gereinigten Plasmide mit den jeweils vom Hersteller empfohlenen Restriktionsansätzen (Mastermix) inkubiert. Dabei wurden von pQE-30-rab31 700 ng, von pGEX-6P-2-rab31 400 ng und von pRc/RSV-rab31 900 ng eingesetzt.

Für pQE-30-rab31 wurde folgender Restriktionsansatz vorbereitet: 56,5 µl H₂O, 25 µl NEBuffer™ 2, 2,5 µl BSA 100 x, 8 µl Bam HI, 8 µl Hind III. Es wurden 6 µl pQE-30-rab31 (122 ng/µl) mit 4 µl Restriktionsansatz für 1 h im Heizblock bei 37 °C inkubiert.

Für pGEX-6P-2-rab31 wurde ein Restriktionsansatz aus 11 µl H₂O, 8 µl NEBuffer™ 3, 8 µl BSA 100 x, 2,5 µl Bam HI und 2,5 µl Xho I präpariert und jeweils 4 µl pGEX-6P-2-rab31 (55 ng/µl) wurden mit 6 µl dieses Ansatzes inkubiert. Für pRc/RSV-rab31 wurde der Restriktionsansatz mit 11 µl H₂O, 8 µl NEBuffer™ 2, 8 µl BSA 100 x, 2,5 µl Hind III und 2,5 µl Xba I zubereitet und jeweils 8 µl pRc/RSV-rab31 (246 ng/µl) wurden mit 2 µl Restriktionsansatz inkubiert.

Nach dem Verdau wurden 10 µl des Restriktionsansatzes auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um das Vorhandensein der Inserts zu überprüfen.

3.2.1.10 Sequenzierung der Plasmide

Nach der Konzentrationsbestimmung und der Reinheitsanalyse der DNA mittels Spektralphotometrie wurde die Sequenzierung von pQE-30-rab31, pGEX-6P-2-rab31 und pRc/RSV-rab31 von der Firma Eurofins® in Martinsried durchgeführt.

3.2.2 Herstellung eines rekombinanten rab-31-His Fusionsproteins

3.2.2.1 Expression des rab31-Gens in *E. coli*

Aufgrund von Test-Transformationen und -Expressionen von den *E. coli* Stämmen M15 [pREP4], XL1 *blue* und BL21-RIPL mit pQE-30-rab31 wurde für die rab31-His-Protein-Expression der *E. coli* Stamm M15 [pREP4] gewählt. *E. coli* M15 [pREP4] wurden mit pQE-30-rab31 transformiert. Dazu wurden 30 ng pQE-30-rab31 aus der oben beschriebenen Mini-Prep mit TE verdünnt (20 µl der Plasmid-Lösung und 60 µl TE auf dem Vortex-Gerät gemischt). Anschließend wurden 20 µl dieser Verdünnung in autoklavierte Eppendorf®-Gefäße gegeben und 40 ml *E. coli* M15 [pREP4] wurden zugegeben. Der Ansatz wurde 25 min auf

Eis inkubiert. Dann wurde ein Hitzeschock für 105 sec bei 37 °C im Heizblock durchgeführt und die Lösung wurde anschließend wieder für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden jeweils 500 µl LB Medium zugegeben und die Proben wurden durch Schwenken gemischt. Nach 1 h Inkubation im Heizblock bei 37 °C wurden die Proben zusammen mit 4 ml LB-Medium und 4,5 µl Ampicillin in Falcon-Röhrchen überführt. Zu den M15 [pREP4]-Zellen wurden zusätzlich 4,5 µl Kanamycin gegeben. Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert.

3.2.2.2 Expressionskontrolle

Zur Überprüfung der Protein-Expression nach der Transformation wurde eine Expressionsanalyse durchgeführt. Dafür wurde am nächsten Tag eine 1:100 Verdünnung der Übernachtskultur der transformierten *E. coli* M15 [pREP4] in 3 ml 2 x TY-Medium angesetzt und bei 37 °C und 200 rpm im Brutschrank bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ≈ 0,7 inkubiert.

Durch Zugabe von Isopropyl-β-D-Thio-Galactosidase (IPTG) (Endkonzentration = 2 mM) wurde die Protein-Expression initiiert. Nach den Inkubationszeiten von 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 20 h wurden Proben der Kultur (400 µl) entnommen. Diese wurden zentrifugiert (1 min, 13000 rpm; Biofuge fresco, Heraeus) und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl *Cracking*-Puffer (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 Tris-HCl, 1 % Mercaptoethanol, 1 % SDS; pH 8,0) und 20 µl *Reducing*-Puffer (15 g SDS; 15 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8; 45 g Glycerol; 10 mg Bromphenolblau; 6 ml β-Mercaptoethanol; ad H₂O 100 ml, pH 6,8) gelöst, während 3 min auf 95 °C erhitzt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Dann wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt.

3.2.2.3 SDS-Gel-Elektrophorese

Die Gele wurden jeweils am Vortag jeder Analyse hergestellt. Zum Gießen der SDS-Gele zwischen Glasplatten wurde zuerst Trenngel (12 % PAA, siehe Kapitel 4.1.2) bis zur Höhe der Aussparung im Halter gegossen (ca. 4,5 ml) und sofort mit 70 % EthOH überschichtet. Nach dem Erstarren des Trenngels wurde der Alkohol abgegossen und Sammelgel (5 % PAA, siehe Kapitel 4.1.2) bis zum Rand aufgefüllt. Trennkämme wurden blasenfrei hineingesteckt und die Füllhöhe des Sammelgels adaptiert. Zum Beladen wurde eine Proteinprobe von 20 µl zusammen mit 6 µl Ladebuffer Roti®-Load I und Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1

% SDS) zur Volumen Anpassung aufbereitet. Von dem Protein-PeqGOLD® I Marker (11,4 bis 116 kDa) wurden 10 µl in 10 µl H₂O und 6 µl 4x RED *loading*-Puffer aufgetragen. Die denaturierten Proben (95 °C, 5 min) wurden danach im Laufpuffer (100 V, 20 min, dann 150 V, 1 h) aufgetrennt (siehe 4.1.2).

Die aufgetrennten Proteine im SDS-Gel wurden anschließend in Färbelösung mit Coomassie Brilliant Blau® (0,1% Coomassie Brilliant Blau® R250; 10 % Essigsäure) gefärbt, das an kationische und unpolare Seitenketten der Aminosäuren bindet. Dazu wurde das Gel zunächst für 20 min in Fixierlösung (45 % Ethanol; 10 % Essigsäure) inkubiert. Die Essigsäure fixiert die Proteine im SDS-Gel. Anschließend wurde zweimal mit Wasser gewaschen und dann mindestens für 1 h mit Coomassie Brilliant Blau® gefärbt. Durch Schütteln der Gele in Entfärbelösung (10 % Essigsäure) wurde der Hintergrund sanft entfernt. Anschließend wurden die Gele zunächst in Trockenlösung geschwenkt und dann im Ofen zwischen Zellophanfolien über 2 h getrocknet.

Bei der Expressionskontrolle wurden Klone ausgewählt, die eine deutlich sichtbare Bande auf der Höhe der erwarteten 25 kDa aufwiesen, die aus dem Hintergrund des Gesamtproteins deutlich herausragte. Dies entsprach der Größe des rab31-His-Proteins (26 kDa) und wies damit auf eine hohe Produktion von rab31-Protein durch die Zelle hin, was für eine erfolgreiche Transformation des rab31-Vektors spricht. Der Klon von M15 [pREP4] mit der höchsten Proteinexpression wurde für weitere Experimente ausgewählt und eine Dauerkultur angelegt. Dafür wurde eine Übernachtskultur angelegt, am nächsten Tag abzentrifugiert (8000 x g, 5 min, RT, Varifuge) und anschließend mit 15 % Glycin resuspendiert und bei -80 °C tiefgefroren.

3.2.2.4 Herstellung von rab31-His in *E. coli*

Zur Protein-Expression wurde eine Kultur aus den ausgewählten Klonen von *E. coli* M15 [pREP4]-pQE-30-rab31 der ÜNK (1 ml) in 50 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin hergestellt. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 wurde die Kultur mit IPTG (Endkonzentration 2 mM) induziert und bei 37 °C für 3 h inkubiert. Anschließend wurde die Kultur zentrifugiert (5 min, 8000 x g, RT; Varifuge) und der Überstand wurde verworfen. Das Zell-Pellet wurde bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Zum Zellaufschluss wurde das Zell-Pellet der [pREP4]-pQE-30-rab31-ÜNK resuspendiert und in 8 ml Guanidinpuffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl; 6 M Guanidin HCl; pH 8,0; ad 1 L H₂O; pH 8,0) mit Mercaptoethanol (8 mM) über Nacht bei 4 °C unter ständigem Drehen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe abzentrifugiert (15 min, 10000 x g, 4 °C, Varifuge), der proteinhaltige Überstand wurde entnommen und mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

Anschließend wurde die Säule vorbereitet, indem zu den 40 ml des Überstandes 6 ml 50 % Agarose Ni²⁺-NTA-Superflow zugegeben wurden und das Gemisch für 45 min bei RT inkubiert wurde. Danach wurde die Säule senkrecht aufgestellt. Nachdem sich die Agarose in der Säule abgesetzt hatte, wurde in verschiedenen Schritten mit Waschpuffer gewaschen. Begonnen wurde mit 40 ml Guanidinpuffer pH 8,0 + Mercaptoethanol (8 mM), anschließend wurde mit 40 ml 8 M Harnstoffpuffer (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris; 8 M Harnstoff) + Mercaptoethanol (8 mM) mit jeweils absteigendem pH gewaschen (pH 8,0; pH 7,0; pH 6,4; pH 5,9). Danach wurden die Elutionsschritte mit Harnstoffpuffer mit absteigenden pH-Werten durchgeführt. 10 ml 8 M Harnstoffpuffer mit 8 mM Mercaptoethanol, pH 5,4; 10 ml 8 M Harnstoffpuffer mit 8 mM Mercaptoethanol, pH 4,5; 40 ml 8 M Harnstoffpuffer mit 8 mM Mercaptoethanol, pH 4,0. Der letzte Schritt wurde zweimal wiederholt. Der Erfolg der Reinigung und Elution wurde mittels SDS-Page kontrolliert und dokumentiert.

3.2.2.6 Dialyse von rab31-His in Harnstoffpuffer gegen PBS und Konzentrierung

Rab31-His wurde gegen Dialyse-Puffer (100 mM KCl, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, pH 7,5) dialysiert. Dazu wurden Dialyseschläuche mit semipermeabler Membran der Firma SpectraPor® mit dem Ausschlussvolumen MWCO (*molecular weight cut-off*) 12-14000 Da verwendet. Die Dialyse erfolgte gegen 1 l Dialysepuffer unter Rühren über 48 h bei 4 °C, wobei der Dialysepuffer nach 24 h einmal erneuert wurde. Anschließend wurde die rab31 enthaltende Lösung abzentrifugiert (2 x 20 min, 4 °C, 10000 x g) und der Überstand mit dem rab31-Protein wurde entnommen. Die Konzentration des dialysierten rab31-Proteins wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert und das Protein wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Konzentrierung der rab31-Lösung nach der Dialyse wurde mittels Zentrifugationsfilter durchgeführt. Dazu wurde die Lösung in Millipore® Amicon-Ultra15-Tubes überführt und

durch mehrmaliges Zentrifugieren bei 4 °C und 2000 rpm (900 x g) in der Varifuge für 10 min von 45 ml auf ca. 10 ml eingengt. Der Erfolg wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

3.2.3 Rekombinante Herstellung eines GST-rab31-Fusionsproteins

Das Zellpellet auf Eis aufgetaut, in Lysepuffer (STE-Puffer + Lysozym) auf Eis resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 150 µl Lösung einer Tablette Protease Inhibitor complete™ (Roche Diagnostics) in 50 ml H₂O versetzt und es wurden 2 mM DTT + 550 µl N-Lauroylsarcosin zugegeben. Zum Aufschließen der Bakterien wurden sie mit Ultraschall (Ultrasonic® Handsonde) mit einer Amplitude von 10 % behandelt. Der Ansatz wurde abwechselnd 10 sec beschallt und 10 sec auf Eis gekühlt, um eine Maximaltemperatur von 15 °C nicht zu überschreiten. Unlösliche Zellbestandteile wurden anschließend mittels Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 x g für 10 min pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abpipettiert und bei -20 °C eingefroren.

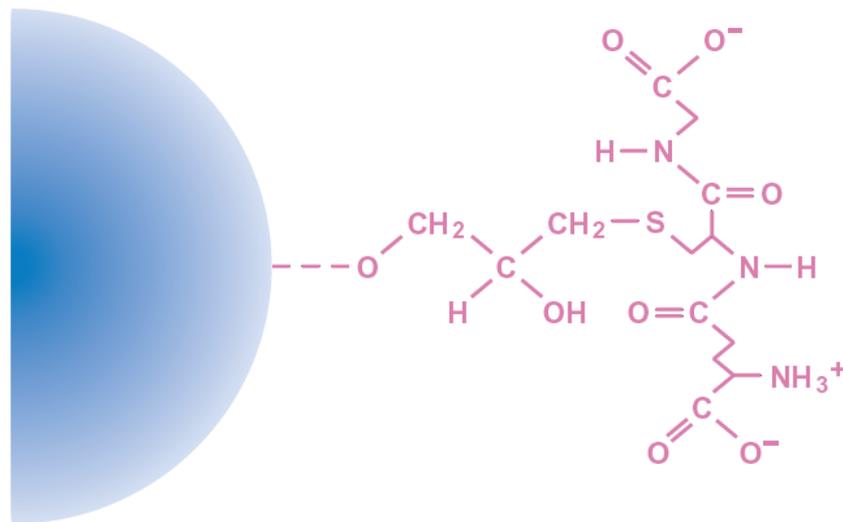


Abb. 9: Schematische Darstellung und chemische Struktur von an Agarose immobilisiertem Glutathion.

Zur Aufreinigung von GST-rab31 aus dem zellulären Lysat wurde an Agarose immobilisiertes Glutathion (Pierce® *immobilized Glutathione*) verwendet (Abb. 9). Dazu wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut, anschließend für 5 h auf dem Schüttler inkubiert und mit 1 % (Endkonzentration) Triton-X100 vermischt. Zum Waschen des Säulenmaterials wurden 2 ml einer 50%igen Agarose-Glutathion-Suspension in ein 50 ml Gefäß pipettiert und mit 5 ml GST-

Waschpuffer 1 (siehe Kapitel 3.1.2) gemischt. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (4 °C, 10 min, 500 x g), der Überstand wurde verworfen und der Vorgang wurde wiederholt. Daraufhin wurde der gleiche Vorgang mit GST-Waschpuffer 2 (siehe Kapitel 3.1.2) zweimal durchgeführt. Dann wurde das Lysat zur Agarose-Glutathion-Suspension gegeben und das Gefäß wurde auf dem Rad bei RT für 1 h rotiert. Danach wurde erneut wie oben zentrifugiert und der Überstand wurde abpipettiert und eingefroren. Es folgten 4 weitere Waschschrte mit jeweils 5 ml Waschpuffer. Die Proben aller Waschschrte wurden eingefroren. Anschließend erfolgte die Elution des GST-rab31-Proteins mit einem Puffer, der reduziertes Glutathion enthält. Dieser wurde mit der Agarose-Glutathion-Suspension gemischt und dann für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß eingefroren. Dieser Vorgang wurde für die zweite Elution wiederholt. Für die dritte Elution wurden 3 ml Elutionspuffer zur Agarose-Glutathion-Suspension gegeben und das Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C rotiert. Anschließend rotierte das Gemisch noch 30 min bei RT. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und eine vierte Elution bei RT nach 1-2 h Inkubation durchgeführt. Auf einem SDS-Gel wurde der Erfolg der GST-rab31-Reinigung kontrolliert und dokumentiert.

3.2.4 Herstellung der Antikörper

3.2.4.1 Immunisierung

Die Immunisierungen wurden in Berlin von der Firma Pineda®-Antikörperservice mit dem rab31-His-Fusionsprotein in einer Konzentration von 100 µg/ml durchgeführt. Das rab31-His-Antigen wurde in den Brustmuskel von Hühnern und Kaninchen injiziert. Die Seren wurden von Pineda®-Antikörperservice gegen Protein A affinitätsgereinigt. Die Eier wurden gesammelt und in München wurden aus dem Eidotter die Antikörper isoliert.

3.2.4.2 Reinigung der Antikörper aus dem Eidotter (Dextran-Sulfatfällung)

Aus den gesammelten Eidottern wurden die Antikörper nach dem Protokoll von Magdolen et al. (1995) isoliert und von Lipoproteinen und Endotoxinen gereinigt. Es wurde eine 1:5 Verdünnung aus dem abgetrennten Eidotter in 10 mM Tris-HCl und 140 mM NaCl, pH 7,4 (TBS) hergestellt. Diese Verdünnung wurde bei RT 20 min mit einer Geschwindigkeit von 7000 x g zentrifugiert. Durch Zugabe von Dextransulfat (0,6 % Endkonzentration) und CaCl₂ (Endkon-

zentration: 150 mM) zum Überstand wurden die Lipoproteine ausgefällt. Anschließend wurden die Antikörper durch eine Ammoniumsulfat-Fällung (Verhältnis 1:1) gereinigt, in TBS gelöst, über Nacht in 1 l TBS unter Rühren dialysiert und mittels Westernblot (110 mA, 2,5 h) analysiert (Magdolen et al., 1995).

3.2.4.3 Affinitätsreinigung der Antikörper mit GST-rab31

Zum Binden des GST-rab-31 wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (0,1 mg Protein/1 cm² PVDF-Membran) mit Ethanol beträufelt und mit TBS und Dialysepuffer gewaschen. Die befeuchtete Membran wurde anschließend mit 2,5 ml Serum in der Konzentration 100 µg/ml für 2 h bei RT unter ständigem Drehen auf dem Rad inkubiert.

Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Membranen wurden zunächst zweimal für 5 min mit jeweils 4 ml TBS und dann zweimal für 5 min mit 4 ml PBS gewaschen. Danach wurde mit 3 % BSA in TBS blockiert.

Zum Binden des Antikörpers wurden die von der Firma Pineda®-Antikörperservice gelieferten mit Protein A affinitätsgereinigten Seren mit TBS 1:5 verdünnt auf der Membran verteilt. Die Membranen wurden in 14 ml Falcon-Röhrchen auf dem Schüttler 3,5 h bei RT zur Bindung der Antikörper an das GST-rab31-Antigen inkubiert.

Danach wurden unspezifische Antikörper in den folgenden Waschschrritten mit jeweils 4 ml TBS (2 x 5 min) und 4 ml PBS (2 x 5 min) entfernt. Nach dem Blockieren mit 3 % BSA in TBS auf dem Schüttler wurde der rab31-His-Antikörper anschließend eluiert. Dazu wurde die Membran mit 0,4 ml Glycin/HCl (Glycinpuffer, pH 2,0) für 5 min unter Mischen inkubiert, der Überstand wurde abgenommen und der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Schließlich wurde das Eluat mit 1 M Tris-Cl pH 8,0 neutralisiert und die Aufreinigung mittels Westernblot (110 mA, 2,5 h) überprüft.

3.2.5 ELISA

3.2.5.1 One-sided ELISA

Für den *one-sided* ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) wurde eine 96-Napf-Mikrotiterplatte mit 100 µl/Napf rekombinantem rab31 Protein (1 µg/ml) verdünnt in Karbonatpuffer (pH 9,6) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde dreimal mit TBS + 0,05 % Tween-20 gewaschen und anschließend wurde mit 200 µl

TBS + 2 % (w/v) BSA pro Napf für 1 h bei RT blockiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS + 0,05 % Tween-20 wurde der erste Antikörper (RT1-4-IgG oder ChT1-4-IgY) in verschiedenen Testkonzentrationen von 1:1000 bis 1:5000 verdünnt in TBST + 0,5 % (w/v) BSA pro 100 μ l/Napf zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit TBS + 0,05 % Tween-20 und dann wurden 100 μ l des zweiten, *horseradish-peroxidase*-konjugierten, Antikörpers (Detektions-Antikörper) in den folgenden Verdünnungen zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert: Für ChT1-4-IgY-rab31: *anti-chicken-HRP* von SIGMA: 1:30000; für RT1-4-IgG-rab31: *anti-rabbit-HRP* von DIANOVA: 1:10000; als Kontrolle: *anti-mouse-HRP* von DIANOVA: 1:10000. Anschließend wurde wieder dreifach mit TBS + 0,05 % Tween-20 gewaschen und dann wurde 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat (TMB, Pierce™) nach Herstellerangaben zugegeben. Nach dem Stoppen der Reaktion wurde die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader (SLT Spectra) gemessen (Abb. 10).

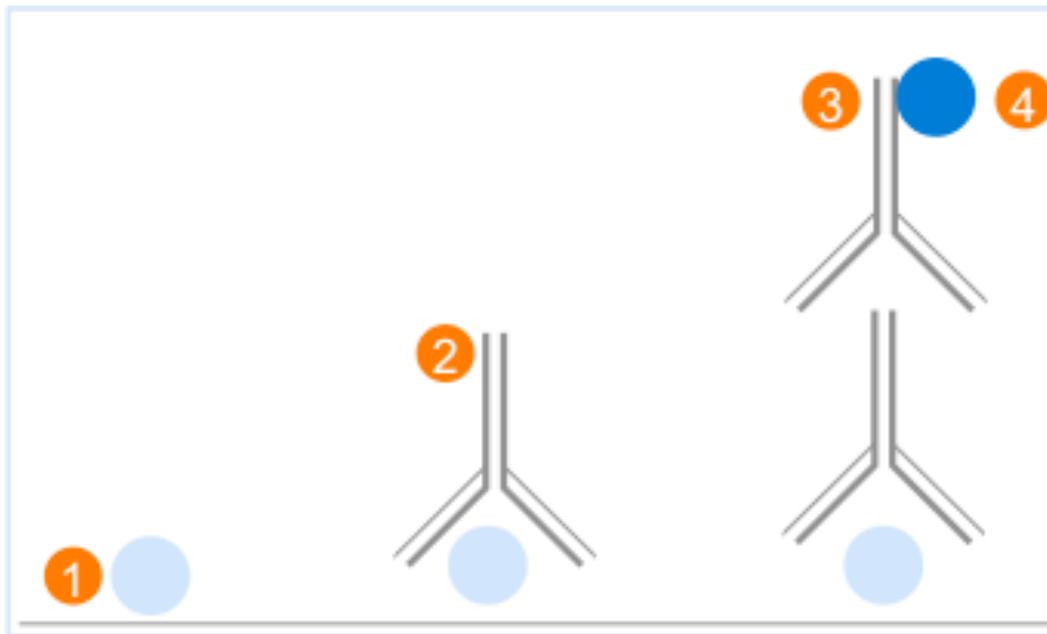


Abb. 10: Schematische Darstellung des *one-sided* ELISAs

1) Antigen-Bindung (z. B. rab31-His oder GST-rab31) mit anschließender Blockade von ungebundenen/freien Bindungsstellen mit BSA. 2) Bindung des ersten Antikörpers (anti-rab31) 3) Bindung des zweiten Antikörpers (Detektions-Antikörper), der den Fc-Teil des ersten Antikörpers erkennt (z. B. anti-rabbit) und ein Farbenzym (z. B. *horseradish-peroxidase*) gebunden hat. 4) Detektierbare Farbreaktion: Nach Zugabe des Substrates Pierce™ TMB wird eine Chemilumineszenz-Reaktion ausgelöst (Farbumschlag von blau nach gelb), die im Photometer (ELISA-Reader) quantitativ ausgewertet werden kann.

3.2.5.2 Sandwich-ELISA

Für den *sandwich*-ELISA (Abb. 11) wurden 96-Napf-Mikrotiterplatten mit 100 µl *capture*-Antikörper (RT1-4-IgG oder ChT1-4-IgY) in den Verdünnungen 1:1000 und 1:2000 in Karbonatpuffer (pH 9,6) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde dreimal mit PBS + 0,05 % Tween-20 gewaschen. Anschließend wurden 100 µl von vorbestimmten Konzentrationen des rekombinanten Proteins verdünnt mit 0,5 % (w/v) BSA in TBS + 0,05 % Tween-20 aufgetragen und für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS + 0,05 % Tween-20 wurde mit 100 µl *Catching*-Antikörper (RT1-4-IgG oder ChT1-4-IgY) in den Verdünnungen von 1:1000 bis 1:4000 in 0,5 % (w/v) BSA in TBS + 0,05 % Tween-20 für 1 h bei RT inkubiert. Nach Waschen mit TBS + 0,05 % Tween-20 wurde ein HRP-konjugierter Detektionsantikörper zugegeben (Verdünnung: *anti-chicken*-HRP von SIGMA: 1:30000; *anti-rabbit*-HRP von DIANOVA: 1:10000; *anti-mouse*-HRP von DIANOVA: 1:10000) und nach weiteren drei Waschschritten wurde TMB nach Herstellerangaben zugegeben. Durch Zugabe von 50 µl 0,5 M H₂SO₄ wurde das Signal verstärkt. Im ELISA-Reader (SLT Spectra) wurden die Absorptionswerte bei 450 nm bestimmt.

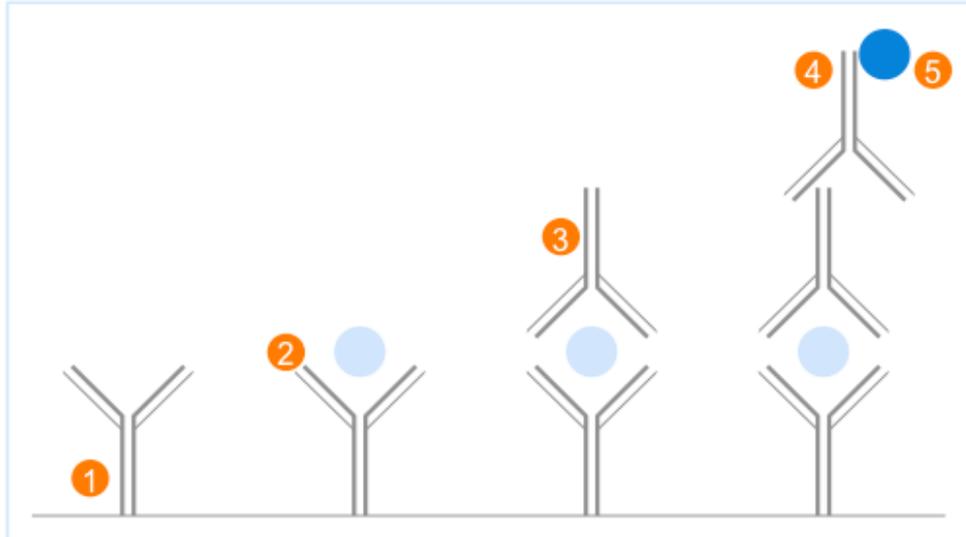


Abb. 11: Schematische Darstellung des *sandwich*-ELISAs

1) Beschichten mit *capture*-Antikörper, der gegen das Zielprotein gerichtet ist und somit im zweiten Schritt das gesuchte Protein bindet (anti-rab31). Dieser Schritt ermöglicht die stärkere Bindung von kleineren Antigen-Protein-Mengen (Sensitivitätserhöhung). 2) Antigenbindung: rab31 Fusionsprotein (rab31-His oder GST-rab31). 3) *Catching*-Antikörper eingesetzt, der spezifische und nicht mit dem ersten *capture*-Antikörper überlappende Epitope am Antigen bindet (Spezifitätserhöhung). 4) HRP-gekoppelter Detektions-Antikörper, der den Fc-Teil des *catching*-Antikörpers erkennt. Durch die Zugabe des Substrates wird eine Chemilumineszenz-Reaktion (5) ausgelöst, die im Photometer (ELISA-Reader) quantitativ ausgewertet werden kann.

3.2.6 Westernblot

Zunächst wurden die rekombinant hergestellten rab31-Proteine (rab31-His, GST-rab31) und Kontrollproteine z. B. Kallikrein-ähnliche Peptidase 4 und 6 (KLK 4, KLK 6) sowie HER2 mittels SDS-PAGE (1,5 mm) getrennt.

Anschließend wurden die Proteine mittels *semidry*-Methode für 2 h bei 30 V, 75 mA, 10 W auf eine PVDF-Trägermembran (Millipore, Billerica, MA) übertragen. Dazu wurden ein 20 % Ethanol-Anodenpuffer und ein 5 % Ethanol-Kathodenpuffer verwendet.

Nach dem Transfer wurde die Membran erneut mit Ethanol und H₂O angefeuchtet. Anschließend wurde sie mit Blockierungs-Puffer für 1 h bei RT auf dem Schwenker inkubiert. Nach dem Waschen mit Waschpuffer/PBS wurde die PVDF-Membran mit dem ersten Antikörper (RT1-4-IgG oder ChT1-4-IgY in 5 % Milchpulver + 1 % Tween-20) in verschiedenen Testkonzentrationen über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Dann wurde die Membran zweimal kurz und dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde der zweite HRP-gekoppelte Antikörper zugegeben und bei RT für 1 h inkubiert. Nach 5 Waschschritten (wie oben beschrieben) wurde Substrat ECL (*enhanced chemilumnescent substrate*) (1,5 ml Reagenz 1 + 1,5 ml Reagenz 2) zugegeben und die Reaktion (HRP katalysiert die Oxidation von Luminol in ECL) mittels Röntgen-Film in der Dunkelkammer dokumentiert.

Zum Wiederverwenden der Membranen für weitere Antikörper können diese von bereits gebundenen Antikörpern befreit werden (*stripping*). Dazu wurden die Membranen 1 h bei RT in *stripping*-Puffer gelegt, dreimal für 10 min mit PBS gewaschen und anschließend blockiert. Das weitere Vorgehen entsprach den oben genannten Schritten.

3.2.7 Zellkultur

3.2.7.1 Auftauen der Zellen

Nach dem Auftauen wurden Zellen bei 4 °C in 5 ml Zellkulturmedium gewaschen und bei 300 x g für 3 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde im Medium resuspendiert und in eine sterile Plastikflasche überführt. Nach 4-5 h wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen zu entfernen.

3.2.7.2 Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen durch Inkubation mit PBS + 0,02 % EDTA (5 min, 37 °C) vom Flaschenboden gelöst. Anschließend wurden sie mit 5 ml PBS gewaschen und dann abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig verworfen. Das Pellet wurde in *freezing-Medium* resuspendiert (FCS und 10 % DMSO) und dann in Cryoröhrchen abgefüllt. Im NALGENE®-Freezing-Container wurden sie langsam auf -80 °C herabgekühlt. Für eine Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in Stickstoff bei -196 °C tiefgefroren.

3.2.7.3 Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37,5 °C in einer 5 % CO₂/H₂O-haltigen Atmosphäre kultiviert, wobei die Zellen in eine Flasche ausgesät wurden, die alle drei Tage ausgewechselt wurde. Dazu wurden die Zellen durch fünfminütige Inkubation mit PBS/EDTA gelöst, mit 5 ml PBS ausgewaschen und bei 300 x g für 3 min zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden die Zellen in einem vorgewärmten Wachstumsmedium gelöst und in eine neue größere Flasche überführt. Bei Erreichen einer maximalen Bedeckung in einer Flasche (90 % Konfluenz) wurden die Zellen je nach Bedarf auf mehrere Flaschen verteilt.

3.2.7.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 100 µl Zellsuspension mit 900 µl Trypanblau gemischt und davon wurden 10 µl auf einen Glasträger (Neubauer-Zählkammer) aufgetragen, um unter dem Mikroskop die Zellen auszuzählen. Abgestorbene Zellen sind blau gefärbt und können so von den ungefärbten lebenden Zellen unterschieden werden.

3.2.7.5 Mykoplasmen-PCR

Alle Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf eine Kontamination durch Mykoplasmen getestet. Dazu wurde die DNA mit dem DNA High pure PCR Template Präparations-Kit von Roche Diagnostics® nach Herstellerangaben präpariert und anschließend wurde eine PCR mit dem thermalem Profil nach Herstellerangaben unter Verwendung von Taq-Polymerase und Mykoplasmen-spezifischer Primer (Kit) durchgeführt. Das Endprodukt wurde wie zuvor beschrieben mittels Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert. Die Mykoplasmen-DNA kann im Falle einer Infektion an der 500 bp-Markerbande identifiziert werden.

3.2.7.6 *Stabile Transfektion*

Zur stabilen Transfektion mit dem Expressionsplasmid pRc/RSV-rab31 wurden die Zellen CAMA-1, MDA-MB-231, MDA-MB-435 und ZR-75 am Vortag der geplanten Transfektion in 6-Napf-Platten ausgesät. Bei ca. 70 %iger Konfluenz wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und dann mit 3 ml GAM (FCS-freies und antibiotikafreies Zellkulturmedium) inkubiert. Es wurde eine Reihe A mit 17 µl Lipofektin®/100 µl GAM hergestellt und für 45 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde eine Reihe B mit 5 µg DNA/100 µl GAM für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Reihen gemischt und bei RT für 15 min inkubiert. Der komplette Ansatz aus Reihe A und B (Totalvolumen von 200 µl) wurde zu den 3 ml GAM pro Vertiefung zugegeben und bei 37 °C für 6 h inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium abgesaugt, die Zellen wurden mit 3 ml PBS gewaschen und 3 ml Wachstumsmedium DMEM wurden zugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert. Ab einer Konfluenz von ca. 60 % wurden die Zellen noch zwei Tage kultiviert und danach im Verhältnis 1:3 gesplittet. Bei ca. 75 % Konfluenz wurden sie ins Falcon-Gefäß überführt und die Selektion wurde mit Geneticin G-418 (1 mg/ ml DMEM) gestartet.

3.2.7.7 *Analyse des Transfektionserfolges mittels Westernblot*

Mittels Westernblot wurde die Expression des rab31-Proteins untersucht. Dazu wurden transfizierte CAMA-1, ZR-75, MDA-MB-231 und MDA-MB-435-Zellen kultiviert, bei 75 %iger Konfluenz abgelöst, in 10 ml PBS gewaschen und mit 10 ml Medium resuspendiert. Davon wurden 3,5 ml in einem Falcon-Gefäß abzentrifugiert (30 min, 4 °C, 13.000 x g). Das Pellet wurde mit 3 ml PBS gewaschen, mit 50 µl Lysepuffer (TBS + 1 % Triton + 1 mM EDTA + complete™) resuspendiert und für 2 h auf dem Rad inkubiert und für den Westernblot auf ein SDS-Gel aufgetragen.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung eines rab31-His-Fusionproteins

Da für rab31 keine Expressionsplasmide kommerziell erhältlich waren, wurden in der vorliegenden Arbeit die prokaryontischen Vektoren pQE-30-rab31 zur Produktion von rab31 mit Histidin-*tag* (Abb. 15) und pGEX-6P-2-rab31 zur Produktion von rab31 mit GST-*tag* (Abb. 21) sowie ein eukaryontischer Transfektionsvektor pRc/RSV-rab31 (Abb. 30) hergestellt.

4.1.1 Isolierung der rab31-Sequenz

Zur Isolierung der rab31-cDNA wurden rab31-spezifische Primer (Do1, Up1, Do2 und Up2) (siehe 4.1.4.) synthetisiert. Alle Primer wurden entsprechend der rab31-Sequenz und der Sequenz der jeweiligen Restriktions-Schnittstellen des vorgesehenen Vektors entworfen und durch die Firma Metabion® Martiensried produziert. Mit diesen wurde die rab31-*full-length*-cDNA erfolgreich aus der Gesamt-cDNA der rab31-exprimierenden Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 per *nested*-PCR amplifiziert, wobei eine gesteigerte Produktspezifität erreicht und das Auftreten von unspezifischen Nebenprodukten minimiert werden konnte (Lodish, 1996).

Da das Ergebnis dieser *nested*-PCR bei den berechneten optimalen *annealing*-Temperaturen von 48 °C und 42 °C eine zweite unspezifische Bande unter der 600 bp Bande zeigte (nicht gezeigt), wurde der Versuch mit modifizierten *annealing*-Temperaturen wiederholt. Im ersten Lauf wurde eine *annealing*-Temperatur von 49 °C verwendet und im zweiten Lauf 44 °C. Da diese *annealing*-Temperaturen zu einem spezifischeren Ergebnis im Agarose-Gel führte (nur eine Bande bei 600 bp), wurde mit dem PCR-Produkt aus dem 2. Versuch weitergearbeitet. Die optimierte *annealing*-Temperatur ist in Kapitel 3.1.5 festgehalten.

Parallel dazu wurde ein Isolierungsversuch aus CAMA-1 in gleicher Weise durchgeführt. Hierbei war trotz mehrfacher Wiederholung keine Bande bei der 600 bp-Marke zu sehen. Die Isolierung aus CAMA-1 lieferte demnach kein Ergebnis. Daher wurde das rab31-cDNA Produkt, welches aus der Zelllinie MDA-MB-231 synthetisiert wurde, für die weiteren Experimente ausgewählt. Spätere Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass CAMA-1 Zellen rab31 nicht exprimieren (Grismayer et al., 2012).

4.1.2 Herstellung des prokaryontischen Expressionsplasmids pQE-30-rab31

Zur Herstellung des prokaryontischen Expressionsplasmides pQE-30-rab31 wurden die zum Vektor passenden Restriktionsenzym-Schnittstellen für Bam HI: G/GATCC und Hind III: A/AGCTT (Abb. 17) und fünf weitere Basen mit den Primern B1, B2 und H1, H2 an das rab31-Fragment mittels einer doppelten PCR angehängt (Abb. 12, 13).

Dazu wurden für den ersten PCR-Durchlauf die Primer B1 und H1 generiert, die homolog zum rab31-*template* waren und zusätzlich am 5'-Ende um fünf Nukleotide verlängert waren. Im zweiten Lauf wurden die Primer B2 und H2 verwendet, die sowohl an einen kleinen Anteil an beiden Enden der Original Sequenz des rab-31-Templates binden, als auch an die neu angehängten Nukleotide. Diese Primer enthalten wie der erste Primer am äußeren Ende zusätzlich weitere fünf Basen. Insgesamt wurde somit rab31 um die Sequenz der Schnittstellen und fünf weitere Nukleotide verlängert (Abb. 12).

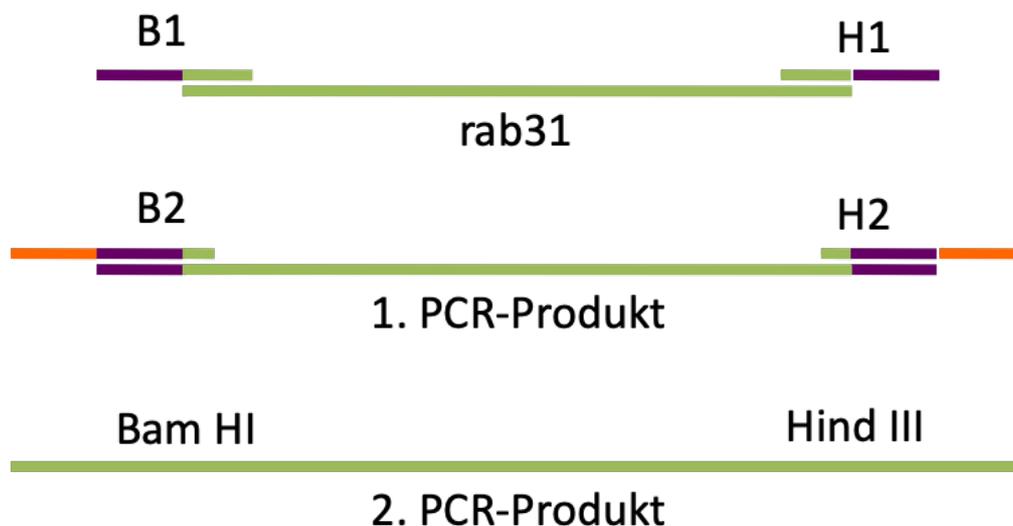


Abb. 12: Schematische Darstellung der doppelten PCR zum Anhängen der Schnittstellen

1. Erste Primer B1/H1: Binden an die äußeren Enden des rab31-Templates und enthalten fünf weitere Basen. Dadurch wird im ersten PCR-Lauf das Template an beiden Enden um fünf Basen verlängert.
2. Zweite Primer: B2/ H2: Binden an einen kleinen Anteil des rab-31-Templates, an die verlängerte Sequenz der Schnittstelle und enthalten für weitere fünf Basen, um welche die rab31-Sequenz verlängert wurde. Insgesamt wurde rab31 also um die Schnittstellen und fünf weitere Basen verlängert.

In gleicher Weise wurden später zur Herstellung des Transformationsvektors pGEX-6P-2-rab31 die Schnittstellen Bam HI und Xho I an das rab31-Fragment aus der nested-PCR angehängt und zur Herstellung eines Transfektionsvektors pRc/RSV-rab31 die Schnittstellen Hind III und Xba I an die rab31-Insertion angehängt. Das entstandene Produkt wurde jeweils mittels Agarose-Gel verifiziert. Das Gel zeigt das PCR-Produkt aus doppelter PCR (600 bp) für die Klonierung in pQE30, welches der erwarteten Grösse entspricht (Abb. 13).

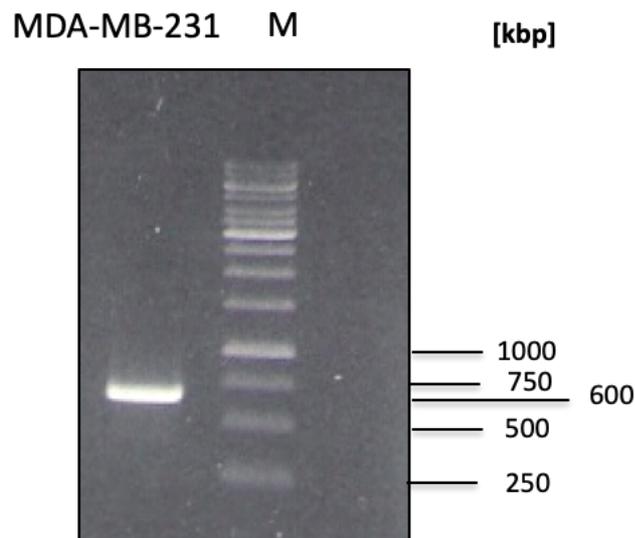


Abb. 13: Agarose-Gelelektrophorese zur qualitativen Kontrolle rab31-full-length-cDNA

Die rab31 wurde aus Gesamt-cDNA der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB 231 per *nested PCR* mit rab31-spezifischen Primern amplifiziert und anschließend mit zwei aufeinander folgenden PCRs um die Schnittstellen Bam HI und Hind III erweitert. Das Gel zeigt das PCR-Produkt nach doppelter PCR bei 600 bp, was der erwarteten Länge entspricht. M: Marker Peggold 10 kb.

Zur Vorbereitung der Ligation wurde das PCR-Produkt mit den Enzymen Bam HI und Hind III geschnitten und anschließend mittels Agarose-Gel gereinigt. Die Konzentration der so gereinigten DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese bestimmt (Abb. 14), um das für eine effiziente Ligation notwendige molare Verhältnis von Insertion zu Plasmid von 5:1 – 10:1 abschätzen zu können. Die DNA-Konzentration der Plasmidlösung wurde photometrisch bestimmt, so dass davon gezielt 50, 200 und 500 ng auf das Gel aufgetragen werden konnten. Vom PCR-Produkt wurden 10 µl aufgetragen. Durch Vergleichen der Leuchtintensität der PCR-Banden mit jener der Vektorbanden konnte die ungefähre Konzentration der DNA in den PCR-Lösungen abgeschätzt werden. In Abbildung 14 zeigt die erste Spur das amplifizierte

4. Ergebnisse

rab31-cDNA-Fragment auf Höhe der 600 bp Bande. Die letzten drei Spuren zeigen das Plasmid pQE-30 in verschiedenen Konzentrationen. Die 200 ng Bande des Vektors entspricht am ehesten der Konzentration des rab31-Fragmentes, so dass bei einer Vektorgröße von 3461 bp ein molares Verhältnis von ca. 6:1 angenommen werden konnte.

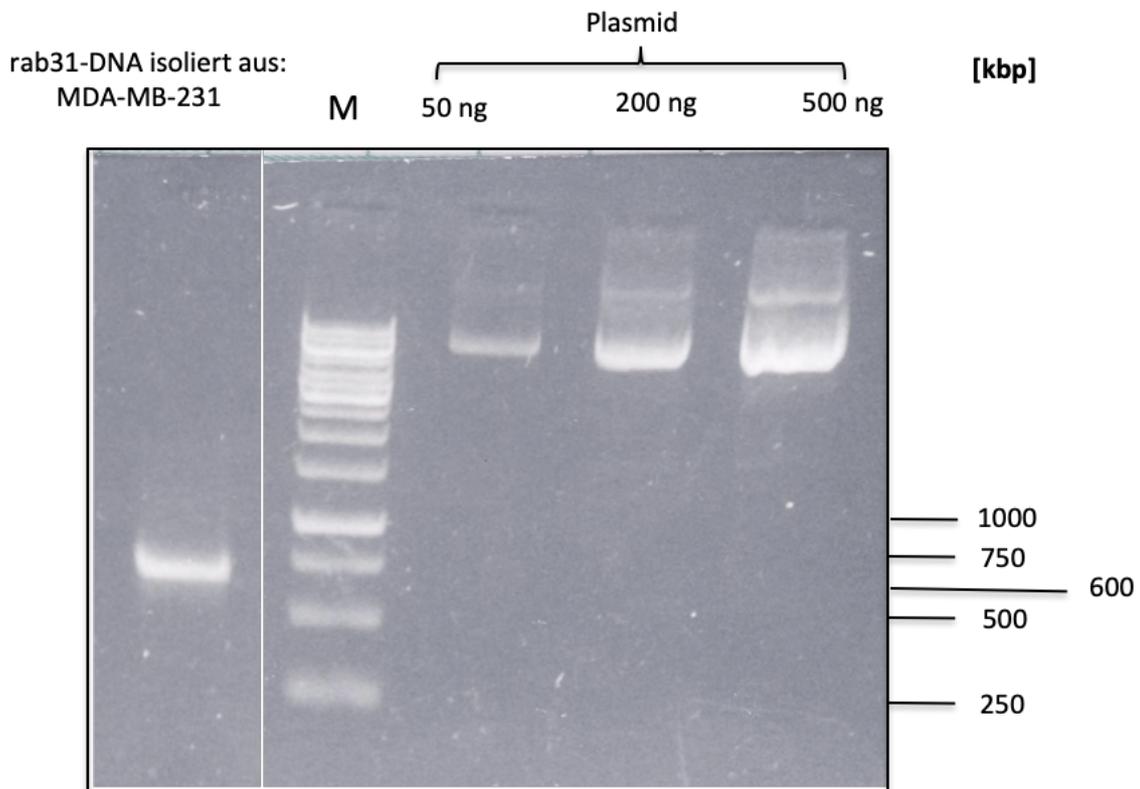


Abb. 14: Abschätzung der Konzentration des Gel-gereinigten rab31-cDNA Fragments mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die erste Spur zeigt bei der 600 bp Marke die rab31-DNA (PCR-Produkt), von welchem 10 µl zur Konzentrationsbestimmung aufgetragen wurden. In den drei letzten Spuren wurde das Plasmid pQE-30 (leer) mit 3461 bp in bekannter Konzentration (50 ng, 200 ng, 500 ng) zur Abschätzung des Konzentrationsverhältnisses vor der Ligation aufgetragen. Die 200 ng Bande des Vektors entspricht ungefähr der Konzentration des rab31-Fragments. Nachdem die Fragmentlänge von rab31 ca. 1/6 des Vektors pQE-30 beträgt, entspricht dies annähernd einem molaren Verhältnis von 6:1.

Nach der Konzentrationsbestimmung wurde das rab31-Fragment im Verhältnis von 6:1 zum Vektor mittels DNA-Ligase in den mit Bam HI und Hind III geschnittenen Vektor pQE-30 ligiert. Das entstandene Fusions-Gen kodiert für rab31 mit einem N-terminalen Histidin-tag (Abb. 15).

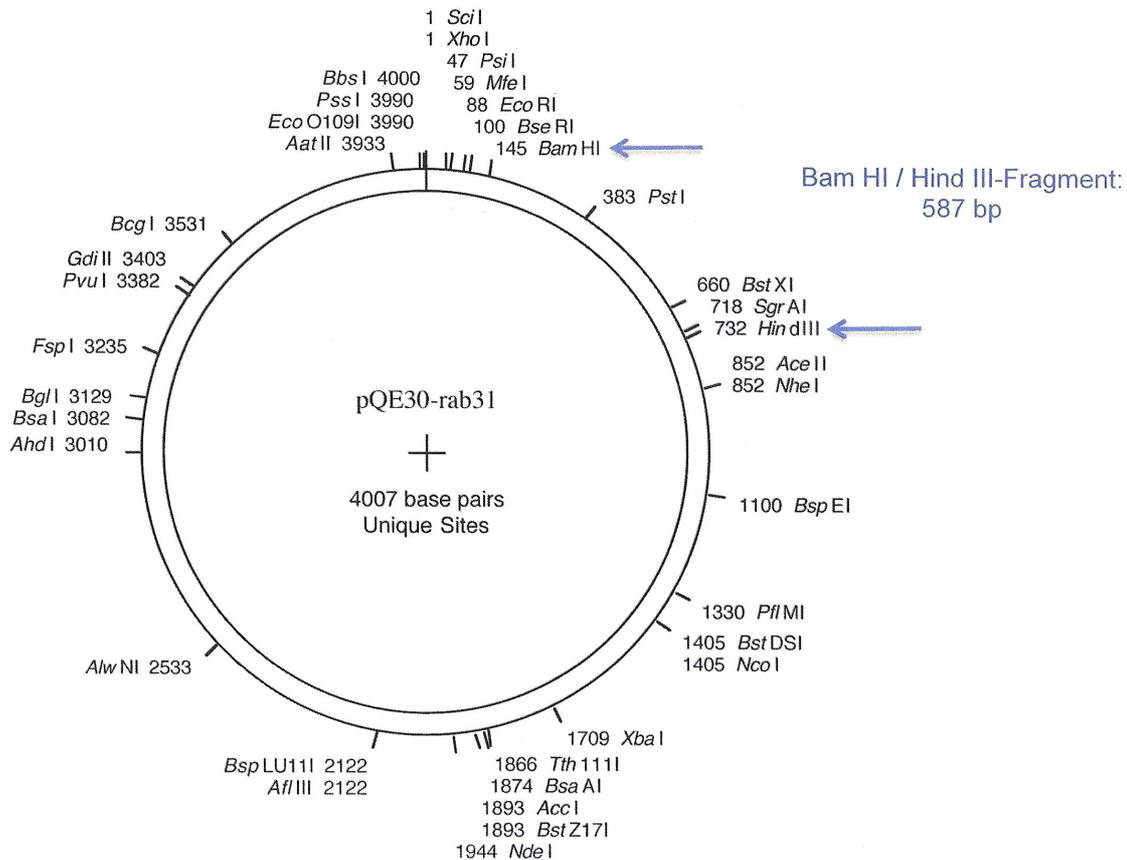


Abb. 15: Schematische Darstellung des Vektors pQE-30-rab31 nach Ligation mit dem rab31-Fragment

Der Vektor pQE-30 wurde mit Bam HI und Hind III gespalten und das rab31-Fragment in Vektor kloniert. Die blauen Pfeile zeigen das integrierte rab31-Fragment (587 bp), so dass sich eine Gesamtgröße des Plasmids pQE-30-rab31 von 4007 bp ergibt.

Im Anschluss an die Ligation wurde die DNA in *E. coli* transformiert und Klone selektiert. Da bei einer Ligation das gewünschte Plasmid nicht zu 100 % entsteht, sondern auch Vektoren ohne die Insertion wieder leer verschlossen werden, wurde in diesem Schritt mit mehreren Klonen (14) aus der Transformation weitergearbeitet. Diese 14 Klone wurden kultiviert und eine analytische Plasmid-Präparation durchgeführt. Mit einer Restriktionsanalyse wurden anschließend alle 14 Plasmide übergeprüft, ob die DNA-Insertion tatsächlich im Vektor vorhanden war. Dazu wurden die gereinigten Plasmide mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Hind III geschnitten. Anschließend wurde mittels Agarose-Gel die Größe der erstandenen Fragmente abgeschätzt. Die Größe des Vektorfragmentes lag für pQE-30 bei 3400 bp. Somit konnten mittels Agarose-Gelelektrophorese die Plasmide ausgewählt werden, welche sowohl

4. Ergebnisse

ein Fragment in der Größe des Plasmides (pQE-30: 3400 bp) als auch in der Größe von rab31 (600 bp) enthielten, und deren Klonierung somit erfolgreich war. Von den 14 gereinigten Plasmiden, zeigten 12 Plasmide in der Restriktionsanalyse ein Fragment von ca. 600 bp. Das Ergebnis der Restriktionsanalyse von sieben pQE30-rab31-Plasmiden ist in Abbildung 16 gezeigt. Alle Spuren (Plasmid 1-7) zeigten eine Bande bei ~ 3500 bp, welche der Größe des Vektors pQE-30 (3461 bp) entspricht. Die Klone Nr. 1-4 und Nr. 6-7 enthielten ein etwa 600 bp großes Fragment, welches der Größe der rab31-DNA entspricht, was somit für eine erfolgreiche Klonierung von rab31 in pQE-30 spricht. Das Fehlen der 600 bp Bande bei Klon Nr. 5 weist darauf hin, dass diese Klonierung nicht erfolgreich war.

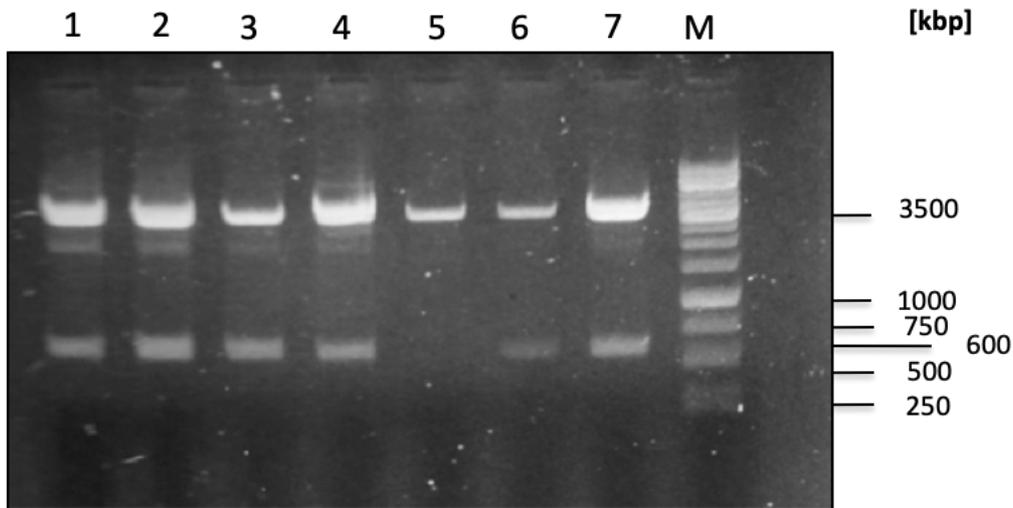


Abb. 16: Restriktionsanalyse von pQE-30-rab31 mit Bam HI und Hind III

Die Restriktionsanalyse von sieben pQE-30-rab31-Klonen zeigte eine Bande bei 3500 bp, der Größe des Vektors pQE-30 (3461 bp). Die Klone Nr. 1-4 und Nr. 6-7 enthalten zusätzlich ein 600 bp großes Fragment, welches der Länge des rab31-Gens entspricht. Dies spricht für eine erfolgreiche Klonierung von rab31 in pQE-30. Das Fehlen der 600 bp-Bande bei Klon Nr. 5 weist darauf hin, dass diese Klonierung nicht erfolgreich war. Mittels Sequenzierung von Klon 7 erfolgte der Nachweis der korrekten rab31-Sequenz.

Klon Nr 7 hatte mit einer Konzentration von $> 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ die höchste Konzentration der 12 positiven Klone und eine $\text{OD}_{260/280}$ von 2,0. Aufgrund der Restriktionsanalyse und der Konzentrationsbestimmung wurde Klon 7 (Abb. 16) ausgewählt und sequenziert, was die für rab31 erwartete Sequenz entsprechend der *gene-entry-number*: GC18P009701 (Abb. 17) ergab.

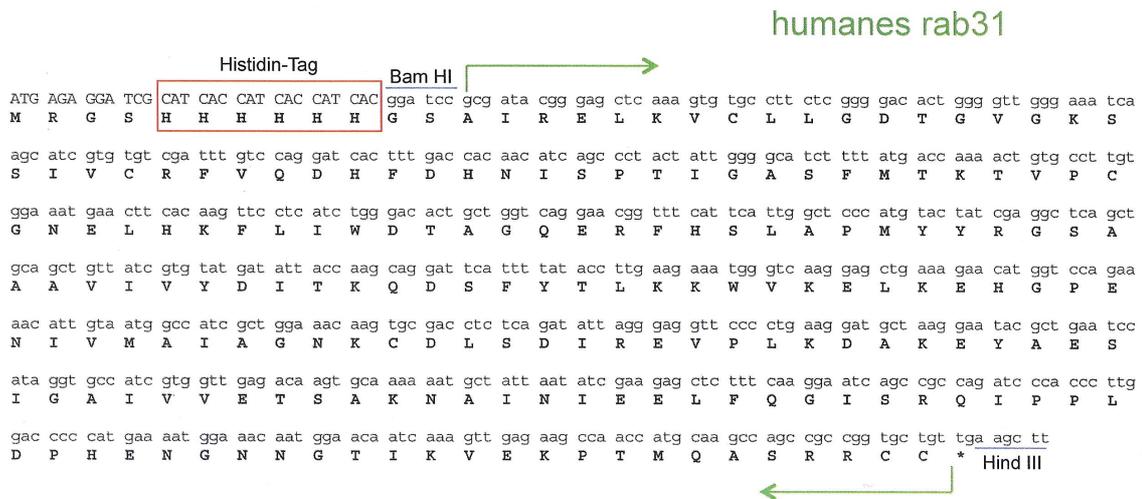


Abb. 17: Sequenz von rab31-His mit den Schnittstellen Bam HI und Hind III

Der Histidin-*tag* (sechs Histidinreste, 18 bp) ist rot markiert, die Sequenzen für die Schnittstellen Bam HI und Hind III sind grau unterlegt (jeweils 6 bp). Die grünen Pfeile weisen auf die rab31 Sequenz hin.

4.1.3 Produktion des humanen rekombinanten rab31-His-Fusionsproteins

Zur Produktion des rab31-His-Fusionsproteins wurden die *E. coli*-Stämme XL1 *blue*, M15 [pREP4] und BL21-RIPL (nicht gezeigt) mit dem sequenzierten Expressionsplasmid pQE-30-rab31 aus Klon 7 transformiert. Abbildung 18 zeigt exemplarisch die erfolgreiche Expression nach Transformation in die Bakterienstämme M15 [pREP4] und XL1 *blue* vor und nach Induktion der Proteinexpression durch IPTG-Zugabe. Klon 7 lieferte in M15 [pREP4] die höchste rab31-His-Proteinausbeute. Daher wurde der *E. coli*-Stamm M15 [pREP4] zur größten Produktion des rab31-His-Fusionsproteins ausgewählt.

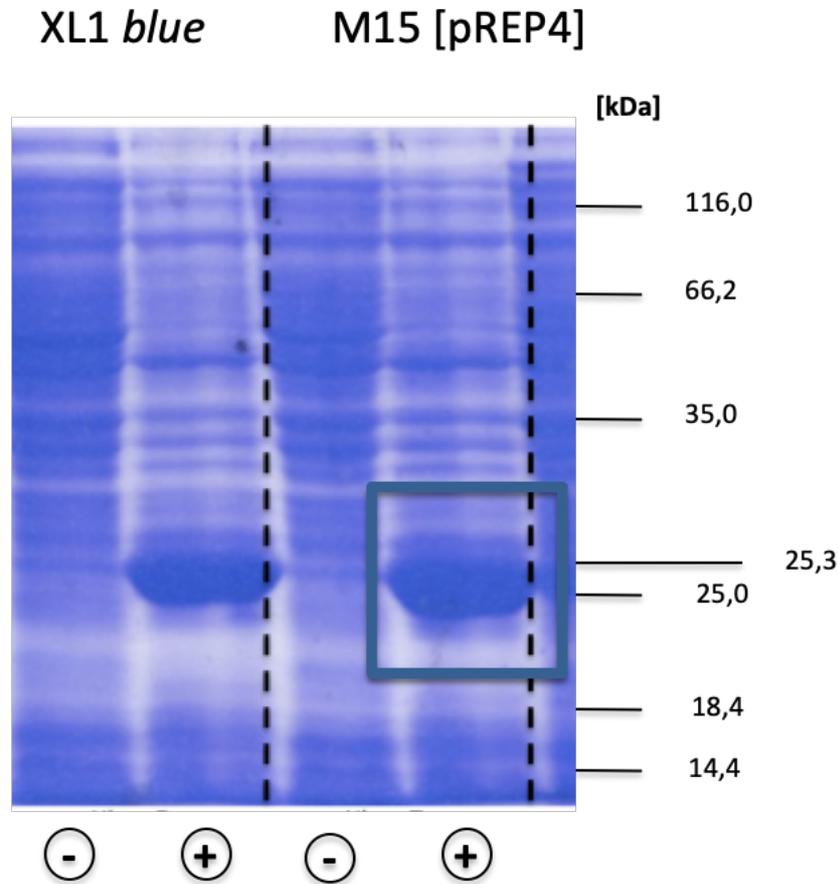


Abb. 18: Expressionskontrolle von Klon 7 in den Bakterienstämmen XL1 *blue* und M15 [pREP4]

Expressionsanalyse von rab31 nach Transformation der *E. coli*- Stämme XL1 *blue* und M15 [pREP4] mit pQE30-rab31 (aus Klon 7) zur Auswahl des Bakterienstammes, in welchem die Expression des rekombinanten rab31-His Proteins durchgeführt werden soll. Die Positivkontrollen sind durch ein + markiert, hier wurde die Expression durch die Zugabe von IPTG aktiviert. Die Negativkontrollen ohne IPTG-Zugabe sind mit – markiert. Spuren 3 (Negativkontrolle) und 4 (Positivkontrolle) zeigen Klon 7 in M15 Zellen.

Klon 7 wurde in M15 [pREP4] vermehrt. Zum Finden des optimalen Zeitpunktes zur Induktion der rekombinanten Proteinexpression, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die optische Dichte gemessen und die Expression kontrolliert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für weitere Versuche die Proteinexpression bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration: 1 mM) induziert. Der Erfolg der Proteinexpression wurde im Bakterienlysat (Abb. 19) auf einem SDS-Gel überprüft. Anschließend wurde das Protein mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie aus dem Lysat einer Reinheit von > 95 % isoliert (Abb. 19).

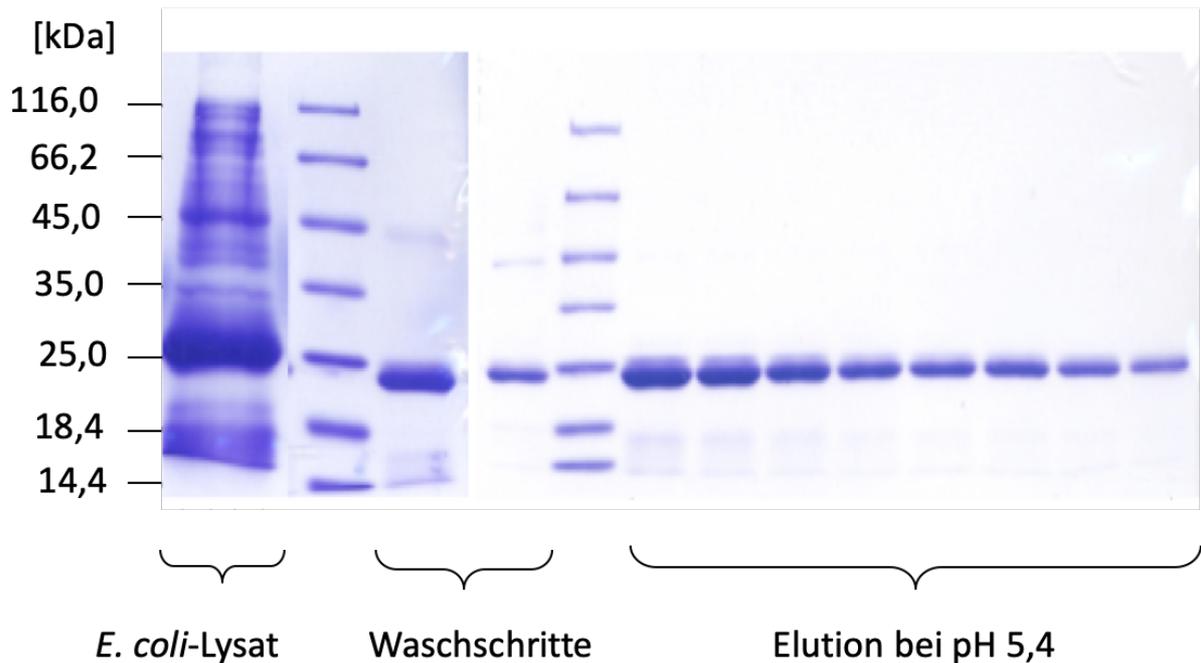


Abb. 19: Affinitätsreinigung von rab31-His aus *E. coli*-Lysat mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie

Spur 1 zeigt das *E. coli*-Lysat vor Binden an die Säule. Spur 2 zeigt den Marker, Spuren 3-4 zeigen die Waschschriffe, bei denen nebst anderen zellulären Proteinen auch Proteine ausgewaschen werden, welche eine rab31 entsprechende Größe aufweisen, was auf einen Verlust von rab31 während der Waschschriffe schließen lässt. Spur 5 zeigt den Marker, Spuren 6-13 zeigen bei 25 kDa die Elution des gereinigten rekombinanten rab31-His Fusions-Proteins (21 kDa).

4.1.4 Einengung von rab31-His

Das gereinigte Protein wurde gegen PBS 1 mM DTT + 0,05 % Tween-20 dialysiert. Damit wurde erreicht, dass das Antigen von Harnstoff befreit wurde und somit in einer Reinheit > 95 % zur Immunisierung zur Verfügung stand. Anschließend wurde das rab31-His-Protein durch Zentrifugation in Millipore®-Filtern mit 10 ml Puffer + Tween-20-benetzter Membran konzentriert und eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Dabei wurde eine Konzentration von ~ 100 µg/ml erreicht (Abb. 20). Bei Einengung auf höhere Konzentrationen flockte das Protein sichtbar aus und war daraufhin im SDS-Gel nicht mehr nachweisbar. In der Konzentration von ~ 100 µg/ml wurde das gereinigte rab31-His in PBS, 1 mM DTT an Pineda®-Antikörperservice zur Immunisierung von jeweils vier Kaninchen und Hühnern verschickt.

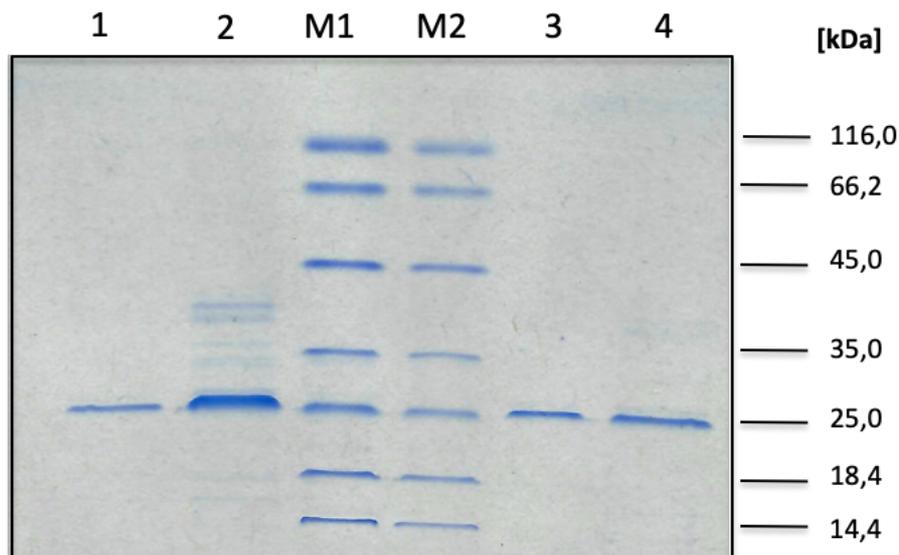


Abb. 20: Einengung von rab31-His mittels Zentrifugation im Millipore®-Filter und Konzentrationsbestimmung. Rab31 wurde gegen PBS-Puffer (welcher sich für die Immunisierung eignet) dialysiert und anschließend eingengt. **Spur 1** zeigt das gegen PBS dialysierte rab31-His vor der Einengung. **Spur 2** zeigt das rab31-His Protein in PBS nach Einengung im Millipore®-Filter. Zur Konzentrationsbestimmung wurden in Spur **M1** und **M2** Markerproteine mit bekannter Konzentration aufgetragen:

M1: 20 µl des Markers (jede Proteinbande entspricht 0,5 µg)

M2: 10 µl des Markers (jede Proteinbande entspricht 0,25 µg)

In **Spuren 3 und 4** wurde jeweils eine 1:5 Verdünnung des eingengten rab31-His aufgetragen. In den Spuren 1-4 wurden jeweils 25 µl aufgetragen.

Die Proteinmenge der 25 kDa-Markerproteinbande in **M1** entspricht etwa der des gereinigten rab31-His in **Spuren 3 und 4**. Das unverdünnte, konzentrierte Protein hat daher eine Konzentration von ~ 100 µg/ml.

4.2 Herstellung eines rab31-GST-Fusionproteins

Zur Reinigung der Antikörper und zur weiteren Analyse von rab31 wurde zusätzlich zu rab31-His ein rekombinantes rab31-Protein benötigt, welches keinen His-tag besitzt. Daher wurde rab31 auch als Gluthathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein in *E. coli* rekombinant exprimiert und mittels Gluthathion-Affinitätschromatographie gereinigt (Reinheit > 95 %).

4.2.1 Herstellung des prokaryontischen Expressionsplasmides pGEX-6P-2-rab31

Zur Herstellung des zweiten prokaryontischen Expressionsplasmides mit GST-tag wurde die isolierte *full-length-rab31-cDNA* aus der mRNA der Zelllinie MDA-MB-231 mit einer *nested-PCR* amplifiziert, wobei in zwei aufeinanderfolgenden PCRs die Schnittstellen Bam HI

4. Ergebnisse

und Xho I angehängt wurden. Anschließend wurde das Fragment nach Spaltung mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Xho I mit pGEX-6P-2 ligiert (Abb. 21).

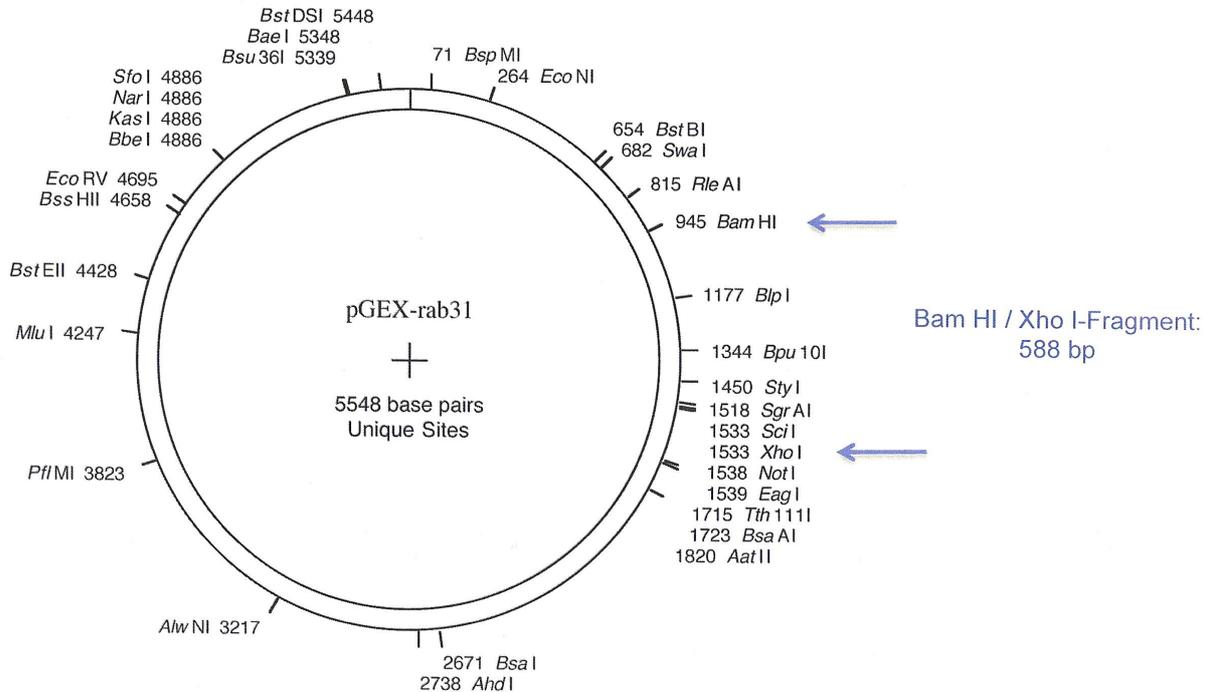


Abb. 21: Schematische Darstellung des Vektors pGEX-6P-2-rab31 nach Ligation mit dem rab31-Fragment

Der Vektor pGEX-6P-2 wurde mit Bam HI und Xho I gespalten und das rab31-Fragment in den Vektor kloniert. Die blauen Pfeile zeigen das integrierte rab31-Fragment (588 bp), so dass sich eine Gesamtgröße des Plasmides von 5548 bp ergibt.

Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* transformiert. Mittels Restriktionsanalyse konnten Klone gewählt werden, die das Plasmid tatsächlich aufgenommen hatten und somit das Fragment der Größe von etwas 600 bp herausgeschnitten wurde. Von den sechs klonierten und analysierten Vektoren enthielten fünf tatsächlich die rab31-Insertion mit 600 bp. Die Restriktionsanalyse zeigte fünf positive Klone und einen Klon, der das Plasmid nicht aufgenommen hat (Abb. 22).

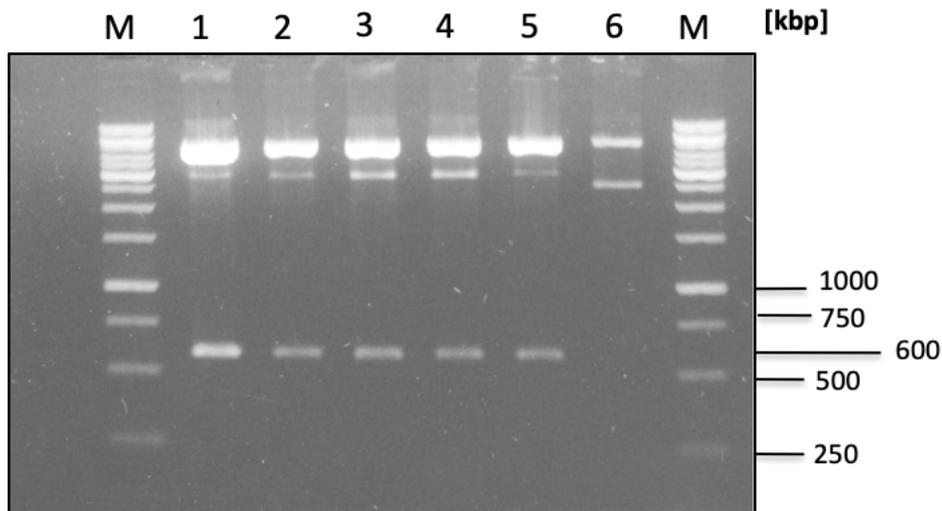


Abb. 22: Die Restriktionsanalyse von sechs pGEX-6P-2-rab31-Klonen mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Xho I

Alle Klone zeigten in dieser Analyse eine Bande bei ~ 5000 bp, welche der Größe des Vektors pGEX-6P-2 entspricht. Klone, welche das PCR-Fragment aufgenommen hatten, zeigten zusätzlich eine Bande bei ~ 600 bp, was der Größe von rab 31 entspricht. Gezeigt sind fünf positive Analysen (Spuren 1-5) und ein negativer Klon (Spur 6). Das Fehlen der 600 bp Bande bei Klon Nr. 6 weist darauf hin, dass diese Klonierung nicht erfolgreich war und dieser Klon bei der Transformation einen leer verschlossenen Vektor aufgenommen hat. Klon 3 zeigte in der Sequenzanalyse die korrekte rab31-Sequenz, entsprechend der Sequenz mit dem rab31-gene-entry-code: GC18P009701.

Das pGEX-6P-2-rab31-Plasmid (Abb. 21) besteht aus 5548 Basenpaaren (bp). Aufgrund der Restriktionsanalyse und seiner Konzentration von 55 ng wurde Klon 3 zur Sequenzierung gewählt. Diese wurde durch die Firma Eurofins® durchgeführt. Die Sequenzierung (Abb. 23) zeigte eine Übereinstimmung mit der erwarteten rab31-Sequenz (rab31-gene-entry-code: GC18P009701).

4. Ergebnisse

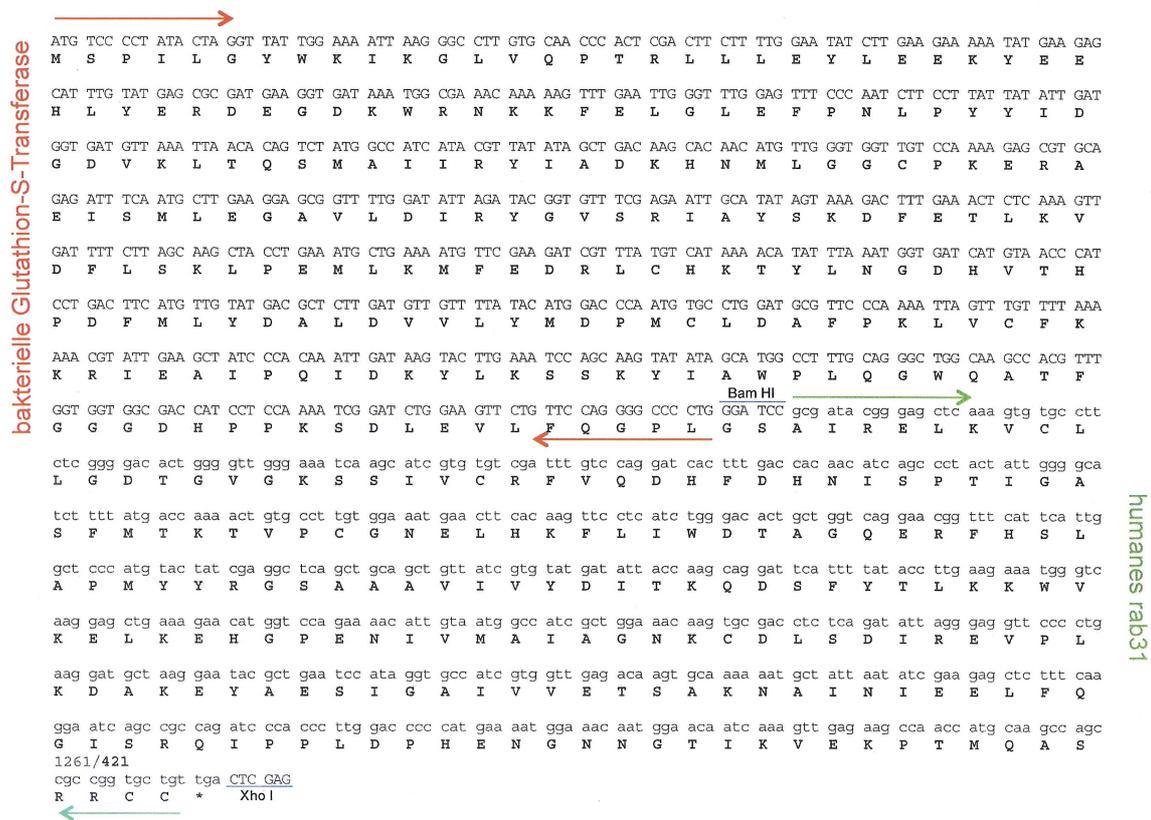


Abb. 23: Sequenz von GST-rab31 mit den Schnittstellen Bam HI und Xho I

Die GST-Sequenz ist mit roten Pfeilen und die rab31-Sequenz mit grünen Pfeilen angedeutet. Die Sequenzen der Restriktionsenzyme Bam HI und Xho I sind grau unterlegt.

4.2.2 Herstellung des humanen rekombinanten GST-rab31-Fusionsproteins

Nach Vermehren von Klon 3 in *E. coli* wurden die optimalen Expressionsbedingungen des GST-rab31-Proteins in *E. coli* analysiert. Zum Ermitteln des optimalen Zeitpunktes zur Induktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten von verschiedenen *E. coli*-Stämmen die optische Dichte gemessen sowie eine Expressionskontrolle durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse dieser Analyse wurde für weitere Versuche die Proteinexpression von *E. coli*-BL21-RIPL bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,17 durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration: 1 mM) gestartet.

Anschließend wurde das Protein über den GST-tag mit Hilfe von Glutathion-Agarose (Pierce™ Glutathione-Agarose - Katalognummer 16100) affinitäts gereinigt (Abb. 24), gegen PBS + 1 mM DTT dialysiert und schließlich konzentriert. Für die weiteren Experimente stand schließlich ein GST-rab31-Fusionsprotein (Reinheit > 95 %) in einer Konzentration von ca. 100 ng/ml zur Verfügung.

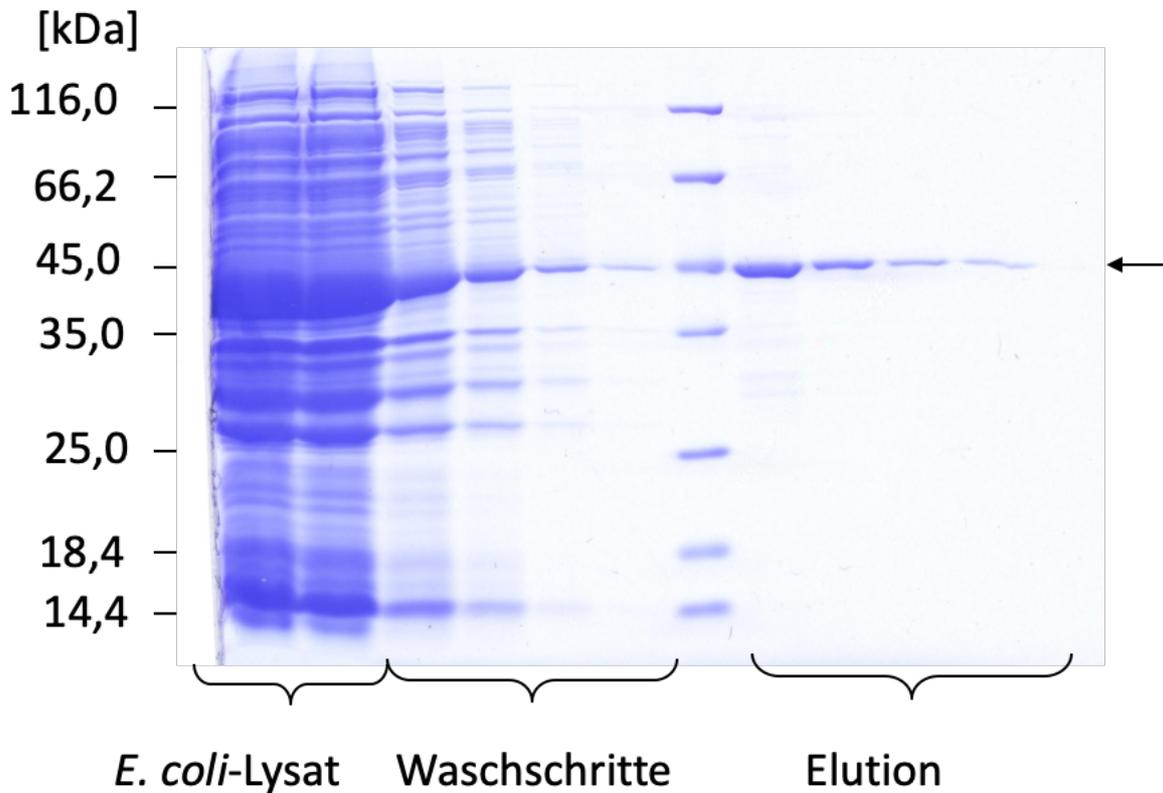


Abb. 24: Affinitätschromatographie von GST-rab31 mit immobilisiertem Glutathion

Die ersten beiden Spuren zeigen das *E. coli*-Lysat. Die nächsten vier Spuren die Waschschritte. Die letzten vier Spuren zeigen das eluierte GST-rab31-Fusionsprotein. Der Pfeil markiert die Höhe von GST-rab31.

4.3 Generierung der polyklonalen anti-rab31-Antikörper

Die Präimmunseren aller zu immunisierenden Tiere wurden vorab mittels Westernblot und ELISA auf die Abwesenheit von Kreuzreaktionen gegen rab31 untersucht und zeigten keine oder nur schwache Reaktionen mit rab31-His oder GST-rab31 (Abb. 25). Somit war sichergestellt, dass die Tiere vor Immunisierung keine rab31-spezifischen Antikörper aufwiesen. Es wurden je 4 Kaninchen und 4 Hühner in Berlin von der Firma Pineda®-Antikörperservice mit dem gereinigten, dialysierten und konzentrierten rab31-His-Fusionsprotein in einer Konzentration von 100 µg/ml immunisiert.

4.4 Charakterisierung der anti-rab31-Antikörper

4.4.1 *one-sided* ELISA

Während des Immunisierungsprozesses wurden alle Seren in regelmäßigen Abständen nach jeder Immunisierung mittels *one-sided*-ELISA analysiert und die Immunisierung somit verfolgt. Dabei konnte bereits ab Tag 30 ein deutlicher Anstieg der Antikörper gegen rab31-His und gegen GST-rab31 nachgewiesen werden. Dieser Anstieg nahm mit der Zeit nach Immunisierung bis zu Tag 130 deutlich zu (nicht gezeigt). Abb. 25 zeigt exemplarisch die Analysen von polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen T3 am Tag 110.

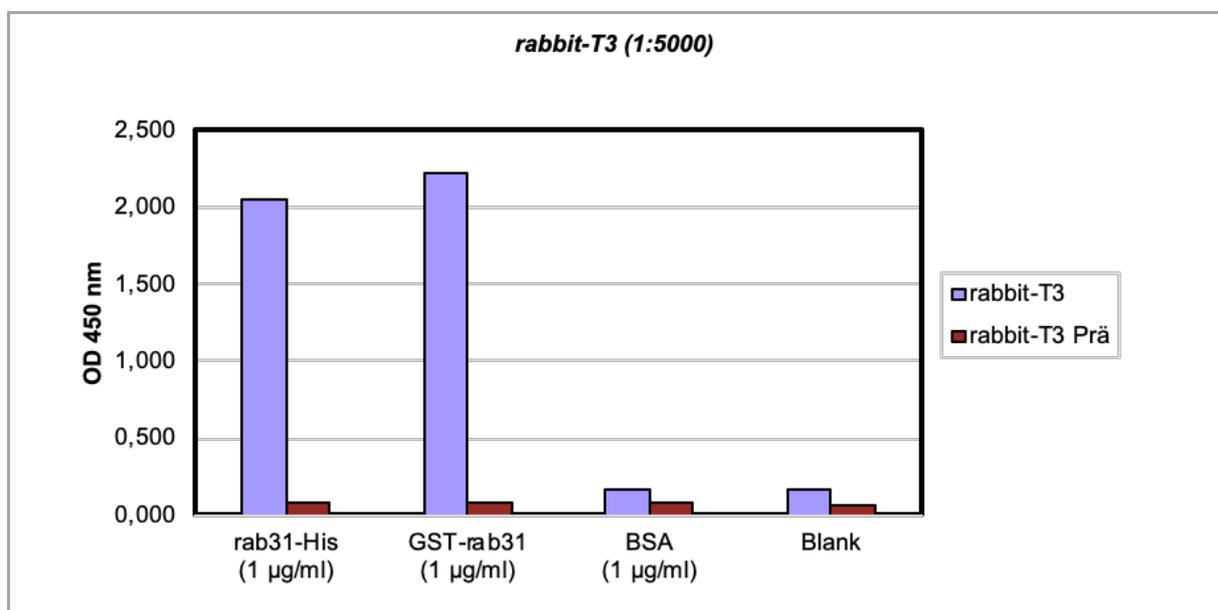


Abb. 25: Charakterisierung der polyklonalen Antikörper von Kaninchen T3 mittels *one-sided* ELISA

Die Analyse des Serums von Kaninchen T3 zeigt hohe Absorptionswerte für rab31-His sowie für GST-rab31, wobei die Negativkontrollen (BSA, blank) niedrige Absorptionswerte haben. Dies zeigt, dass im Serum von Kaninchen T3 Antikörper gegen rab31 vorliegen. Im prä-Immunsrum zeigt sich keine Reaktion, was deutlich macht, dass die Antikörper aufgrund der Immunisierung gebildet wurden.

4.4.2 *Sandwich*-ELISA

Nach Abschluss der Immunisierung wurden die Antikörper gegen GST-rab31 affinitätsgereinigt. Je vier Antikörper-Preparationen aus den Immunisierungen von Kaninchen und Huhn wurden im *sandwich*-ELISA mit rab31-His und GST-rab31 getestet, um den Erfolg der Immunisierung zu überprüfen und um solche Antikörper zu identifizieren, die sich für die Anwendung im ELISA eignen. Abb. 26 zeigt exemplarisch die Reaktion mit *rabbit-T1*-IgG als

coating-Antikörper und *chicken*-T2-IgY als Detektionsantikörper. Die polyklonalen, gereinigten Antikörper zeigten in diesen Experimenten in den meisten Kombinationen eine spezifische Reaktion für rab31 und wiesen kaum unspezifische Reaktionen gegen das Kontrollprotein BSA auf (Abb. 26).

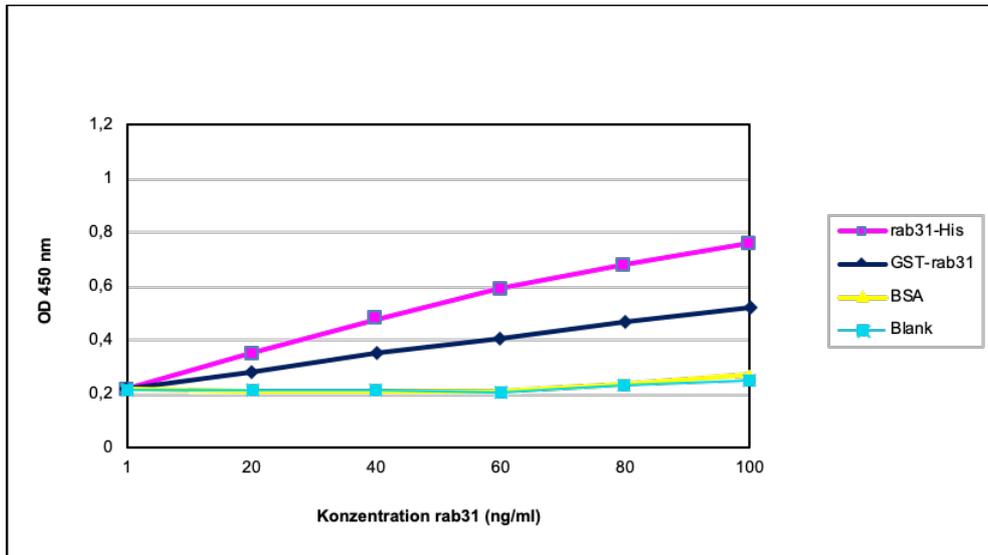


Abb. 26: Sandwich-ELISA zur Überprüfung des Immunisierungserfolges nach 130 Tagen

Im ELISA wurde mit *rabbit*-T1-IgG 1:1000 beschichtet und mit *chicken*-T2-IgY 1:10.000 detektiert. Die Konzentrationen von rab31 wurden variiert, bei niedrigen Konzentrationen war es kaum mehr vom Hintergrund abgrenzbar.

4.4.3 Charakterisierung der affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper RT3-IgG mittels Westernblot

Alle nach der Immunisierung gewonnen Tierseren (RT1-4)- und Eidotter (ChT1-4) zeigten auch im Westernblot eine spezifische Bindung an GST-rab31 und rab31-His (Abb. 27). Kreuzreaktionen zu nicht verwandten Proteinen wie BSA und ähnlich hergestellten rekombinanten Proteinen mit His-tag wie KLK4, KLK6 und HER2 wurden analysiert. Abbildung 27 zeigt exemplarisch einen Westernblot mit *rabbit*-T3 (RT3). Die Reaktionen der Hühnerantikörper waren über alle Experimente hinweg deutlich unspezifischer als die Kaninchenantikörper (Tabelle 1). Im Vergleich zwischen Hühnerantikörpern waren ChT3- und ChT4-IgY sensitiver als ChT1- und ChT2-IgY. Im Vergleich der Kaninchenantikörper waren RT3- und RT4-IgG sensitiver und spezifischer als RT1- und RT2-IgG (Tabelle 1)

Tabelle 1: Charakterisierung der polyklonalen Antikörper (pAbs)

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
pAbs aus Kaninchen				
Spezifität	++	++	+++	+++
Reaktivität mit rab31	++	++	+++	+++
pAbs aus Huhn				
Spezifität	+/-	+/-	++	++
Reaktivität mit rab31	++	++	+++	+++

Vor allem der polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen, RT3-IgG, zeichnet sich durch eine starke Reaktion mit dem rab31-Antigen aus und zeigte kaum Kreuzreaktionen mit KLK 4,6 und HER2 (Abb. 27). Aufgrund der hohen Spezifität entschieden wir uns, diesen Antikörper für weitere Experimente auszuwählen. Diese Auswahl wurde auch in Folgeexperimenten bestätigt, bei denen RT3-IgG nicht bzw. in äußerst geringem Maß mit den sehr nah verwandten Proteinen rab5 und rab22A reagierte (Grismayer et al., 2012).

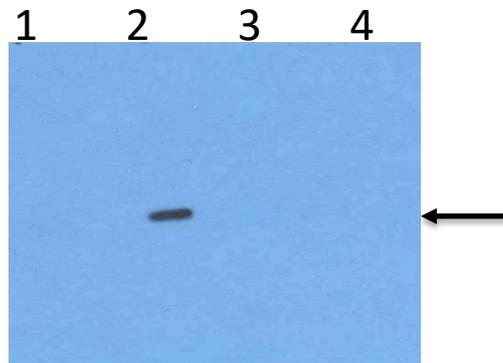


Abb. 27: Westernblot zur Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers RT3-IgG aus dem Kaninchen auf Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen mit His-tag

Der pAK RT3-IgG zeichnet sich durch eine starke Reaktion mit dem rab31-Antigen aus und zeigte kaum Kreuzreaktionen mit den Proteinen KLK 4, 6 mit His-tag. Spur 1 = BSA; Spur 2 = rab31-His (gereinigt); Spur 3 = KLK4-His (gereinigt); Spur 4 = KLK6-His (gereinigt). Der Pfeil markiert die Höhe der rab31-Bande.

4.4.4 Affinitätsreinigung des Antikörpers RT3-IgG

Ausgewählte Antikörper wurden von der Firma Pineda®-Antikörperservice mittels Protein-A-Affinitätschromatographie gereinigt. Die polyklonalen Antikörper gegen rab31-His enthalten auch eine Antikörperfraktion, die mit dem N-terminalen His-tag reagiert.

Der Antikörper RT3-IgG aus dem Kaninchenserum rabbit Tier 3 (RT3) wurde zusätzlich mittels Affinitätsreinigung gereinigt. Dies ist eine gängige Methode, um Antikörper aus einem polyklonalen Serum gezielt zu reinigen und dabei irrelevante Antikörper zu eliminieren. Für die Aufreinigung wurde GST-rab31 verwendet, um unspezifische Antikörper gegen rab31-His zu eliminieren. Seren von RT3 von unterschiedlichen Tagen wurden gereinigt und per Westernblot getestet. Das beste Ergebnis wurde mit dem Serum von Tag 110 (Abb. 28) erzielt. Die gegen den His-tag gerichtete Antikörperfraktion somit konnte erfolgreich mittels Affinitätschromatographie des Antikörpers gegen GST-rab31 abgetrennt werden. Dabei wurde eine Reinheit von $> 95\%$ erreicht.

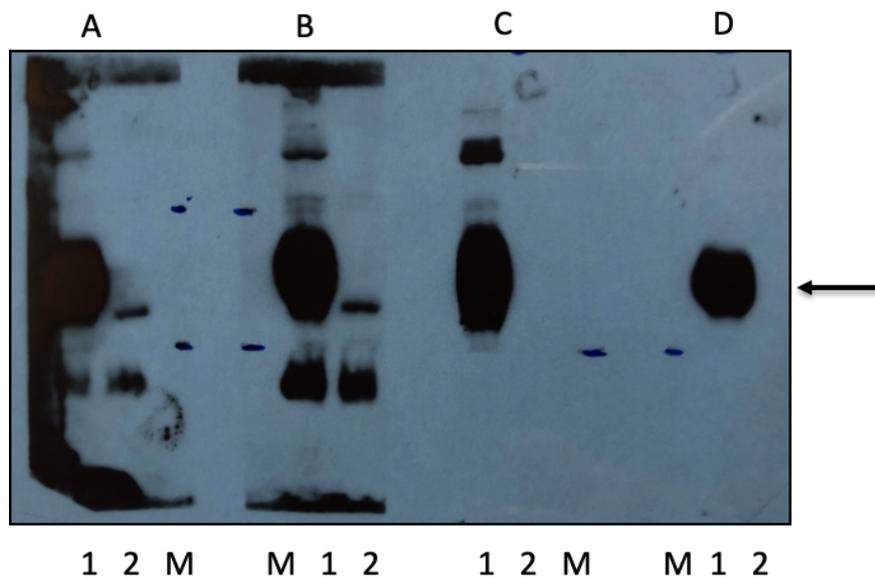


Abb. 28: Affinitätsreinigung des Serums von RT3 zur Isolation von RT3-IgG

In den Spuren A bis D wurden jeweils 4 μ l der Gesamtextrakte von *E. coli* aufgetragen, (1) welches rab31 produziert, (2) welches das irrelevante Protein HER2 Domäne 4 (HERD4) (Kontrollprotein) produziert. M bezeichnet den Marker. Der Pfeil markiert die Höhe der rab31-Bande. Nach Inkubation mit RT3 vor und nach Affinitätsreinigung ist zu beobachten wie der pAb sauberer wird. Spur A zeigt das Serum von RT3 vor Affinitätsreinigung. Spur B den Überstand nach Binden des Serums. Sowohl in Spur A und B sind deutliche Kreuzreaktionen mit *E. coli*-Proteinen zu beobachten. Spuren C und D zeigen verschiedene Elutionsschritte nach Affinitätsreinigung. Spur C: Eluierter AB RT3-IgG (nach 1. Bindung). Spur D: Eluat nach 3. Binden (RT3-IgG). Während im ersten Eluat noch geringe unspezifische Reaktionen zu beobachten sind, ist die Reaktion im 3. Eluationsschritt sehr spezifisch. Diese Affinitätsreinigung erzielte eine Reinheit von $> 95\%$.

4.4.5 Reinigung aus Eidotter

Die Reinigung aus dem Eidotter erfolgte durch eine Dextransulfatfällung und erreichte ebenfalls eine Reinheit von $> 95\%$. Die auf diese Weise generierten polyklonalen rab31-

Antikörper wurden mittels verschiedener immunologischer Methoden (*one-sided* ELISA, *sandwich*-ELISA und Westernblot) charakterisiert. Abb. 29 zeigt exemplarisch ein Coomassie-gefärbtes Gel der Isolierung und Reinigung von ChT1-IgY aus dem Eidotter von chicken T1.

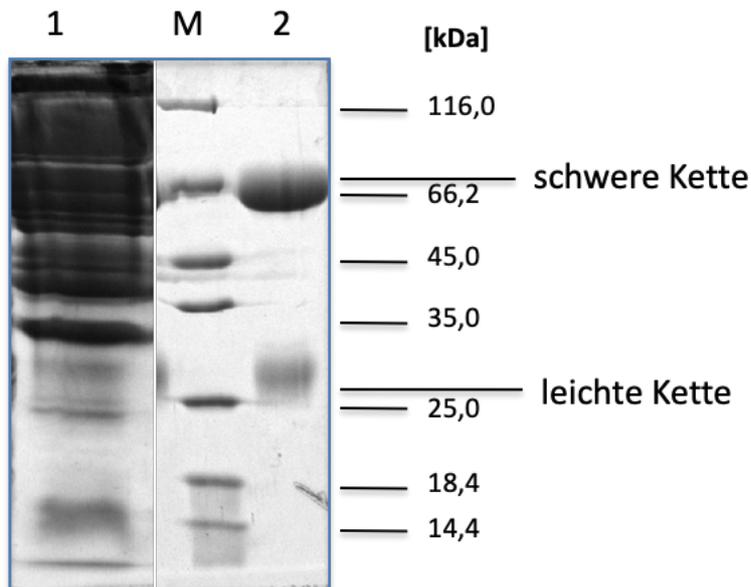


Abb. 29: Isolierung von anti-rab31-chicken-IgY aus Eidotter von chicken T1 mittels Dextransulfatfällung

Spur 1: zeigt das Gesamtprotein aus dem Eidotter-Lysat. Anschliessend wurde der Antikörper mittels Ammoniumsulfat-Fällung gereinigt und gegen TBS dialysiert. Spur 2: zeigt den dialysierten, gereinigten Antikörper ChT1-IgY.

4.5 Rab31-Expression in eukaryontischen Zellen

Zusätzlich zu den beiden prokaryontischen Expressionsplasmiden wurde ein eukaryontischer Expressionsvektor, pRc/RSV-rab31, hergestellt. Dieser wurde transient in die rab31-niedrigexprimierenden Zelllinien MDA-MB-231 und ZR-75 sowie die rab31-defizienten Zelllinien CAMA-1 und MDA-435 transfiziert und die rab31-Expression mittels Westernblot verfolgt.

4.5.1 Herstellung des eukaryontischen Expressionsvektors pRc/RSV-rab31

Zur Herstellung des eukaryotischen Expressionsplasmides pRc/RSV-rab31 wurde die kodierende Sequenz der rab31-cDNA um die Schnittstellen Hind III und Xba I verlängert. Dazu wurden die Primer HI, H2, X1 und X2 generiert und die Schnittstellen in zwei aufeinander folgenden PCRs angehängt. Das hergestellte rab31-Fragment mit den Restriktionsstellen für Hind III und Xba I wurde gereinigt, Vektor und rab31-Fragment mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xba I geschnitten und mit dem Vektor pRc/RSV ligiert (Abbildung 30). Der Expressionsvektor pRc/RSV-rab31 besteht aus 5725 Basenpaaren (bp).

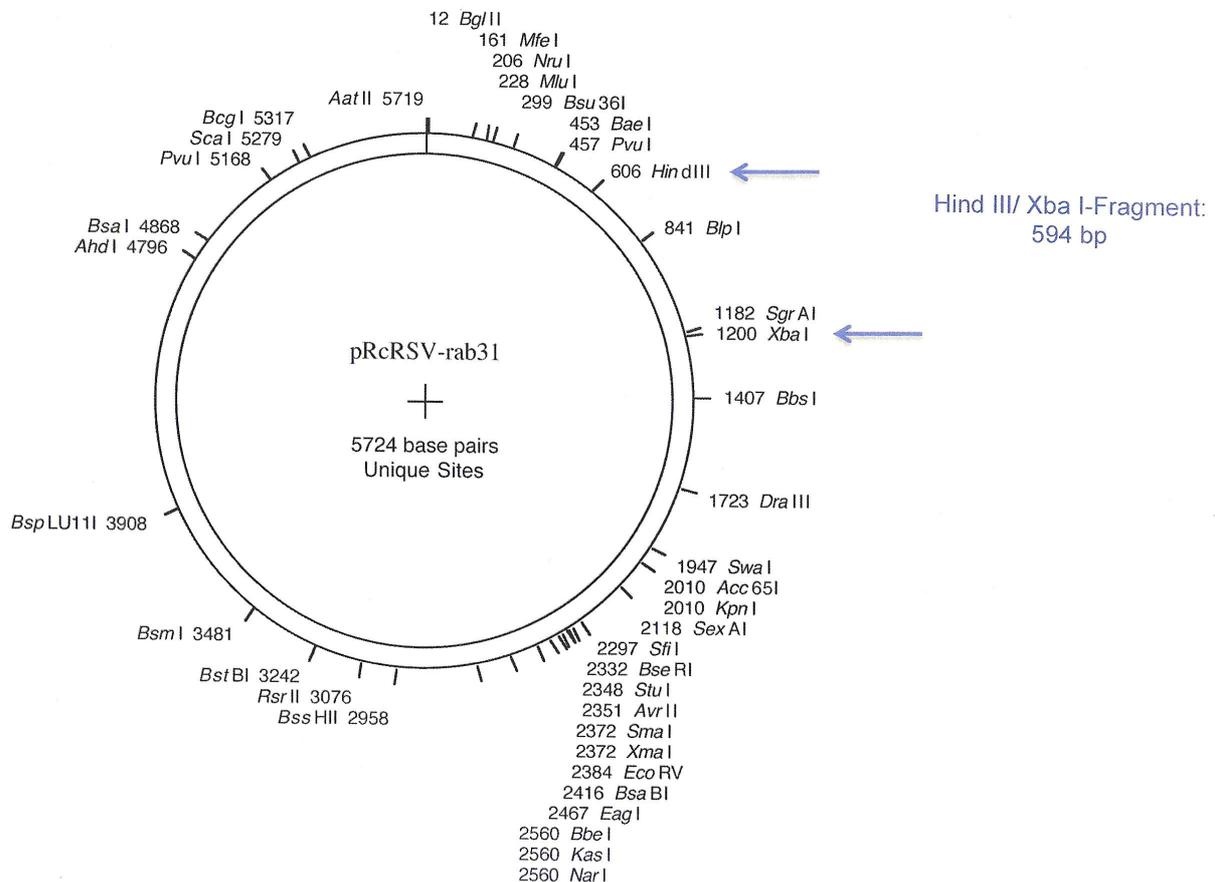


Abb. 30: Schematische Darstellung des Vektors pRc/RSV-rab31

Der Vektor pRc/RSV-rab31 wurde mit Hind III und Xba I gespalten und das rab31-Fragment in den Vektor kloniert. Die blauen Pfeile zeigen das integrierte rab31-Fragment (594 bp), so dass sich eine Gesamtgröße des Plasmides von 5724 bp ergibt.

4. Ergebnisse

Per Restriktionsanalyse und Agarose-Gel wurde die erfolgreiche Ligation bestätigt (Abb. 31). Die Sequenzierung durch die Firma Eurofins® zeigte ein mit der *gene-entry-code* GC18P009701 für rab31 übereinstimmendes Ergebnis (Abb. 32).

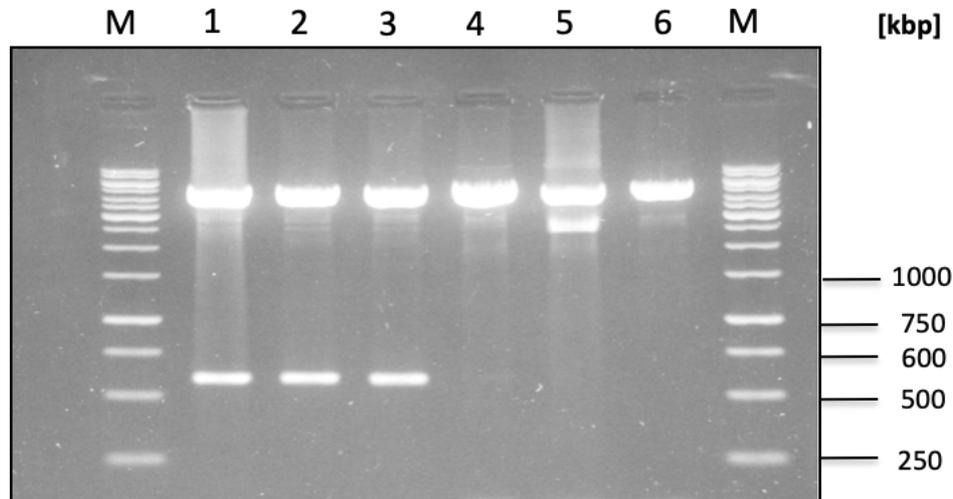


Abb. 31: Restriktionsanalyse verschiedener pRc/RSV-rab31-Klone

Gezeigt sind drei positive und drei negative Plasmide. Die Restriktionsanalyse zeigte bei drei Klonen eine Bande bei ca. 6000 bp (Spur 1-3), welche dem Vektor entspricht, und eine Bande bei ca. 600 bp, welche der ligierten rab31-cDNA entspricht. Klon 3 wurde ausgewählt und zur Sequenzierung verschickt.

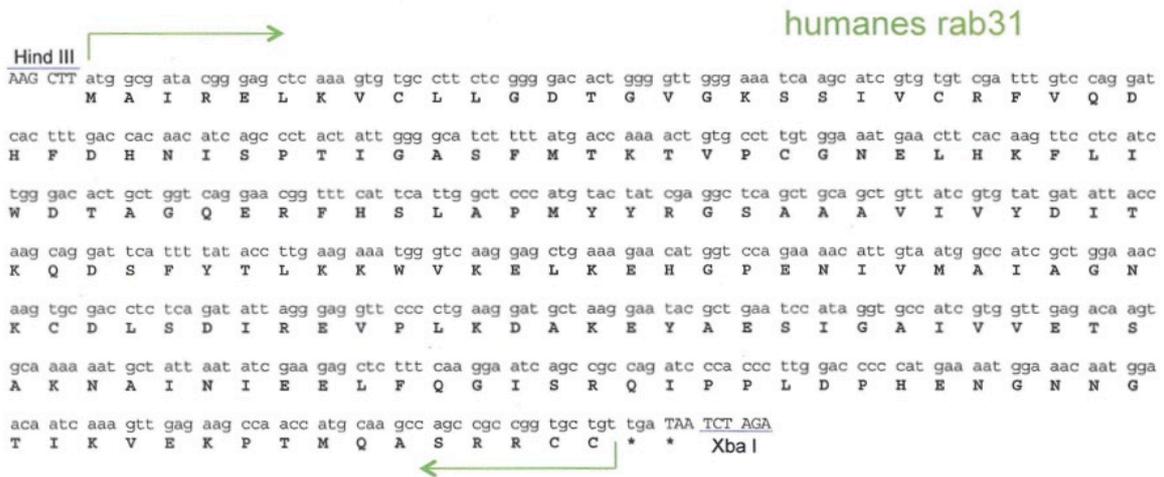


Abb. 32: Sequenz von rab31-His mit den Schnittstellen Hind III und Xba I

Die rab31-Sequenz ist in grün dargestellt. Die Sequenz der Restriktionsenzyme Hind III und Xba I ist grau unterlegt.

Die Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-435, und CAMA-1 wurden mit dem eukaryontischen pRc/RSV-rab31-Plasmid transfiziert und mittels Westernblot auf Proteinexpression getestet. CAMA-1 und MDA-MB-435 zeigten keine, MDA-MB-231 eine kaum detektierbare Basalexpression von rab31 im Westernblot (Abb. 33). Die Transfektion mit pRc/RSV-rab31 ergab eine deutlich sichtbare Bande bei ca. 24 kDa. Während Kontrollzellen, welche mit dem Vektor alleine transfiziert wurden (nicht gezeigt), keine erhöhte rab31-Expression gegenüber den entsprechenden nichttransfizierten Zelllinien zeigten, kam es in den mit pRc/RSV-rab31 transfizierten MDA-MB-231-Zellen zu einer deutlichen Erhöhung (Abbildung 33). Dies kann als Nachweis einer erfolgreichen Transfektion mit anschließender Expression von rab31 in MDA-MB-231-Zellen gewertet werden.

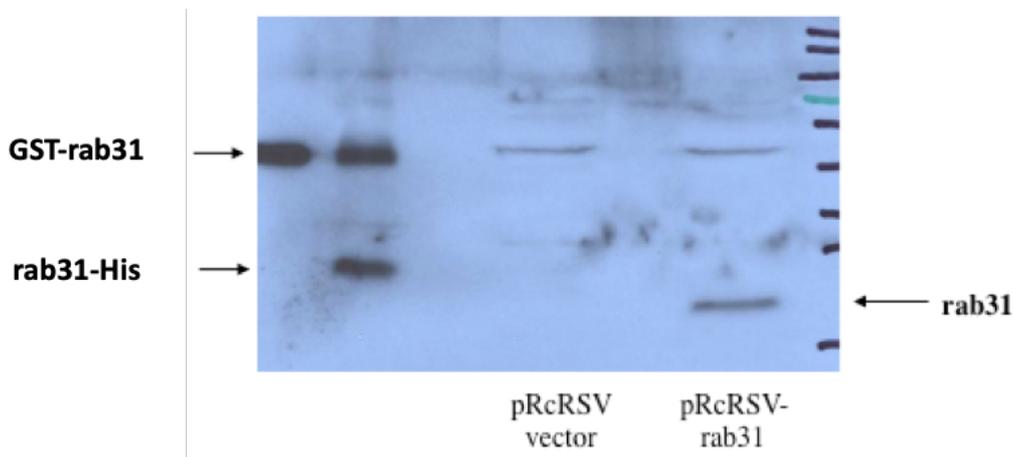


Abb. 33: Westernblot-Analyse zum Expressionsnachweis von pRc/RSV-rab31 in MDA-MB-231

Nach Transfektion der Zelllinie MDA-MB-231 mit pRc/RSV-rab31 sowie mit leerem Vektor pRc/RSV als Kontrolle wurden die Zellysate mittels Westernblot getestet. Zur Detektion wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale Antikörper RT3-IgG verwendet. In der Kontrolle links zeigt sich keine Bande in Höhe von ca. 24 kDa. Jedoch in der rechten Spur zeigt sich nach Transfektion mit dem Plasmid pRc/RSV-rab31 eine deutliche Bande auf Höhe von ca. 24 kDa.

5. *Diskussion*

5.1 **Rekombinante Expression von rab31 sowie Reinigung und Immunisierung von Kaninchen und Hühnern**

Die hier angewandten Methoden zur Proteinexpression und Herstellung polyklonaler Antikörper fußen auf vielen Erfahrungswerten unserer Forschungsgruppe. Die gewählte Proteinexpressionsmethode in *E. coli*-Stämmen bietet die Vorteile eines schnellen und dichten Wachstums und die weite Verfügbarkeit passender Klonierungsvektoren sowie spezielle *E. coli*-Stämme für die rekombinate Produktion von Proteinen wie z. B. M15 [pREP4] oder BL21-RIPL (Baneyx, 1999). Das mittels Ni²⁺-NTA-Säule unter denaturierenden Bedingungen gereinigte rab31-Protein wurde gegen einen zur Immunisierung geeigneten PBS-Puffer dialysiert. Als intrazelluläres Protein befindet sich rab31 unter physiologischen Bedingungen in einem schwach reduzierenden Milieu, sodass sich beispielsweise im Zytosol keine Cystein-Disulfid-Brücken ausbilden. Dieser Zustand wurde durch Zugabe von geringen Konzentrationen des Reduktionsmittels DTT (Endkonzentration: 1 mM) zum Puffer imitiert. Trotz Nachahmung physiologischer Bedingungen für rab31 konnte das Protein nicht höher als 100 µg/ml konzentriert werden, da es bei höheren Konzentrationen ausfiel. Ein Grund dafür könnte darin liegen, dass im Vergleich zu den physiologischen, intrazellulären Bedingungen die Konzentration des rekombinant hergestellten rab31-His Proteins bereits relativ hoch ist. In Thrombozyten wurde eine rab31-Konzentration von 5 ng/mg Gesamtprotein beschrieben (Bao et al., 2002). Unsere Forschergruppe hat in Folgearbeiten der vorliegenden Dissertation in MDA-MB-231-Zellen eine rab31-Grundkonzentration von 0,4 ng/mg Gesamtprotein gemessen, nach Transfektion mit dem pRSV-rab31-Plasmid wurde eine Erhöhung auf 2 ng/mg Gesamtprotein festgestellt (Grismayer et al., 2012). Des Weiteren stellte unsere Arbeitsgruppe eine mediane Konzentration von 0,41 ng/mg Gesamtprotein in Tumorextrakten von östrogenrezeptorpositiven (ER⁺)- sowie von 0,36 ng/mg Gesamtprotein in Tumorextrakten von östrogenrezeptornegativen- Mammakarzinompatientinnen fest (Kotzsch et al., 2017). Mit einer Konzentration der rekombinanten rab31-Lösung von 100 µg/ml kann also davon ausgegangen werden, dass hiermit meistens höhere Konzentrationen als unter physiologischen Bedingungen vorliegen.

Eine weitere Erklärung könnte der zur Reinigung verwendete His-tag sein, welcher die Löslichkeit von Proteinen einschränken kann. In der Literatur wurden *tags* beschrieben, welche

sich hinsichtlich ihrer Löslichkeit möglicherweise besser eignen, wie zum Beispiel der in dieser Arbeit ebenfalls verwendete GST-*tag*, *maltose binding protein* (MBP)- oder *thioredoxin* (Trx)-*tags* (Dyson et al., 2004). Der His-*tag* wurde jedoch von uns zur Immunisierung gewählt, da er in unserer Arbeitsgruppe schon häufig zur Antikörperproduktion verwendet und sich als nicht stark immunogen erwies. Aufgrund seiner relativ geringen Größe birgt er ein vergleichsweise niedriges Risiko von stark ausgeprägten Antikörperreaktionen gegen den *tag* selbst. Tatsächlich führte die Immunisierung mit rab31-His in der Konzentration von 100 µg/ml sowohl im Kaninchen als auch im Huhn zur erfolgreichen Isolierung von Antikörpern gegen rab31.

Der Fokus dieses Forschungsprojektes lag auf der Herstellung von polyklonalen rab31-Antikörpern, da diese im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern recht einfach zu generieren sind. Außerdem sind die Kosten relativ gering und sie bieten zudem den Vorteil einer hohen Sensitivität, da die Vielfältigkeit bezüglich verschiedener Epitope bei polyklonalen Antikörpern hoch ist. Dies liegt darin begründet, dass ein einzelnes Antigen verschiedene antigene Determinanten hat. Daher ist ein Antiserum auch nie exakt zu reproduzieren. Die hohe Sensitivität entsteht durch diese Eigenschaft der Antigenerkennung in fast allen Konformationen, selbst nach starker Denaturierung.

Nachdem zu Beginn des Projekts noch keine Antikörper gegen rab31 verfügbar waren, entschieden wir uns, zusätzlich zu den polyklonalen Antikörpern aus Seren von Kaninchen auch polyklonale Antikörper in Hühnern herzustellen und diese aus dem Eidotter zu reinigen. Dies ermöglicht beispielsweise die Etablierung eines ELISAs mit *coating*- und Detektions-Antikörper zwei verschiedener Tierarten. Während Antiseren von Kaninchen wie für Säugetiere kennzeichnend Immunglobuline der Klasse IgG enthalten, produzieren Hühner als Vögel als Äquivalent hierzu Immunglobuline der Klasse IgY. Diese werden auf den Eidotter übertragen und können hieraus nicht-invasiv in großen Mengen isoliert werden. Trotz der Ähnlichkeit von IgY und IgG, hat IgY eine stark verkürzte „*hinge region*“, welche zu einer Flexibilität im Fc-Teil führt. Somit weisen IgY aus immunisierten Hühnern eine andere Spezifität als IgG aus immunisierten Kaninchen auf (Dias da Silva und Tambourgi, 2010).

5.2 Charakterisierung der Antikörper und deren Bedeutung für Folgearbeiten

Nach der Immunisierung wurden die Antikörper von jeweils 4 Kaninchen- und Hühnern getrennt charakterisiert. Sowohl Kaninchen (RT1-4)- als auch Hühner (ChT1-4)-Antikörper reagierten im Westernblot mit rab31. Unter den Hühner-Antikörpern waren ChT3- und ChT4-Antikörper sensitiver als ChT1- und 2-IgY. Die im Westernblot bestätigte Sensitivität der polyklonalen Antikörper zeigt, dass die Immunisierung von beiden Tierarten in jeweils allen Tieren erfolgreich war und bekräftigt die Annahme, dass Antikörper aus Eidotter eine gute Alternative zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern darstellen. Eine mögliche Erklärung für die geringere Sensitivität der Hühner-Antikörper ChT1- und ChT2-IgY könnte in einer geringeren Detektierbarkeit durch die oben beschriebene Flexibilität im Fc-Teil liegen. Bei ähnlicher Sensitivität wie ChT3- und ChT4-IgY waren die Kaninchen-Antikörper spezifischer bzw. zeigten weniger Kreuzreaktionen mit anderen getesteten Proteinen wie KLK und HER2, welche GST- oder His-tags trugen. Andere Studien unserer Arbeitsgruppe belegen aber, dass polyklonale Hühnerantikörper gegen humane Proteine in zellbiologischen und gewebespezifischen Analysen eingesetzt werden können (Seiz et al., 2010).

Polyklonale Antikörper (pAbs) aus verschiedenen Organismen ermöglichen die Etablierung von Tests mit *sandwich*-ELISA. Im *sandwich*-ELISA, in welchem die pAbs aus den Hühnern, ChT3/ChT4-IgY, jeweils mit den pAbs aus Kaninchen, RT1-4-IgG, kombiniert verwendet wurden, ließen sich rab31-spezifische Reaktionen nachweisen. Hingegen reagierten die Antikörper nicht oder kaum mit irrelevanten Kontrollproteinen (BSA, HER2, KLK4). Auch dies spricht für eine starke Affinität aller getesteten Antikörper mit hoher Sensitivität gegenüber dem rab31-Antigen. Es zeigt auch, dass sowohl aviäre als auch Kaninchen Antikörper sich grundsätzlich für den Einsatz in beiden Detektionsmethoden eignen.

Um die polyklonalen Kaninchen-Antikörper noch weiter zu reinigen und unspezifische Reaktionen gegen den His-tag oder andere Proteine zu eliminieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Affinitätsreinigungsmethode über eine PVDF-Membran, welche rab31 gebunden trägt, etabliert. Unsere Ergebnisse zeigten, dass mit dieser Methode erfolgreich die Spezifität der Kaninchen-Antikörper gesteigert werden konnte.

Die Antikörper wurden mittels Westernblot, *one sided*- und *sandwich*-ELISA auf Kreuzreaktionen zu nicht verwandten Proteinen wie BSA, Kallikrein (KLK) 4, KLK 6 und HER2 getestet. Dabei wurden auch Kontrollproteine mit His-tag geprüft. Die Tests aller hergestellten An-

tikörper (ChT1-4-IgY und RT1-4-IgG) zeigten allerdings, dass die IgG-Antikörper aus Kaninchen spezifischer reagierten, als die aviären IgY. Die positiven Ergebnisse in dieser Arbeit hinsichtlich Sensitivität und Spezifität der hergestellten Antikörper dienten als Grundlage für nachfolgende Arbeiten, die den Antikörper weiter untersuchten.

In Folgeprojekten wurden alle Antikörper weiterhin in *sandwich*-ELISA- sowie in Westernblot-Analysen untersucht. Dabei wurde auch auf mögliche Kreuzreaktionen mit den eng verwandten Proteinen rab5 und rab22A im Westernblot getestet, wobei RT3 die spezifischste Reaktion aller Antikörper zeigte. RT3 und RT4-IgG zeigten keine Kreuzreaktionen mit rab5. Nur nach langer Exposition im Westernblot zeigte sich eine schwache Kreuzreaktion mit rab22A (Grismayer, persönliche Mitteilung). Dies lässt sich als weiterer Hinweis dafür werten, dass die Antikörper aus Kaninchen noch spezifischer reagierten, als die aus dem Eidotter isolierten Antikörper. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wurden in diesem Folgeprojekt die Kaninchen-Antikörper in immunhistochemischen und immunzytochemischen Färbungen getestet. Von den vier Kaninchen-Antikörpern zeigten RT1- und RT2-IgG nur unspezifische Reaktionen in immunzytochemischen Analysen, aber RT3- und RT4-IgG wiesen ein spezifisches Signal in rab31-überexprimierenden Zellen auf. Rab31 konnte auch in Schnitten von Mammakarzinomgewebe durch die Bindung von RT3- und RT4-IgG angefärbt werden. Somit bestätigen sowohl die immunzytochemischen als auch die immunhistochemischen Untersuchungen die Qualität der Antikörper RT3- und RT4-IgG (Grismayer et al., 2012).

Schließlich konnte mit Hilfe des in diesem Projekt generierten Kaninchen-Antikörpers RT3 in einem weiteren Folgeprojekt ein spezifischer *sandwich*-ELISA etabliert werden. Dieser ELISA verwendet einen kommerziellen, monoklonalen Antikörper, welcher erst nach Abschluss dieser Dissertation verfügbar war. Für die Entwicklung dieses rab31-ELISAs wurde der monoklonale Antikörper aus der Maus (mAb M01, Novus Biologicals, Wiesbaden, Deutschland) als *catching*-Antikörper und RT3-IgG als Detektionsantikörper verwendet. Das Detektionslimit liegt bei 0,15 ng/ml, der messbare Bereich des ELISAs liegt bei 0,15 - 5 ng/ml (Kotzsch et al., 2017).

5.3 Analyse der tumorbiologischen Rolle von rab31

In der vorliegenden Dissertation wurde ein eukaryotisches rab31-Expressionsplasmid pRc/RSV-rab31 hergestellt und erfolgreich in verschiedene Mammakarzinom-Zellen (der Linie MDA-MB-231) transfiziert. Die Expressionstests im Westernblot mit den Antikörpern RT3-

und RT4-IgG ergaben eine niedrige rab31-Basis-Expression (schwache Bande) und eine signifikante Erhöhung der rab31-Expression (starke Bande) nach Transfektion der Zellen mit dem rab31-Expressionsvektor, was als Nachweis der erfolgreichen Transfektion mit anschließender rab31-Expression gewertet werden kann. In Folgearbeiten wurden diese Ergebnisse mittels ELISA bestätigt.

In ersten Folgearbeiten wurden in mit dem Transfektionsplasmid pRc/RSV-rab31 stabil transfizierten MDA-MB-231- und CAMA-1-Zellen in immunzytochemischen Färbungen schwache bis mittelmäßige zytoplasmatische Färbungen von rab31 mit teils starker perinukleärer oder nukleärer Färbung beobachtet. Dagegen zeigten normale Stromazellen weniger starke Färbungen. Hierbei wurde ebenfalls der in der vorliegenden Arbeit hergestellte Antikörper RT3-IgG-rab31 eingesetzt. RT3-IgG eignete sich zur Selektion von verschiedenen Klonen mit unterschiedlichen Expressionsniveaus. Dabei wurden Zellklone von rab31-überexprimierenden Zelllinien mit verschiedenen rab31-Expressionsniveaus isoliert und auf tumorbiologisch relevante Prozesse untersucht (Grismayer et al., 2012). Darüber hinaus konnten später mittels *sandwich*-ELISA mit RT3 die Expressionshöhen von rab31 in weiteren Zelllinien analysiert werden (Kotzsch et al., 2017). Somit stellen die in der vorliegenden Arbeit etablierten, polyklonalen Antikörper gegen rab31, insbesondere RT3- und RT4-IgG, wichtige Werkzeuge zur weiteren Analyse der tumorbiologischen Rolle von rab31 dar.

Bei den folgenden Proliferationsanalysen stellte sich heraus, dass eine höhere rab31-Expression mit höheren Proliferationsraten assoziiert ist. Die dabei mittels Westernblot beobachtete Expression wurde durch einen *sandwich*-ELISA, der RT3-IgG als Detektionsantikörper verwendet, bestätigt. Dabei waren in Zelllinien ohne endogene rab31-Expression (CAMA-1) oder mit geringer endogener rab31-Expression (MDA-MB-231) nach Transfektion mit pRc/RSV-rab31 schon gering bis mäßig erhöhte rab31-Expressionsraten ausreichend, um Effekte auf die Zellproliferation zu beobachten (Grismayer et al., 2012).

Hingegen waren rab31-überexprimierende Zellen überraschenderweise weniger adhärenz zu extrazellulären Matrixproteinen. Des Weiteren verhielten sie sich weniger invasiv, gemessen an der Fähigkeit eine extrazelluläre Matrix (MatrigelTM) zu durchdringen. Auch im Nacktmausmodell war die Rate an Lungenmetastasen bei Mäusen, die mit rab31-überexprimierenden Zellen in die Schwanzvene inokuliert wurden, im Vergleich zu Mäusen, die Injektionen mit Zellen mit Kontrollvektoren mit geringer Basalexpression erhalten hatten, signifikant niedriger (Grismayer et al., 2012). Für die Hypothese, dass rab31 nicht direkt mit

der Invasion assoziiert ist, scheinen die Beobachtungen an CAMA-1-Zellen aus dieser Arbeit zu sprechen. CAMA-1-Zellen wurden ursprünglich aus einem pleural metastasierten Mammakarzinom isoliert und stellen somit ein invasives Stadium von Mammakarzinomzellen dar. Der fehlende Nachweis von rab31-mRNA beim Versuch der cDNA-Isolierung aus CAMA-1-Zellen (5.1.1) könnte die Hypothese unterstützen, dass rab31 das Metastasierungspotential und die Invasivität der Mammakarzinomzellen nicht direkt beeinflusst. Auch zeigen die Expressionstests in Folgearbeiten, dass CAMA-1-Zellen die mit leerem pRc/RSV-Vektor transfiziert wurden, endogen kein rab31 exprimieren. Gemäß der Hypothese eines Phenotyp-Switches von Tumorzellen, weisen Tumorzellen abhängig vom *microenvironment* unterschiedliche Transkriptionssignaturen auf, welche entweder zu einem proliferativen oder invasiven Verhalten führen können (Hoek et al., 2008). In Bezug auf ER+-Mammakarzinomzellen könnte man schlussfolgern, dass bei zirkulierenden Tumorzellen keine, jedoch bei lokal begrenzten Tumoren eine hohe rab31-Expression zu erwarten wäre. Daher könnte die Beobachtung an CAMA-1 ein weiterer Hinweis darauf sein, dass rab31 nicht entscheidend für die Invasion, aber sehr wohl für die Proliferation des Mammakarzinoms ist. Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich diese Beobachtung am Einzelfall *in vitro* auf weitere zirkulierende Mammakarzinomzellen aus Patientenproben *in vivo* übertragen lässt. Eine Analyse von rab31 in zirkulierenden Mammakarzinomzellen könnte auch Rückschlüsse auf die Expressionshöhen in verschiedenen Tumorstadien zulassen.

Vor dem Hintergrund, dass hohe rab31-mRNA-Werte mit einer schlechten Prognose beim Mammakarzinom assoziiert sind, scheinen diese Ergebnisse auf den ersten Blick unerwartet. Jedoch durchlaufen Tumorzellen während der Tumorgenese verschiedene Stadien. So geht die erste Phase des Wachstums des Primärtumors mit vermehrter Proliferation und Angiogenese einher. In der zweiten Phase erlangt sie Fähigkeiten, sich aus dem Zellverband zu lösen (Evasion), in Blut und Lymphwege einzudringen (Migration), sich in fremdem Gewebe niederzulassen und dort einen neuen Tumor zu erzeugen (Invasion). An dem Ort der Metastasenbildung muss zum erneuten Wachstum der proliferative Phänotyp wiederhergestellt werden (Gao et al., 2005). Rab31 könnte daher abhängig von seinem Expressionslevel einen Schalter darstellen, der zwischen einem proliferativen und invasivem Stadium von Mammakarzinomzellen wechselt (Kotzsch et al., 2017). Es konnte gezeigt werden, dass auch beim Magenkarzinom eine Herunterregulation von rab31 über *glioma-associated oncogene homolog 1* (GLI 1)

zu erhöhter Proliferation und verminderter Apoptose führt (Tang et al., 2018). Dies bekräftigt die Ergebnisse unserer Forschungsgruppe.

5.4 Klinische Relevanz von rab31 beim Mammakarzinom

Mucin 1 (MUC1) ist ein Glycotransmembranprotein, welches proteolytisch in zwei Untereinheiten gespalten wird. Die α -Untereinheit MUC1-N kann als Tumormarker *cancer antigen* (CA15-3) im Blut nachgewiesen werden. Die β -Untereinheit MUC1-C ist ein Signalmolekül, das mit einer Vielzahl von Tyrosinkinase-Rezeptoren interagiert, welche an *downstream*-Signalwegen beteiligt sind, wie beispielsweise dem EGFR- oder HER2-Rezeptor. Über eine Induktion des Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/AKT)-Signalweges ist es möglicherweise an einer Tamoxifen-Resistenz beteiligt (Jin et al., 2012). Nach Translokation in den Nukleus moduliert MUC1-C als Teil eines Transkriptionskomplexes die Expression von tumorrelevanten Proteinen. Beim triple-negativen Mammakarzinom erhöht es die Transkription von PD-L1 über Rekrutierung von MYC und *nuclear factor-kB* (NF-kB) p65 am PD-L1 Promotor, was entscheidend zu einer Immunevasion beiträgt (Maeda et al., 2018). Bei ER⁺-Mammakarzinomen konnte rab31 als eines der überexprimierten Gene identifiziert werden (Abba et al., 2005). Hier induziert MUC1-N/CA15-3 die rab31-Expression durch Komplexbildung mit dem Östrogenrezeptor ER α . In einer selbst-induzierenden Schleife (*feedback-loop*) erhöht rab31 wiederum die MUC1-C-Konzentration, indem es seine Degradation in Lysosomen verzögert (Jin et al., 2012).

Die Assoziation von rab31 mit MUC1-C wurde von unserer Arbeitsgruppe beim HR⁺-Mammakarzinom auf Proteinebene anhand von Gewebeproben aus ER⁺-Patientinnen retrospektiv untersucht und mit klinikopathologischen Parametern sowie mit der Prognose korreliert. Hierzu wurde der *sandwich*-ELISA verwendet, der den in dieser Arbeit generierten pAb RT3-IgG als Detektionsantikörper nutzt. Interessanterweise korrelierte die Menge von CA15-3 nicht mit der von rab31. Beim Abgleich mit der klinischen Prognose wurde sogar ein gegensätzlicher Effekt festgestellt: Während erhöhte rab31-Werte signifikant mit einem höheren *Grading* und kürzerem *disease free survival* (DFS) assoziiert waren, korrelierte die Menge von CA15-3 negativ mit dem *Grading* und es konnte ein längeres DFS in der univariablen Analyse nachgewiesen werden. Eine ähnliche Tendenz konnte bezüglich der Korrelation von rab31 und dem Proliferationsmarker, S-Phase-Aktivität (*S-Phase-fraction SPF*), gezeigt werden (Kotzsch et al., 2017). Hier zeigte sich, dass erhöhte rab31-Werte auch mit höherem SPF-

Index einhergehen. Dies bestätigt den Befund unserer Arbeitsgruppe, dass eine erhöhte rab31-Expression mit einer gesteigerten Proliferation assoziiert ist (Grismayer et al., 2012). In diesen Experimenten wurde intrazelluläres MUC1-C, nicht extrazelluläres MUC1-N bestimmt, was möglicherweise die Unterschiede zu den Studien erklärt, in denen die Rolle von MUC1-N untersucht wurde.

Die Assoziation von erhöhter rab31-mRNA mit schlechterer Prognose könnte auch auf Interaktionen der rab31-RNA mit dem Mammakarzinom-assoziierten Protein HuR zurückzuführen sein. Bei ER⁺-Mammakarzinomen korreliert HuR mit einer schlechten Prognose von verschiedenen Tumorerkrankungen (Wang et al., 2013) und scheint mit Tamoxifen-Resistenz von MCF-7-Mammakarzinomzellen assoziiert (Hostetter et al., 2008). Sehr interessant ist, dass das mRNA-bindende HuR an das rab31-Transkript bindet, was zu einer Erhöhung der mRNA-Halbwertszeit führt und damit zu erhöhten rab31-mRNA-Werten führen könnte. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die rab31-Promoterregion ER-abhängig aktiviert werden könnte, beispielsweise durch eine Co-Stimulation von ER α und MUC1-C (Kotzsch et al., 2017).

Bei triple-negativen Mammakarzinomen (TNBC) ist auch die Interaktion von MUC1-C mit dem PD-L1-Promotor interessant. Beim Mammakarzinom ist möglicherweise die PD-L1-vermittelte Immunevasion in den verschiedenen Subtypen und Stadien unterschiedlich reguliert, wobei diese beim ER⁺-Mammakarzinom komplexer (*cold tumors*) als beim TNBC zu sein scheint (*hot tumors*) (Chen und Mellman, 2013). Dies könnte eine Erklärung für das Auftreten von einem rab31-vermittelten proliferativen Erscheinungsbild sein, was erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Immunevasion und damit zur Metastasenbildung führt. Eine solch spekulative Theorie könnte eine mögliche Erklärung für die, von unserer Forschergruppe angenommene, Schalterfunktion von rab31 zwischen dem proliferativen und invasiven Phänotyp darstellen.

5.5 Interaktionen von rab31 mit Rezeptoren

Weitere interessante Interaktionen weisen darauf hin, dass rab31 bei A431-Zellen (Plattenepithelkarzinom der Vulva) eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) spielt (Ng et al., 2009). EGFR ist am Stoffwechsel vieler Tumoren beteiligt. Beim Mammakarzinom ist eine erhöhte Expression von EGFR mit einer schlechteren Prognose und höheren Proliferationsraten von adjuvant therapierten Patientinnen

assoziiert (Rimawi et al., 2010). Erhöhte Proliferationsraten erfordern erhöhte Konzentrationen von Stoffwechselprodukten, Substraten und Enzymen aufgrund des gesteigerten Energiebedarfs. Interessanterweise hemmt eine erhöhte rab31-Expression die Glukoseaufnahme in die Zelle, indem es die insulinabhängige GLUT4-Translokation zur Membran blockiert. Hingegen potenziert ein rab31-*knockout* die insulinstimulierte GLUT4-Translokation und Glukose-Aufnahme. (Lodhi et al., 2007).

Weiterhin ist rab31 für den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR)-Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk zu den Endosomen erforderlich. Dieser Transport scheint abhängig von RIN3 zu sein, welches hier für rab31 als *exchange factor* agiert und somit den rab31-abhängigen M6PR-Transport moduliert (Kajiho et al., 2011). Nicht nur die rab31-mRNA-, sondern auch die uPA-mRNA-Expression wird von HuR reguliert, was auf eine tumorbiologische Assoziation der beiden Faktoren hinweist. So könnte die von Kotzsch et al. (2008) beobachtete gleichzeitige Überexpression von uPAR del 4/5 und rab31 in Mammakarzinomgewebe durch eine gemeinsame Regulation von uPA und rab31 durch HuR erklärt werden. Hinzu kommt, dass auch uPAR mit M6PR interagiert. So scheint M6PR am Abbau von uPAR beteiligt zu sein, indem es uPAR den Endosomen zuführt und somit über Degradierung die Membrankonzentration von uPAR reguliert. Möglicherweise moduliert rab31 aufgrund seiner regulatorischen Funktion auf den M6PR die uPA Aktivität (Kotzsch et al., 2016).

Kürzlich fanden Soelch et al. (2021), dass eine erhöhte rab31-Expression zu einer verminderten Expression von *transforming growth factor* (TGF)- β führt. Eine weitere mögliche Erklärung für die klinisch schlechtere Prognose bei hoher rab31-Expression im Primärtumor könnte eine Hemmung der tumorsuppressiven Wirkung von TGF- β sein (Soelch et al., 2021).

5.6 Rab31 – Prognosemarker und potentiell therapeutisches Ziel?

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Folgeexperimente auf eine Schlüsselrolle von rab31 durch seine Interaktion mit Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren hin sowie auf einen engen intrazellulären Austausch zwischen den Kompartimenten und der Membran. Diese vielfältigen Interaktionen machen rab31 weiterhin als Prognosefaktor äußerst interessant. Die prognostische Aussagekraft von rab31 hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der Rezidivfreiheit wurde in ER+-Mammakarzinomgeweben bestätigt. Eine erhöhte rab31-mRNA-Expression ist mit einer schlechteren Prognose von Mammakarzinompatientinnen assoziiert (Kotzsch et al., 2008). Ein idealer biologischer Prognosefaktor sollte neben hoher prognosti-

scher Vorhersagekraft auch gut validiert und kosteneffizient messbar sein und im Optimalfall auch ein therapeutisches Ziel darstellen (Duffy et al., 2014).

Als therapeutisches Ziel ist rab31 durch seine intrazelluläre Lokalisation schwerer erreichbar als extrazelluläre Proteine oder Membranrezeptoren. Jedoch sind neuere Therapie-Versuche mit *small interfering RNAs* (siRNAs) vielversprechend. Hierbei handelt es sich um synthetisch hergestellte einzel- oder doppelsträngige RNA-Sequenzen von 20-23 Basenpaaren Länge, die komplementäre RNA binden, um sie damit zu inaktivieren (Elbashir et al., 2001). In klinischen Phase-1-Studien wurde gezeigt, dass es möglich ist, solche siRNAs zum Tumorgewebe zu transportieren (Davis et al., 2010). Als weitere neue Therapiemöglichkeit wird der Einsatz von microRNAs untersucht. So wurde beispielsweise microRNA-30c-2-3p als möglicher Inhibitor der rab31/GLI1-Interaktion beim Magenkarzinom identifiziert. Rab31 fördert die Progression beim Magenkarzinom, indem es den GLI-Signalweg aktiviert und somit Proliferation und Apoptose beeinflusst. MicroRNA-30c-2-3p inhibiert diese Interaktion und scheint mit einer besseren Prognose des Magenkarzinoms assoziiert. Nach Transfektion mit microRNA-30c-2-3p wurde die vermehrte Proliferation *in vitro* inhibiert. MicroRNA-30c-2-3p reguliert rab31 und könnte daher ein weiterer interessanter Ansatzpunkt für neue Therapieoptionen sein (Tang et al., 2018).

Zudem wurden vielversprechende Resultate mit Inhibitoren der rab-Geranylgeranyltransferase (rab-GGTase) erzielt, welche durch Prenylierung für die Aktivität der rab-Proteine entscheidend ist (siehe 2.4.1). Durch Inhibition der Prenylierung wird die Aktivierung der rab-Proteine verhindert. Hierbei wäre das *gunmetal mouse model* zu erwähnen, bei dem die rab-GGTase-Aktivität signifikant reduziert wurde. Diese Mäuse zeigen Hypopigmentierung und Veränderungen der Thrombozytenbiosynthese, aber grundsätzlich scheint die Verminderung in der rab-GGTase-Aktivität in diesen Tierexperimenten gut toleriert zu werden. Die rab-GGTase ist in verschiedenen Tumoren überexprimiert. Einige Farnesyltransferase-Inhibitoren, welche pro-apoptotische Effekte aufweisen, zielen auf die rab-GGTase. Ein Bisphosphonat-Derivat, 3-PEHPC [3-(3-pyridyl)-2-hydroxy-2-phosphonopropanoic acid], ist sehr spezifisch für die rab-GGTase und zeigt anti-resorptive Aktivität bei Osteoklasten, induziert *in vitro* Apoptose in menschlichen Myelom-Zellen und wirkt *in vivo* osteoprotektiv im Mausmodell. Darüber hinaus inhibiert es metastatische Zellinvasion *in vitro* und vermindert das Wachstum von Skelettumoren *in vivo*. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Inhibition des rab-

Systems tatsächlich ein potentes therapeutisches Ziel darstellen könnte (Recchi und Seabra, 2012).

Bisher steht jedoch noch kein vollständig entwickeltes, rab-spezifisches Medikament zur Verfügung. Verschiedene Begründungen, diese weiter zu entwickeln, sind theoretisch durch die Interaktion mit dem Glukose- sowie dem Hormonrezeptor-Stoffwechsel gegeben. Beide werden als tumorfördernd beim Mammakarzinom gewertet und wären daher vielversprechende Angriffspunkte. Auch werden im Rahmen der Immuntherapien derzeit viele Versuche unternommen, kalte Tumoren in heiße Tumoren zu verwandeln, wo die weitere Untersuchung der Rolle von rab31, MUC1 und PD-L1 ein interessanter Ansatz zur Kombinationstherapie sein könnte. Auch gegen MUC1 gibt es bereits erste Ansätze zur Entwicklung von *antibody drug conjugates* (ADC) (Panchamoorthy et al., 2018), Antikörpern (Kim et al., 2020) und Impfungen (Beckwith und Cudic, 2020). Jedoch zeigt die Komplexität der Interaktionen, dass kombinierte Therapieansätze notwendig sind, welche verschiedene Moleküle blockieren, die zur Tumorentstehung beitragen.

5.7 Ausblick

In zellbiologischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Expressionshöhe von rab31 wichtige tumorrelevante Prozesse wie Proliferation, Adhäsion und Invasion in Mammakarzinomzellen moduliert. Die Überexpression von rab31 in Mammakarzinomzellen führt *in vitro* zu einer Verschiebung von einem invasiven zu einem proliferativen Phänotyp der Zellen (Grismayer et al., 2012). Soelch et al. (2021) bestätigten eine erhöhte Proliferationsrate im 3D Modell. Somit weisen sowohl 2D als auch 3D Modelle darauf hin, dass eine erhöhte rab31-Expression mit einem erhöhten proliferativen Status einhergehen. Da die Korrelation von rab31-Antigengehalt in Tumorgewebeextrakten mit der klinischen Prognose von ER+-Tumoren bereits sehr interessante Ergebnisse gezeigt hat, könnten weitere Untersuchungen in Formalin-fixiertem, Paraffin-gebetteten Gewebe in größerem Umfang durchgeführt werden und die Expression von rab31 im Gewebe mit weiteren klinischen Daten, MUC1 und PD-L1 sowie dem klinischen Verlauf der Tumorerkrankung wie *progression free survival* (PFS) oder *overall survival* (OS) korreliert werden. Dazu bietet sich auch die Nutzung von bestehenden Tumorbibliotheken an, in denen der klinische Verlauf bereits gut dokumentiert ist.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit mit der Expression von rekombinantem rab31 und Produktion von spezifischen Antikörpern ein Grundstein für weitere Untersuchungen gelegt.

Entsprechend den sorgfältigen Analysen unserer Forschungsgruppe scheint das rab31-Protein aufgrund seines nachgewiesenen prognostischen Wertes das Potential zu einem klinisch nutzbaren Prognosemarker zu haben. Über seine prognostische Aussagekraft hinaus ist es gut messbar und stellt ein potentiell therapeutisches Ziel dar. Auf Basis dieser wichtigen Erkenntnisse sind weitere Studien notwendig, um die tumorbiologische Rolle von rab31 genauer zu untersuchen und um Schwellenwerte bezüglich der prognostischen Aussagekraft zu determinieren.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

<i>Abb. 1:</i>	Die multifunktionale Rolle des uPA-Signalweges bei Tumorwachstum, Invasion und Metastasenbildung	4
<i>Abb. 2:</i>	Schematische Darstellung der Domänen des uPA-Rezeptors	5
<i>Abb. 3:</i>	Expression von rab31-mRNA in Abhängigkeit von der uPAR-del4/5-Expression	6
<i>Abb. 4:</i>	Metastasenfreie Überlebensrate (<i>distant metastasis free survival</i> , DMFS) in Abhängigkeit von der rab31-mRNA-Expression im Tumorgewebe	7
<i>Abb. 5:</i>	Struktur von rab31	8
<i>Abb. 6:</i>	Rab-Zyklus und rab-Zustandsformen	10
<i>Abb. 7:</i>	Zwei Modelle des Membrantransportes am Golgi-Apparat und Trans-Golgi-Netzwerk (TGN)	13
<i>Abb. 8:</i>	Schematische Darstellung und chemische Struktur von Ni ²⁺ -NTA-Agarose und der Interaktion mit dem 6-His-tag von rekombinanten Proteinen	33
<i>Abb. 9:</i>	Schematische Darstellung und chemische Struktur von an Agarose immobilisiertem Glutathion.	35
<i>Abb. 10:</i>	Schematische Darstellung des <i>one-sided</i> ELISAs	38
<i>Abb. 11:</i>	Schematische Darstellung des <i>sandwich</i> -ELISAs	39
<i>Abb. 12:</i>	Schematische Darstellung der doppelten PCR zum Anhängen der Schnittstellen	44
<i>Abb. 13:</i>	Agarose-Gelelektrophorese zur qualitativen Kontrolle rab31- <i>full-length</i> -cDNA	45
<i>Abb. 14:</i>	Abschätzung der Konzentration des Gel-gereinigten rab31-cDNA Fragments mittels Agarose-Gelelektrophorese	46
<i>Abb. 15:</i>	Schematische Darstellung des Vektors pQE-30-rab31 nach Ligation mit dem rab31-Fragment	47
<i>Abb. 16:</i>	Restriktionsanalyse von pQE-30-rab31 mit Bam HI und Hind III	48
<i>Abb. 17:</i>	Sequenz von rab31-His mit den Schnittstellen Bam HI und Hind III	49
<i>Abb. 18:</i>	Expressionskontrolle von Klon 7 in den Bakterienstämmen XL1 <i>blue</i> und M15 [pREP4]	50
<i>Abb. 19:</i>	Affinitätsreinigung von rab31-His aus <i>E. coli</i> -Lysat mittels Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromographie	51

<i>Abb. 20:</i> Einengung von rab31-His mittels Zentrifugation im Millipore®-Filter und Konzentrationsbestimmung	52
<i>Abb. 21:</i> Schematische Darstellung des Vektors pGEX-6P-2-rab31 nach Ligation mit dem rab31-Fragment	53
<i>Abb. 22:</i> Die Restriktionsanalyse von sechs pGEX-6P-2-rab31-Klonen mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Xho I	54
<i>Abb. 23:</i> Sequenz von GST-rab31 mit den Schnittstellen Bam HI und Xho I	55
<i>Abb. 24:</i> Affinitätschromatographie von GST-rab31 mit immobilisiertem Glutathion	56
<i>Abb. 25:</i> Charakterisierung der polyklonalen Antikörper von Kaninchen T3 mittels <i>one-sided</i> ELISA	57
<i>Abb. 26:</i> <i>Sandwich</i> -ELISA zur Überprüfung des Immunisierungserfolges nach 130 Tagen	58
<i>Abb. 27:</i> Westernblot zur Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers RT3-IgG aus dem Kaninchen auf Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen mit <i>His-tag</i>	59
<i>Abb. 28:</i> Affinitätsreinigung des Serums von RT3 zur Isolation von RT3-IgG	60
<i>Abb. 29:</i> Isolierung von anti-rab31-chicken-IgY aus Eidotter von chicken T1 mittels Dextransulfatfällung	61
<i>Abb. 30:</i> Schematische Darstellung des Vektors pRc/RSV-rab31	62
<i>Abb. 31:</i> Restriktionsanalyse verschiedener pRc/RSV-rab31-Klone	63
<i>Abb. 32:</i> Sequenz von rab31-His mit den Schnittstellen Hind III und Xba I	63
<i>Abb. 33:</i> Westernblot-Analyse zum Expressionsnachweis von pRc/RSV-rab31 in MDA-MB-231	64

Tabelle

<i>Tab. 1:</i> Charakterisierung der polyklonalen Antikörper (pAbs)	59
---	----

Literaturverzeichnis

Abba, M.C., Hu, Y., Sun, H., Drake, J.A., Gaddis, S., Baggerly, K., Sahin, A., und Aldaz, C.M. (2005). Gene expression signature of estrogen receptor alpha status in breast cancer. *BMC Genomics* 6, 37.

Agola, J.O., Hong, L., Surviladze, Z., Ursu, O., Waller, A., Strouse, J.J., Simpson, D.S., Schroeder, C.E., Oprea, T.I., Golden, J.E., *et al.* (2012). A competitive nucleotide binding inhibitor: in vitro characterization of Rab7 GTPase inhibition. *ACS Chem Biol* 7, 1095-1108.

Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L., und Duffy, M.J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72, 1-22.

Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., *et al.* (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72, 1117-1130.

Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10, 411-421.

Bao, X., Faris, A.E., Jang, E.K., und Haslam, R.J. (2002). Molecular cloning, bacterial expression and properties of Rab31 and Rab32. *Eur J Biochem* 269, 259-271.

Barr, F.A. (2009). Rab GTPase function in Golgi trafficking. *Semin Cell Dev Biol* 20, 780-783.

Beckwith, D.M., und Cudic, M. (2020). Tumor-associated O-glycans of MUC1: Carriers of the glyco-code and targets for cancer vaccine design. *Semin Immunol* 47, 101389.

Carney, D.S., Davies, B.A., und Horazdovsky, B.F. (2006). Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. *Trends Cell Biol* 16, 27-35.

Chen, D., Guo, J., Miki, T., Tachibana, M., und Gahl, W.A. (1996). Molecular cloning of two novel rab genes from human melanocytes. *Gene* 174, 129-134.

Chen, D.S., und Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39, 1-10.

Chua, C.E., und Tang, B.L. (2014). Engagement of the small GTPase Rab31 protein and its effector, early endosome antigen 1, is important for trafficking of the ligand-bound epidermal growth factor receptor from the early to the late endosome. *J Biol Chem* 289, 12375-12389.

Chua, C.E., und Tang, B.L. (2015). The role of the small GTPase Rab31 in cancer. *J Cell Mol Med* 19, 1-10.

Coates, A.S., Winer, E.P., Goldhirsch, A., Gelber, R.D., Gnant, M., Piccart-Gebhart, M., Thurlimann, B., Senn, H.J., und Panel, M. (2015). -Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 26, 1533-1546.

Corbeel, L., und Freson, K. (2008). Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. *Eur J Pediatr* 167, 723-729.

Davis, M.E., Zuckerman, J.E., Choi, C.H., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C.A., Yen, Y., Heidel, J.D., und Ribas, A. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464, 1067-1070.

Dias da Silva, W., und Tambourgi, D.V. (2010). IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 135, 173-180.

Duffy, M.J. (2004). The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des* 10, 39-49.

Duffy, M.J., McGowan, P.M., Harbeck, N., Thomssen, C., und Schmitt, M. (2014). uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res* 16, 428.

Dyson, M.R., Shadbolt, S.P., Vincent, K.J., Perera, R.L., und McCafferty, J. (2004). Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnol* 4, 32.

Easton, D.F., Pharoah, P.D., Antoniou, A.C., Tischkowitz, M., Tavtigian, S.V., Nathanson, K.L., Devilee, P., Meindl, A., Couch, F.J., Southey, M., *et al.* (2015). Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N Engl J Med* 372, 2243-2257.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., und Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.

- Elston, C.W., und Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 403-410.
- Farr, A., Wuerstlein, R., Heiduschka, A., Singer, C.F., und Harbeck, N. (2013). Modern Risk Assessment for Individualizing Treatment Concepts in Early-stage Breast Cancer. *Rev Obstet Gynecol* 6, 165-173.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Pineros, M., Znaor, A., und Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 144, 1941-1953.
- Galea, M.H., Blamey, R.W., Elston, C.E., und Ellis, I.O. (1992). The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 22, 207-219.
- Gao, C.F., Xie, Q., Su, Y.L., Koeman, J., Khoo, S.K., Gustafson, M., Knudsen, B.S., Hay, R., Shinomiya, N., und Vande Woude, G.F. (2005). Proliferation and invasion: plasticity in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10528-10533.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland / Robert - Koch Institut (RKI): Krebs in Deutschland 2017/2018, Häufigkeiten und Trends: Brustdrüse der Frau, 13. Auflage 2021.
- Giuliano, A.E., Connolly, J.L., Edge, S.B., Mittendorf, E.A., Rugo, H.S., Solin, L.J., Weaver, D.L., Winchester, D.J., und Hortobagyi, G.N. (2017). Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* 67, 290-303.
- Glick, B.S., und Nakano, A. (2009). Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 113-132.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thurlimann, B., Senn, H.J., und Panel, m. (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22, 1736-1747.
- Grismayer, B., Solch, S., Seubert, B., Kirchner, T., Schafer, S., Baretton, G., Schmitt, M., Luther, T., Kruger, A., Kotzsch, M., *et al.* (2012). Rab31 expression levels modulate tumor-relevant characteristics of breast cancer cells. *Mol Cancer* 11, 62.

- Hanahan, D., und Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., und Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harbeck, N., Kates, R.E., Schmitt, M., Gauger, K., Kiechle, M., Janicke, F., Thomassen, C., Look, M.P., und Foekens, J.A. (2004). Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer. *Clin Breast Cancer* 5, 348-352.
- Harbeck, N., Schmitt, M., Meisner, C., Friedel, C., Untch, M., Schmidt, M., Sweep, C.G., Lisboa, B.W., Lux, M.P., Beck, T., *et al.* (2013). Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur J Cancer* 49, 1825-1835.
- Hoek, K.S., Eichhoff, O.M., Schlegel, N.C., Dobbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., und Dummer, R. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* 68, 650-656.
- Hostetter, C., Licata, L.A., Witkiewicz, A., Costantino, C.L., Yeo, C.J., Brody, J.R., und Keen, J.C. (2008). Cytoplasmic accumulation of the RNA binding protein HuR is central to tamoxifen resistance in estrogen receptor positive breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 7, 1496-1506.
- Hwang, K.A., Park, S.H., Yi, B.R., und Choi, K.C. (2011). Gene alterations of ovarian cancer cells expressing estrogen receptors by estrogen and bisphenol a using microarray analysis. *Lab Anim Res* 27, 99-107.
- Jin, C., Rajabi, H., Pitroda, S., Li, A., Kharbanda, A., Weichselbaum, R., und Kufe, D. (2012). Cooperative interaction between the MUC1-C oncoprotein and the Rab31 GTPase in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *PLoS One* 7, e39432.
- Kajiho, H., Sakurai, K., Minoda, T., Yoshikawa, M., Nakagawa, S., Fukushima, S., Kontani, K., und Katada, T. (2011). Characterization of RIN3 as a guanine nucleotide exchange factor for the Rab5 subfamily GTPase Rab31. *J Biol Chem* 286, 24364-24373.
- Karlson, P. (2005). *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, Thieme, 15. Auflage

- Kim, M.J., Choi, J.R., Tae, N., Wi, T.M., Kim, K.M., Kim, D.H., und Lee, E.S. (2020). Novel Antibodies Targeting MUC1-C Showed Anti-Metastasis and Growth-Inhibitory Effects on Human Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 21.
- Kobayashi, H., Ohno, S., Sasaki, Y., und Matsuura, M. (2013). Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review). *Oncol Rep* 30, 1019-1029.
- Kollias, J., Elston, C.W., Ellis, I.O., Robertson, J.F., und Blamey, R.W. (1997). Early-onset breast cancer--histopathological and prognostic considerations. *Br J Cancer* 75, 1318-1323.
- Kotzsch, M., Farthmann, J., Meye, A., Fuessel, S., Baretton, G., Tjan-Heijnen, V.C., Schmitt, M., Luther, T., Sweep, F.C., Magdolen, V., *et al.* (2005). Prognostic relevance of uPAR-del4/5 and TIMP-3 mRNA expression levels in breast cancer. *Eur J Cancer* 41, 2760-2768.
- Kotzsch M, Goettig P, Soelch S, Magdolen V (2016). RAB31 (Ras-related protein in brain 31). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2016;20:481–90.
- Kotzsch, M., Kirchner, T., Soelch, S., Schafer, S., Friedrich, K., Baretton, G., Magdolen, V., und Luther, T. (2017). Inverse association of rab31 and mucin-1 (CA15-3) antigen levels in estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer tissues with clinicopathological parameters and patients' prognosis. *Am J Cancer Res* 7, 1959-1970.
- Kotzsch, M., Sieuwerts, A.M., Grosser, M., Meye, A., Fuessel, S., Meijer-van Gelder, M.E., Smid, M., Schmitt, M., Baretton, G., Luther, T., *et al.* (2008). Urokinase receptor splice variant uPAR-del4/5-associated gene expression in breast cancer: identification of rab31 as an independent prognostic factor. *Breast Cancer Res Treat* 111, 229-240.
- Liotta, L.A., und Kohn, E.C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411, 375-379.
- Liu, S., und Storrie, B. (2012). Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? *Cell Mol Life Sci* 69, 4093-4106.
- Lodhi, I.J., Chiang, S.H., Chang, L., Vollenweider, D., Watson, R.T., Inoue, M., Pessin, J.E., und Saltiel, A.R. (2007). Gapex-5, a Rab31 guanine nucleotide exchange factor that regulates Glut4 trafficking in adipocytes. *Cell Metab* 5, 59-72.
- Lodish, H. (1996). *Molekulare Zellbiologie*.
- Lottspeich, F. (1998). *Bioanalytik* (Spektrum Akademischer Verlag).

- Luther, T., Kotzsch, M., Meye, A., Langerholc, T., Fussel, S., Olbricht, N., Albrecht, S., Ockert, D., Muehlenweg, B., Friedrich, K., *et al.* (2003). Identification of a novel urokinase receptor splice variant and its prognostic relevance in breast cancer. *Thromb Haemost* 89, 705-717.
- Maeda, T., Hiraki, M., Jin, C., Rajabi, H., Tagde, A., Alam, M., Bouillez, A., Hu, X., Suzuki, Y., Miyo, M., *et al.* (2018). MUC1-C Induces PD-L1 and Immune Evasion in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res* 78, 205-215.
- Magdolen, V., Rettenberger, P., Lopens, A., Oi, H., Lottspeich, F., Kellermann, J., Creutzburg, S., Goretzki, L., Weidle, U.H., Wilhelm, O., *et al.* (1995). Expression of the human urokinase-type plasminogen activator receptor in *E. coli* and Chinese hamster ovary cells: purification of the recombinant proteins and generation of polyclonal antibodies in chicken. *Electrophoresis* 16, 813-816.
- Millarte, V., und Farhan, H. (2012). The Golgi in cell migration: regulation by signal transduction and its implications for cancer cell metastasis. *ScientificWorldJournal* 2012, 498278.
- Munro, S. (2011). What is the Golgi apparatus, and why are we asking? *BMC Biol* 9, 63.
- Ng, E.L., Ng, J.J., Liang, F., und Tang, B.L. (2009). Rab22B is expressed in the CNS astroglia lineage and plays a role in epidermal growth factor receptor trafficking in A431 cells. *J Cell Physiol* 221, 716-728.
- Ng, E.L., Wang, Y., und Tang, B.L. (2007). Rab22B's role in trans-Golgi network membrane dynamics. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 751-757.
- Ovarian Cancer Association Consortium, B.C.A.C., Consortium of Modifiers of, B., Brca, Hollestelle, A., van der Baan, F.H., Berchuck, A., Johnatty, S.E., Aben, K.K., Agnarsson, B.A., Aittomaki, K., *et al.* (2016). No clinical utility of KRAS variant rs61764370 for ovarian or breast cancer. *Gynecol Oncol* 141, 386-401.
- Pan, Y., Zhang, Y., Chen, L., Liu, Y., Feng, Y., und Yan, J. (2015). The Critical Role of Rab31 in Cell Proliferation and Apoptosis in Cancer Progression. *Mol Neurobiol*.
- Panchamoorthy, G., Jin, C., Raina, D., Bharti, A., Yamamoto, M., Adeebge, D., Zhao, Q., Bronson, R., Jiang, S., Li, L., *et al.* (2018). Targeting the human MUC1-C oncoprotein with an antibody-drug conjugate. *JCI Insight* 3.

- Pfeffer, S.R. (2010a). How the Golgi works: a cisternal progenitor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 19614-19618.
- Pfeffer, S.R. (2010b). Recent advances in understanding Golgi biogenesis. *F1000 Biol Rep* *2*, 32.
- Rebane, A., Zimmermann, M., Aab, A., Baurecht, H., Koreck, A., Karelson, M., Abram, K., Metsalu, T., Pihlap, M., Meyer, N., *et al.* (2012). Mechanisms of IFN-gamma-induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* *129*, 1297-1306.
- Recchi, C., und Seabra, M.C. (2012). Novel functions for Rab GTPases in multiple aspects of tumour progression. *Biochem Soc Trans* *40*, 1398-1403.
- Rimawi, M.F., Shetty, P.B., Weiss, H.L., Schiff, R., Osborne, C.K., Chamness, G.C., und Elledge, R.M. (2010). Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. *Cancer* *116*, 1234-1242.
- Rodriguez-Gabin, A.G., Yin, X., Si, Q., und Larocca, J.N. (2009). Transport of mannose-6-phosphate receptors from the trans-Golgi network to endosomes requires Rab31. *Exp Cell Res* *315*, 2215-2230.
- Seiz, L., Kotsch, M., Grebenchtchikov, N.I., Geurts-Moespot, A.J., Fuessel, S., Goettig, P., Gkazepis, A., Wirth, M.P., Schmitt, M., Lossnitzer, A., *et al.* (2010). Polyclonal antibodies against kallikrein-related peptidase 4 (KLK4): immunohistochemical assessment of KLK4 expression in healthy tissues and prostate cancer. *Biol Chem* *391*, 391-401.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 513-525.
- Soelch, S., Beaufort, N., Loessner, D., Kotsch, M., Reuning, U., Luther, T., Kirchner, T., und Magdolen, V. (2021). Rab31-dependent regulation of transforming growth factor ss expression in breast cancer cells. *Mol Med* *27*, 158.
- Suarez-Farinas, M., Fuentes-Duculan, J., Lowes, M.A., und Krueger, J.G. (2011). Resolved psoriasis lesions retain expression of a subset of disease-related genes. *J Invest Dermatol* *131*, 391-400.
- Subramani, D., und Alahari, S.K. (2010). Integrin-mediated function of Rab GTPases in cancer progression. *Mol Cancer* *9*, 312.

- Sui, Y., Zheng, X., und Zhao, D. (2015). Rab31 promoted hepatocellular carcinoma (HCC) progression via inhibition of cell apoptosis induced by PI3K/AKT/Bcl-2/BAX pathway. *Tumour Biol* 36, 8661-8670.
- Tang, C.T., Liang, Q., Yang, L., Lin, X.L., Wu, S., Chen, Y., Zhang, X.T., Gao, Y.J., und Ge, Z.Z. (2018). RAB31 Targeted by MiR-30c-2-3p Regulates the GLI1 Signaling Pathway, Affecting Gastric Cancer Cell Proliferation and Apoptosis. *Front Oncol* 8, 554.
- Wang, J., Guo, Y., Chu, H., Guan, Y., Bi, J., und Wang, B. (2013). Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis. *Int J Mol Sci* 14, 10015-10041.
- Weigelt, B., Geyer, F.C., und Reis-Filho, J.S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol* 4, 192-208.
- Zerial, M., und McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 107-117

Vorveröffentlichungen

Teile der in dieser Dissertation vorgelegten Ergebnisse wurden bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

Grismayer, B., Solch, S., Seubert, B., Kirchner, T., Schafer, S., Baretton, G., Schmitt, M., Luther, T., Kruger, A., Kotsch, M., *et al.* (2012). Rab31 expression levels modulate tumor-relevant characteristics of breast cancer cells. *Mol Cancer* 11, 62.

Kotsch, M., Kirchner, T., Soelch, S., Schafer, S., Friedrich, K., Baretton, G., Magdolen, V., und Luther, T. (2017). Inverse association of rab31 and mucin-1 (CA15-3) antigen levels in estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer tissues with clinicopathological parameters and patients' prognosis. *Am J Cancer Res* 7, 1959-1970.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Viktor Magdolen. Ich danke ihm für seine hervorragende Betreuung der Arbeit, die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu forschen, sein Engagement bei der Präsentation der Daten und deren Publikation sowie seine unermüdliche Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen, Lösungsansätzen und seine konstruktive Kritik.

Allen Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe für experimentelle Gynäkologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft. Besonderer Dank gilt Frau Sabine Creutzburg für die wertvollen Erklärungen und Hilfestellungen in technischen Fragen.

Ich danke Bettina Grismayer für die Weiterführung des Forschungsprojektes, ihr großes Engagement für die Publikation der Daten und für die wertvollen fachlichen Diskussionen.

Mathias Kotzsch danke ich für die Kollaboration bei der Charakterisierung der Antikörper, sein professionelles Lektorat und die fachlichen Hinweise.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten, sowie meiner Familie und meinen Freunden, die meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachten.