

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

DISSERTATION

Die Rolle des RALA-Signalweges bei der  
epithelial-mesenchymalen Transition von Tumorzellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Manuel Sigler

aus Nürtingen

Datum der Promotion: 05.06.2016

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Abstract .....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Mechanismen der Krebsentstehung .....	5
1.2 RAS-Signalsystem.....	6
1.3 Der RAL-GEF/RAL-Signalweg.....	8
1.4 Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT).....	10
1.5 Das ROSE-Zellsystem.....	12
1.6 Das Kolon-Zellsystem.....	14
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden .....	16
2.1 Zellkulturmethoden .....	16
2.1.1 Zelllinien .....	16
2.1.2 Kultivierung der Zellen .....	16
2.1.3 Auftauen der Zellen .....	16
2.1.4 Einfrieren der Zellen .....	17
2.1.5 Transienter Knockdown mittels siRNA-Interferenz .....	17
2.1.6 Hemmung des MAPK- und PI3K-Signalweges mit Inhibitoren .....	18
2.1.7 Proliferationsmessung nach FCS-Reduktion im Medium.....	18
2.1.8 Wundheilungs-Assay .....	19
2.1.9 Zellzyklusanalysen.....	20
2.1.10 Kombinierte Hemmung mehrerer Signalwege .....	21
2.2 Molekularbiologische Methoden .....	21
2.2.1 RNA-Isolation .....	21
2.2.2 cDNA-Synthese .....	22
2.2.3 Quantitative Real-Time PCR .....	22
2.2.4 Isolierung von Gesamtproteinen.....	23
2.2.5 Konzentrationsbestimmung der Proteine.....	24
2.2.6 RALA-Aktivitäts-Test.....	24
2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.2.8 Western Blot.....	26
2.3 Laborgeräte und Materialien.....	26
2.4 Kommerzielle Kits.....	27
2.5 Stammlösungen.....	28
2.6 Sonstige Chemikalien.....	30
2.7 DNA-Oligonukleotide für die siRNA-Herstellung.....	30
2.8 Kommerziell erworbene Kontroll-siRNA.....	31
2.9 PCR-Primer .....	31

2.10 TaqMan-Sonden .....	32
2.11 Computer-Programme .....	32
3 Ergebnisse.....	33
3.1 ROSE-Zellsystem .....	33
3.1.1 RALA-Aktivität in RAS-ROSE Zellen .....	33
3.1.2 Transienter RALA-Knockdown mittels RNA-Interferenz .....	34
3.1.3 Regulation der KRAS-abhängigen EMT-Faktoren Slug, Snail und Twist im ROSE Zellsystem.....	35
3.1.4 Einfluss der MAPK- und PI3K-Signalwege auf die RALA-Expression .....	37
3.1.5 Rolle von Slug, Snail und Twist an der Transformation der RAS-ROSE Zellen.....	38
3.1.6 Einfluss des MAPK-, PI3K- und RALA-Signalweges auf die Morphologie der RAS-ROSE Zellen.....	41
3.1.7 Einfluss von Slug, Snail, Twist und RALA auf die Migration .....	42
3.1.8 Einfluss kombinierter Signalweg-Hemmung auf die Migration.....	43
3.1.9 Zellzyklusanalysen.....	46
3.1.10 E-Cadherin-Expression nach Knockdown und Signalweg-Hemmung .....	49
3.2 Kolon-Zellsystem .....	51
3.2.1 Proliferationsmessungen zur Bestimmung der optimalen FCS-Konzentration .....	51
3.2.2 Migrationsgeschwindigkeiten der untersuchten Zelllinien .....	52
3.2.3 Einfluss von RALA auf die Migration.....	53
4 Diskussion .....	55
4.1 RALA aktiviert Slug, Snail und Twist in RAS-ROSE Zellen .....	55
4.2 Kombinierte Signalweg-Ausschaltung führt zum effektiven Migrationsstopp in RAS-ROSE Zellen .....	57
4.3 RALA trägt nicht zur Migration von kolorektalen Tumorzellen bei .....	59
4.4 Schlussfolgerung .....	59
5 Ausblick .....	60
5.1 Die Isoformen RALA und RALB im organspezifischen Kontext.....	60
5.2 Therapeutische Möglichkeiten zur Blockade der RAL-Signalkaskade.....	61
6 Abkürzungsverzeichnis.....	64
7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	67
8 Literaturverzeichnis .....	69
Eidesstattliche Versicherung .....	79
Lebenslauf.....	81
Publikationsliste.....	82
Danksagung .....	83

# Zusammenfassung

## Einleitung

Mutierte RAS-Proteine führen zur konstitutiven Aktivierung nachgeschalteter Signalketten und können somit zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) von Tumorzellen beitragen. Dieser Prozess gilt für viele Tumoren als Voraussetzung zur Metastasierung. RAS-Transformation führt in Ovarialepithelzellen (RAS-ROSE) zur Hochregulation der Transkriptionsfaktoren Slug, Snail und Twist, welche für die EMT-Induktion verantwortlich sind. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Signalwege an der Regulation dieser Faktoren beteiligt sind und ob deren Ausschaltung zur Reversion des Phänotyps führt. Insbesondere wurde dabei auf die Rolle des noch wenig erforschten RALA-Signalweges eingegangen.

In den humanen kolorektalen Karzinomzelllinien HCT 116, SW 480 und HT 29 konnte in einer vorausgegangenen Studie RALA-Aktivität nachgewiesen werden. Diese Zellen zeichnen sich durch einen unterschiedlichen KRAS- und BRAF-Mutationsstatus aus. In dieser Arbeit wurden die Migrationseigenschaften der Zellen verglichen und untersucht, ob der RALA-Signalweg an der Migration beteiligt ist.

## Methodik

Slug, Snail, Twist und RALA wurden mittels RNA-Interferenz transient ausgeschaltet. Die Unterbrechung des MAPK- bzw. PI3K-Signalweges geschah mit spezifischen Inhibitoren. Mithilfe des RALA-Pulldown-Assays und anschließendem Western Blot konnte der Aktivierungsgrad von RALA bestimmt werden. Die Regulation von RALA und der EMT-Faktoren wurde auf mRNA-Ebene in der qPCR erfasst. Als Komponenten der EMT wurden die Morphologie der Zellen, Veränderungen im E-Cadherin-Spiegel und die Migrationseigenschaften untersucht. Die Analyse der Migration erfolgte mit in vitro Wundheilungs-Assays.

## Ergebnisse

In RAS-ROSE Zellen ist der RALA-Signalweg aktiv und führt zur Expression der EMT-Transkriptionsfaktoren Slug, Snail und Twist. Der MAPK-Signalweg beeinflusst dabei die Aufrechterhaltung der RALA-Aktivität. Ein transienter Knockdown von Slug, Snail, Twist oder RALA bewirkte keine Veränderung der Zellmorphologie oder der Migration. Die bereits bekannte Migrationshemmung nach MAPK-Inhibition wurde in dieser Arbeit

bestätigt. Eine kombinierte Ausschaltung des MAPK- sowie des PI3K-Signalweges konnte die Migration nochmals signifikant verlangsamen. Interessanterweise zeigte sich bei keiner der untersuchten Inhibitor-Kombinationen eine Reversion des E-Cadherin-Spiegels in RAS-ROSE Zellen.

In den kolorektalen Zelllinien HCT 116, SW 480 und HT 29 hatte RALA-Knockdown ebenfalls keinen Einfluss auf die Migration der Zellen.

### Schlussfolgerung

In RAS-ROSE Zellen hemmt die kombinierte Ausschaltung des MAPK- und des PI3K-Signalweges die Zellmigration besonders effektiv. Die robuste Suppression von E-Cadherin auch nach Hemmung mehrerer Signalwege lässt auf die Beteiligung weiterer RAS-abhängiger Signalwege schließen.

Der RALA-Signalweg ist in beiden untersuchten Zellsystemen nicht für die Migration verantwortlich. Möglicherweise spielt die Isoform RALB hier eine bedeutendere Rolle als angenommen.

## **Abstract**

### Introduction

Mutated RAS proteins constitutively activate downstream signaling pathways and can contribute to the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of tumor cells. For many tumors, the EMT is a necessary step for metastasis. RAS-mediated transformation of ovarian epithelial cells (RAS-ROSE) leads to upregulation of the transcription factors Slug, Snail, and Twist, which are responsible for the induction of EMT.

The primary objective of this study was to investigate which signaling pathways are involved in the regulation of these factors and to evaluate whether knockdown of each transcription factor could reverse the cellular phenotype. The main focus was set on the RALA signaling pathway, as its role during the EMT process is still poorly understood.

A previous study was able to show RALA activity in the human colorectal cancer cell lines HCT 116, SW 480, and HT 29. These cells harbor different KRAS or BRAF mutations. This study compared the migration characteristics of the cells and investigated whether RALA signaling is involved.

### Methods

Slug, Snail, Twist, and RALA were transiently knocked down by RNA interference. MAPK and PI3K signaling pathways were blocked by specific inhibitors. RALA activity was assessed by a RALA pulldown assay followed by Western blot analysis. The regulation of RALA and EMT factors was evaluated at the mRNA level by qPCR. The cell morphology, E-Cadherin levels, and migration status were analyzed as components of EMT. Migration was studied by in vitro scratch assays.

### Results

The RALA signaling pathway is active in RAS-ROSE cells and leads to expression of the EMT transcription factors Slug, Snail, and Twist. MAPK pathway contributes to the maintenance of RALA activity. Transient knockdown of Slug, Snail, Twist, or RALA did not influence cell morphology or migration. As previously reported, the inhibition of MAPK resulted in partial reversion of EMT and reduced migration. Furthermore this study was able to show that combined inhibition of both MAPK and PI3K led to a significantly slower migration rate. Interestingly, reversion of E-Cadherin levels in RAS-ROSE cells did not occur under any of the inhibitor combinations studied.

RALA knockdown had no influence on cell migration in the colorectal cancer cell lines HCT 116, SW 480, and HT 29.

### Conclusion

Combined inhibition of the MAPK and PI3K signaling pathways strongly reduces cell migration in RAS-ROSE cells. The robust suppression of E-Cadherin after inhibition of various signaling pathways suggests the involvement of other RAS-dependent pathways.

In both evaluated cell systems RALA knockdown did not influence migration. Perhaps the isoform RALB plays a more prominent role than has been assumed.

# 1 Einleitung

## 1.1 Mechanismen der Krebsentstehung

Die Entstehung einer malignen Tumorzelle aus einer gesunden Zelle kann durch zwei Modelle beschrieben werden. Das klonale Evolutionsmodell ist an Darwins Evolutionstheorie angelehnt. Es beschreibt, wie eine beliebige Zelle durch zufällige Veränderung ihres Erbguts zu einem selektiven Wachstums- und Überlebensvorteil gegenüber anderen Zellen ihrer Umgebung kommt (Greaves und Maley 2012). Durch weitere Akkumulation somatischer Mutationen in ihren Tochterzellen bildet sich dann über die Zeit ein heterogener Tumor mit hoher Malignität (Gupta et al. 2005). Das zweite Modell geht von der Existenz von Tumorstammzellen aus (Ciurea et al. 2014). Diese Zellen sollen die treibende Kraft hinter der Tumorentstehung sein und könnten Resistenzen bei Chemotherapien erklären (Scheel und Weinberg 2012). Beide Modelle schließen sich dabei nicht gegenseitig aus (Cabrera et al. 2015).

Hanahan und Weinberg haben sechs zellphysiologische Veränderungen definiert, die für fast alle Tumorarten charakteristisch sind (Hanahan und Weinberg 2000): Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Resistenz gegenüber Apoptosesignalen, Fähigkeit zur Invasivität und Metastasierung, dauerhafte Angiogenese und unbegrenztes Replikationspotenzial. Veränderungen im Energiemetabolismus und Immunevasion sind zwei weitere Charakteristika, die an der Pathogenese der Tumorentstehung beteiligt sind (Hanahan und Weinberg 2011).

Bei der Entstehung und Aufrechterhaltung dieser Tumoreigenschaften sind dieselben Signalwege involviert, die sonst lebenswichtige Prozesse in gesunden Zellen steuern. In Krebszellen sind diese Signaltransduktionskaskaden dauerhaft dereguliert (Colussi et al. 2013). Ein besseres Verständnis der Steuerung dieser Abläufe dient der Suche nach therapeutischen Angriffspunkten, um die Entstehung und Progression maligner Neoplasien gezielt verhindern zu können (Schäfer et al. 2007).



## 1.2 RAS-Signalsystem

Das Protoonkogen RAS („rat sarcoma“) gehört zur Familie der kleinen G-Proteine und spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion in Zellen (Karnoub und Weinberg 2008). Als zentraler molekularer Schalter kann RAS externe Signale mit der Expression zahlreicher Transkriptionsfaktoren koppeln (Zuber et al. 2000). Über nachgeschaltete Signalwege steuert RAS Wachstums- und Differenzierungsprozesse und sichert das Überleben der Zelle (Pylayeva-Gupta et al. 2011). In vielen humanen Tumoren sind Punktmutationen im RAS-Gen auffindbar, wodurch es zur Blockade der intrinsischen GTPase-Aktivität kommt (Prior et al. 2012). RAS ist somit konstitutiv aktiv, was zur Deregulation des genetischen Programms und zur malignen Entartung der Zelle führt (Schäfer und Sers 2011). Bisher sind die drei Isoformen KRAS, HRAS und NRAS bekannt (Castellano und Santos 2011). KRAS-Mutationen sind von den drei Isoformen die häufigsten und bei 22 % aller humanen Tumoren zu finden (Prior et al. 2012). Insbesondere bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms spielen diese Mutationen eine entscheidende Rolle (Prior et al. 2012).

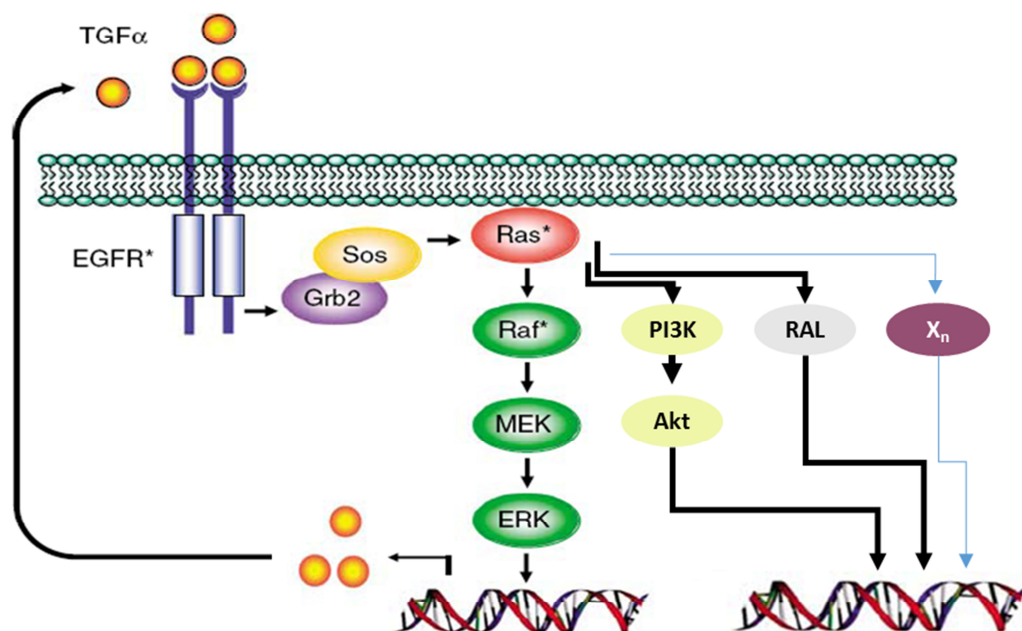
Eine zielgerichtete Therapie gegen aktivierte RAS-Proteine konnte bislang nicht erreicht werden (Cox et al. 2014). Die therapeutische Beeinflussung durch niedermolekulare Inhibitoren erweist sich als komplex, da RAS-Proteine eine sehr hohe GTP-Affinität besitzen und geeignete Bindungstaschen fehlen (Cox et al. 2014). Umso wichtiger ist es daher, das gesamte RAS-Signalsystem und seine Zielgene zu erforschen (Stephen et al. 2014).

Durch Überaktivität oder Überexpression von Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), wie z. B. dem Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR), kann es ebenfalls zur verstärkten Aktivierung von RAS und seinen nachgeschalteten Signalwegen kommen (Klinger et al. 2013). Tyrosinkinaseinhibitoren und Antikörper gegen diese Rezeptoren haben ihren Eingang in die Krebstherapie bereits gefunden (Drake et al. 2014). Zahlreiche weitere „small molecules“ zur spezifischen Ausschaltung von RAS-Effektoren sind in den letzten Jahren auf den Markt gekommen oder befinden sich in klinischen Studien (Györfy und Schäfer 2010).

Die onkogenen Effekte der RAS-Mutationen werden durch verschiedenste Effektoren vermittelt. Zahlreiche Zielgene von RAS konnten bereits identifiziert und funktionell

charakterisiert werden (Zuber et al. 2000). Eine möglichst umfangreiche Charakterisierung der Signalketten ist für die zielgerichtete Therapie unerlässlich, denn auch Mutationen in nachgeschalteten Signalwegen von RAS können zur onkogenen Aktivierung der Zelle führen (Stephen et al. 2014).

Die zwei durch RAS aktivierten Signaltransduktionskaskaden, die am besten untersucht worden sind, sind der MAP-Kinase- (MAPK) sowie der Phosphatidylinositol-3-Kinase- (PI3K) Signalweg (Pylayeva-Gupta et al. 2011), wohingegen der RAL-Signalweg noch wenig erforscht ist (Abb. 1).



### Abb. 1 RAS-Signalsystem

Dargestellt sind die MAPK-, PI3K- und RAL-Signalwege. EGFR: Epidermal growth factor receptor. Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2. Sos: Son of Sevenless. Raf: Rat fibrosarcoma. MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase. Erk: Extracellular-signal regulated kinase. PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase. Akt: Proteinkinase B. TGFα: Transforming growth factor alpha. X<sub>n</sub>: Schematisch für bislang unbekannte Signalwege. (Modifiziert nach Roberts und Der 2007)

Der MAPK-Signalweg trägt vor allem zur Proliferation, Angiogenese und Regulation der Apoptose bei (Reddy et al. 2003). Dabei kommt es über eine Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase RAF zur Phosphorylierung und Aktivierung weiterer Kinasen, die Phosphorylierungsvorgänge katalysieren und dadurch verschiedene

Transkriptionsfaktoren, wie die Mitglieder der AP-1-Familie Jun und Fos sowie Myc, aktivieren (Roberts und Der 2007). B-RAF ist dabei als häufigste der drei RAF-Isoformen in mutiertem Zustand aufzufinden, darunter beim kolorektalen Karzinom sowie beim malignen Melanom (Davies et al. 2002).

Die Effekte des aktivierten PI3K-Signalweges werden u. a. durch Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt vermittelt. Hierbei kommt es zur Unterbindung der Apoptose, was die Tumorentstehung unterstützt (Castellano und Downward 2010; Madrid et al. 2000).

### **1.3 Der RAL-GEF/RAL-Signalweg**

Der RAL-GEF/RAL-Signalweg ist ein noch recht wenig erforschter Signalweg, der durch RAS aktiviert werden kann (Chardin und Tavitian 1986; Feig 2003). Die membranständigen kleinen G-Proteine RALA und RALB verdanken ihren Namen der Ähnlichkeit mit RAS (RAS-like) und sind im GTP-gebundenen Zustand aktiv. Sie interagieren über verschiedene Effektoren und können somit zahlreiche zelluläre Prozesse steuern (Ferro und Trabalzini 2010). So scheinen RALA und RALB an wichtigen Schritten der Embryonalentwicklung, wie dem Schluss des Neuralrohres, beteiligt zu sein (Peschard et al. 2012). Die Aktivierung der RAL-Proteine geschieht über sog. „RAL guanine nucleotide exchange factors“ (RAL-GEFs), welche den Austausch von GDP zu GTP katalysieren (Neel et al. 2011). Als Gegenspieler wirken sog. „GTPase-activating proteins“ (RAL-GAPs), die eine Hydrolyse von GTP zu GDP bewirken und die RAL-Proteine dadurch inaktivieren (Vigil et al. 2010).

Die beiden Isoformen RALA und RALB sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 82 % identisch, haben jedoch teils unterschiedliche Funktionen (Martin und Der 2012). RALA sowie RALB interagieren zwar zum Großteil mit den gleichen Effektoren, sind allerdings subzellulär unterschiedlich lokalisiert. Die Lokalisation beider Proteine unterliegt einem dynamischen Prozess, der u. a. durch Phosphorylierung beeinflusst werden kann (Neel et al. 2011). Unklar ist, ob die verschiedenen Funktionen von RALA und RALB auf deren unterschiedlicher Lokalisation beruhen oder ob dies über selektive Effektoren geschieht, welche bisher noch unentdeckt sind (Gentry et al. 2014).

Zu den bisher am besten charakterisierten Effektoren von RALA und RALB gehören RALBP1, sowie die Sec5- und Exo84- Untereinheiten des oktameren Exozystkomplexes (Issaq et al. 2010). Dieser Komplex ist am Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran beteiligt (He und Guo 2009). RALBP1 ist an der Endozytose, bei der Zellmigration, der Mitochondrienteilung sowie beim Transport von Metaboliten involviert. Außerdem dient RALBP1 als Schnittstelle zwischen RAL und RHO, einer weiteren für die Signaltransduktion wichtigen GTPase (Mott und Owen 2014).

In zahlreichen gain-of-function- sowie loss-of-function-Studien konnte dem RAL-Signalweg eine bedeutende Rolle bei der onkogenen Transformation zugeschrieben werden (Cooper et al. 2013). Während RALB einen Einfluss auf das Überleben der Tumorzellen zu haben scheint, wird RALA eine entscheidende Rolle für ankerunabhängiges Wachstum zugeschrieben (Chien und White 2003). Die wichtige Bedeutung von RALA für die ankerunabhängige Proliferation konnte u. a. an humanen Zelllinien von Pankreas-, kolorektalen- und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen nachgewiesen werden (Guin et al. 2013; Lim et al. 2006; Martin et al. 2011). Auch das Tumorwachstum in Mäusen konnte nach RALA-Knockdown für Pankreas-, Prostata- und Ovarialkarzinome sowie für Melanome reduziert werden (Lim et al. 2006; Wang et al. 2013; Wu et al. 2010; Zipfel et al. 2010). Promigratorische Effekte durch gesteigerte RALA-Aktivität konnten bisher in Prostata-, Pankreas- und Ovarialtumoren nachgewiesen werden (Wang et al. 2013; Wu et al. 2010; Yin et al. 2007). In einem Mausmodell mit RAS-transformierten Prostatakarzinomzellen konnten Yin et al. den RALA-Signalweg für die organspezifische Metastasierung in Knochen verantwortlich machen (Yin et al. 2007).

Patientendaten belegen die klinisch wichtige Rolle von RALA. Eine hohe RALA-Expression in kolorektalen Tumoren korreliert invers mit rezidivfreiem Überleben (Győrffy et al. 2015). Auch bei Patienten mit Blasen- oder Prostatakarzinomen führt eine erhöhte RALA-Expression zu vermehrter Invasivität und Progression der Tumoren (Smith et al. 2012). Darüber hinaus wurde eine wesentliche Rolle von RALA als auch von RALB bei der Zellantwort auf Bestrahlung beschrieben. Beide Proteine tragen zur Strahlenresistenz von Tumoren bei (Kidd, III et al. 2010).

## 1.4 Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Meist sind Fernmetastasen und nicht der Primärtumor an sich für die hohe Sterblichkeit von Tumorleiden verantwortlich (Ramaswamy et al. 2003). Von der Erforschung molekularer Mechanismen der Metastasierungsprozesse erhofft man sich daher neue Therapieoptionen, um die Prognose der Patienten zu verbessern. Die hämatogene Metastasierung eines Tumors ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem sich Tumorzellen aus ihrem Zellverband lösen und in die Blutzirkulation eintreten. Überlebende Zellen können dann in anderen Organen aus den Gefäßen austreten und Metastasen bilden (Chambers et al. 2002; Talbot et al. 2012).

Für viele epitheliale Tumoren ist die Fähigkeit zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) eine wichtige Voraussetzung zur Metastasierung (Hay 1995). Bei diesem Prozess, der auch während der Embryogenese oder der Wundheilung stattfindet, verlieren Epithelzellen ihre Polarität und nehmen mesenchymale Charakteristika an (Kalluri und Weinberg 2009). Die Zellen zeigen dabei eine deutliche Abnahme der Zelladhäsion, eine gesteigerte Zellmobilität sowie deutliche Umbauprozesse im Zytoskelett (Nieto 2011).

Zahlreiche Signalkaskaden sind für die Einleitung der EMT verantwortlich. Bisher konnten u. a. der TGF- $\beta$ - („transforming growth factor beta“), NF- $\kappa$ B- („nuclear factor kappa B“), Wnt- („wingless-related integration site“), Notch-, Hedgehog-, MAPK- sowie der PI3K-Signalweg für die EMT-Induktion identifiziert werden (Roberts et al. 2006; Talbot et al. 2012). Der Einfluss des RALA-Signalweges auf die EMT ist bisher noch nicht ausreichend untersucht.

Die EMT kann durch Prozesse in der Mikroumgebung, wie z. B. Hypoxie oder Inflammation, ausgelöst werden (Polyak und Weinberg 2009; Yao et al. 2011). Auch chemisch-physikalische Noxen, wie z. B. Nikotin oder UV-Strahlung, können eine EMT bewirken (Dasgupta et al. 2009; Li et al. 2010).

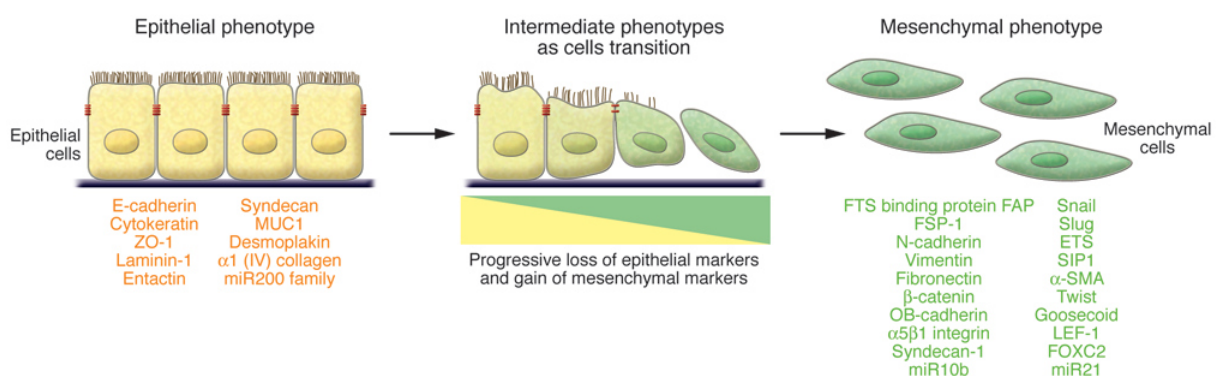
All diese Signale münden in einer Änderung des transkriptionellen Programms, welches die EMT auf komplexe Weise steuert und aufrechterhält (de Craene und Berx 2013). Der Verlust des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin scheint dabei ein wichtiges Schlüsselereignis zu sein (Acloque et al. 2008). E-Cadherin verhindert die Invasion und Metastasierung epithelialer Tumoren und gilt demzufolge als Tumorsuppressor (Kang

und Massague 2004). Eine verminderte E-Cadherin-Expression steht daher oft für ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit schlechteren Überlebenschancen (Hirohashi 1998).

Als wichtige Repressoren von E-Cadherin sind die Transkriptionsfaktoren Snail1 (Snail), Snail2 (Slug) und Twist1 (Twist) bekannt (Kurrey et al. 2005; Thiery et al. 2009). Snail und Slug gehören zur Familie der Zinkfingerproteine und hemmen die E-Cadherin-Expression durch Bindung an den Promotor des E-Cadherin-Gens (Peinado et al. 2007; Wang et al. 2007). Twist ist ein Helix-Loop-Helix-Protein, welches die Transkription des E-Cadherin-Moleküls indirekt unterdrückt (Yang et al. 2004; Yang und Weinberg 2008).

In vielen Tumoren kann eine vermehrte Expression von Slug, Snail und Twist nachgewiesen werden (Garg 2013). Dabei gilt die Überexpression dieser EMT-Faktoren oft als Hinweis auf eine schlechte Prognose (Peinado et al. 2007; Polyak und Weinberg 2009). In klinischen Studien wurden insbesondere Resistenzen für Radio-, Chemo- und Immuntherapien beobachtet (Nieto 2011). Auch für die gezielte Krebstherapie sind Resistenzen aufgezeigt worden (Yao et al. 2011). In die Entwicklung von Wirkstoffen, welche die Expression der EMT-Transkriptionsfaktoren vermindern könnten, werden daher große Hoffnungen gesetzt (Kaufhold und Bonavida 2014).

Slug, Snail und Twist sowie viele andere der am EMT-Prozess beteiligten Faktoren werden in der molekularbiologischen Forschung als Marker eingesetzt (Kalluri und Weinberg 2009). Die Veränderung ihrer Expression zeigt die Durchwanderung des EMT-Prozesses an (Abb. 2).



### Abb. 2 Übersicht über häufig verwendete EMT-Marker

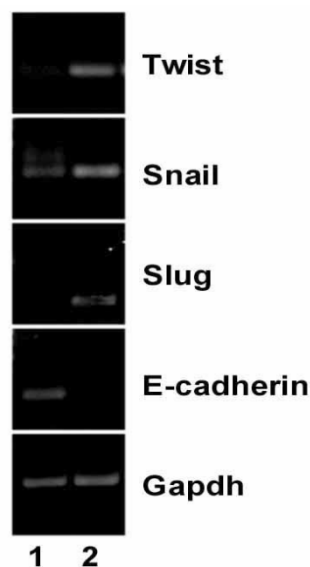
Während der EMT verlieren epitheliale Zellen (linke Bildseite) charakteristische Marker und nehmen mesenchymale Eigenschaften an (rechte Bildseite). (Abbildung aus: Kalluri und Weinberg 2009)

Der zur EMT inverse Prozess nennt sich mesenchymal-epitheliale Transition (MET) und wird als möglicher zentraler Prozess bei der Ansiedlung von Tumorzellen in der Peripherie diskutiert (Gunasinghe et al. 2012; Lee et al. 2006). Die MET tritt wie die EMT physiologisch während der Embryonalentwicklung auf und sorgt für die Reversion mesenchymaler Zellen zu ihrem ursprünglichen epithelialen Phänotyp (Nieto 2011). Dieser Plastizitätsmechanismus könnte die Tatsache erklären, dass histopathologische sowie molekularbiologische Untersuchungen von Fernmetastasen oft eine Übereinstimmung des epithelialen Phänotyps mit der Primärläsion zeigen (Yao et al. 2011). Nach stattgefundener EMT und erfolgter Zirkulation im Blutkreislauf soll die Tumorzelle durch die MET wieder Züge ihres ursprünglichen epithelialen Phänotyps annehmen, was ihre Ansiedlung im peripheren Gewebe erst ermöglicht (Polyak und Weinberg 2009). Die im jeweiligen Organ herrschende Mikroumgebung wird für diesen Transformationsprozess verantwortlich gemacht (Talbot et al. 2012). Das Fernbleiben von EMT-Signalen soll die Rückbildung zum ursprünglichen Zelltyp induzieren (Yao et al. 2011). Die Reexpression von E-Cadherin gilt in Analogie zur EMT als wesentlicher Baustein für die Einleitung des MET-Vorgangs (Yao et al. 2011).

## **1.5 Das ROSE-Zellsystem**

Zur Untersuchung RAS-abhängiger Signalkaskaden wurde in dieser Arbeit ein KRAS-getriebenes Ovarialepithelmodell verwendet. Es besteht aus immortalisierten, phänotypisch normalen ROSE 199 („rat ovarian surface epithelium“) Zellen (Adams und Auersperg 1985) sowie deren KRAS-transformierten Derivaten ROSE A2/5 (Tchernitsa et al. 2004). Zur Vereinfachung werden die ROSE A2/5 Zellen im Folgenden auch als RAS-ROSE bezeichnet. Phänotypische und transkriptionelle Änderungen zwischen normalen und transformierten Zellen lassen sich somit auf das kontinuierlich aktive KRAS-Onkogen zurückführen. Die RAS-ROSE Zellen unterscheiden sich von nicht transformierten ROSE 199 Zellen unter anderem durch extensive Veränderungen des Transkriptoms in direkter Abhängigkeit von RAS-aktivierten Signalkaskaden und ihren Zielgenen. Morphologisch äußert sich dies in ankerunabhängigem Wachstum und in phänotypischen Änderungen (Tchernitsa et al. 2004). Während ROSE 199 Zellen eine epithel-ähnliche Gestalt aufweisen, zeigen die transformierten RAS-ROSE Zellen eine spindelförmige mesenchymale Morphologie (Tchernitsa et al. 2004).

Genexpressionsprofilstudien haben gezeigt, dass das genetische Programm in Ovarialkarzinomzellen durch Deregulation zahlreicher Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet ist. Zwischen diesen Faktoren und der Aktivierung von Signalketten besteht offenbar ein enger funktioneller Zusammenhang (Malek et al. 2008; Tchernitsa et al. 2004). Aufgrund der allgemeinen Kenntnisse über die funktionelle Rolle der beteiligten Transkriptionsfaktoren ist davon auszugehen, dass diese in einem komplexen Netzwerk wirken und somit auf robuste Weise das Proliferations- und Überlebenspotenzial der Tumorzellen sicherstellen (Stelnic-Klotz et al. 2012). Die KRAS-abhängige Überexpression der EMT-Faktoren Slug, Snail und Twist im ROSE-Zellmodell wurde in Vorexperimenten der Arbeitsgruppe Molekulare Tumorpathologie (Prof. Schäfer) bereits gezeigt. Ebenso konnte hier eine Abnahme des E-Cadherin-Spiegels nachgewiesen werden (Abb. 3). Untersuchungen an epithelialen Tumoren des Ovars belegen ebenfalls eine höhere Proteinexpression von Slug, Snail und Twist in Karzinomen, verglichen mit gutartigen Tumoren (Yoshida et al. 2009).



**Abb. 3 Expression der EMT-Marker im ROSE-Zellsystem**

RT-PCR: Nachweis der mRNA-Expression durch RT-PCR mit Gesamt-RNA aus ROSE 199 und RAS-ROSE Zellen nach Auftrennung der Proben im 1-1,5 %igen Agarosegel. Endogene Kontrolle Gapdh.

1) ROSE 199: Expression des epithelialen Markers E-Cadherin.

2) RAS-ROSE: Überexpression der E-Cadherin-Repressoren Slug, Snail und Twist. Kein Nachweis von E-Cadherin.

(Abbildung aus: Dissertation Stelnic, HU Berlin 2010)



## 1.6 Das Kolon-Zellsystem

Die Rolle des RALA-Signalweges wurde in einem weiteren System, bestehend aus drei humanen kolorektalen Tumorzelllinien, untersucht. Diese Zellen zeichnen sich u. a. durch einen unterschiedlichen KRAS- sowie BRAF-Mutationsstatus aus (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Kolorektale Karzinomzelllinien und ihr Mutationsstatus**

<u>Zelllinie</u>	<u>Mutationsstatus</u>	<u>Quellen</u>
SW 480	KRAS Mutation GGT→GTT in Codon 12	(Brink et al. 2003)
HCT 116	KRAS Mutation GGC→GAC in Codon 13	(Brink et al. 2003)
HT 29	BRAF V600E Mutation	(Benlloch et al. 2006)

In allen drei Zelllinien ist der RALA-Signalweg aktiv (Győrffy et al. 2015). Bisher konnte gezeigt werden, dass durch RALA-Knockdown die ankerabhängige und die ankerunabhängige Proliferation der SW 480 und HCT 116 Zellen gestoppt werden kann (Győrffy et al. 2015). Für die HT 29 Zellen konnte dabei kein Effekt beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Migrationseigenschaften der Zellen miteinander verglichen und untersucht, ob der RALA-Signalweg an der Migration der Zellen beteiligt ist.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, ein besseres Verständnis über den RALA-Signalweg und seine Beteiligung an der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) von Tumorzellen zu erlangen. Dazu wurden in Zellkulturexperimenten transiente siRNA-vermittelte Knockdowns von RALA sowie der EMT-Transkriptionsfaktoren Slug, Snail und Twist durchgeführt und ihre Wirkung auf die EMT untersucht. Die Zellmorphologie, Veränderungen im E-Cadherin-Spiegel und Migrationseigenschaften dienten dabei als Marker der EMT.

## **Spezifische Fragestellungen**

### Untersuchungen im ROSE-Modell

- 1) Welche Rolle spielt der RALA-Signalweg neben dem MAPK- und dem PI3K-Signalweg in der KRAS-vermittelten Transformation des zellulären Phänotyps?
- 2) Durch welche RAS-aktivierten Signalwege (MAPK, PI3K, RALA) werden die typischen EMT-Faktoren Slug, Snail und Twist reguliert?
- 3) Führt die siRNA-vermittelte transiente Ausschaltung (Knockdown) der EMT-Faktoren zur Reversion des Phänotyps?
- 4) Welche Auswirkung hat der transiente Knockdown von Slug, Snail und Twist auf die Migration in RAS-ROSE?
- 5) Welche Auswirkung hat der transiente Knockdown von RALA sowie die kombinierte Hemmung mehrerer Signalwege auf die Migration?

### Untersuchungen mit den humanen Zelllinien HCT 116, SW 480, HT 29

- 6) Inwiefern unterscheiden sich die drei kolorektalen Karzinomzelllinien bezüglich ihrer Migrationseigenschaften?
- 7) Welche Auswirkung hat der transiente Knockdown von RALA auf die Migration?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkulturmethoden

#### 2.1.1 Zelllinien

##### Ovarialepithelzellen

ROSE 199 (Adams und Auersperg 1985)

ROSE A2/5 [=RAS-ROSE] (Tchernitsa et al. 2004)

Die ROSE A2/5 Zellen entstanden durch stabile KRAS-Transformation der ROSE 199 Zellen. Im Folgenden werden die ROSE A2/5 Zellen daher auch als RAS-ROSE Zellen bezeichnet.

##### Kolonkarzinomzellen

SW 480 (Gayet et al. 2001)

HCT 116 (Gayet et al. 2001)

HT 29 (Gayet et al. 2001)

#### 2.1.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) mit D10-Medium (bei RAS-ROSE zusätzlich 400 µg/µl G418) im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei 80-90 % Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Zum Passagieren wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und bis zum Ablösen mit 3 ml Trypsin-EDTA trypsinisiert. Nach Zugabe von 7 ml D10 wurde die Zellsuspension zentrifugiert (Zellkulturzentrifuge, 5 min, 150 x g). Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml frischem D10-Medium resuspendiert. Nach einem 1:10 Verdünnungsschritt wurden die Zellen in neuen Zellkulturflaschen mit D10-Medium weiterkultiviert.

#### 2.1.3 Auftauen der Zellen

Die Kryoröhrchen mit eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad unter Schwenken (37 °C, 2-3 min) aufgetaut und der Inhalt in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Unter

leichtem Schütteln wurde tropfenweise 10 ml D10-Medium dazugegeben und anschließend zentrifugiert (Zellkulturzentrifuge, 5 min, 150 x g). Das Zellpellet wurde in neuem D10-Medium resuspendiert.

#### **2.1.4 Einfrieren der Zellen**

Bei 70 %iger Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert und in 3 ml D10-Medium resuspendiert. Je 900 µl dieser Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen gegeben und mit 100 µl DMSO versetzt. In einem Isopropanol-gefüllten Einfrierbehälter wurden die Zellen mit einer Abkühlgeschwindigkeit von ca. 1 °C/h auf –80 °C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte im Stickstofftank in der Gasphase.

#### **2.1.5 Transienter Knockdown mittels siRNA-Interferenz**

Um die Funktion einzelner Gene näher zu untersuchen, wurden diese mithilfe der siRNA-Interferenztechnik transient ausgeschaltet (Dykxhoorn und Lieberman 2005). Hierbei wurden kurze RNA-Duplexe (siRNA) verwendet, welche zur Ziel-mRNA komplementär sind. Durch die Anlagerung wird deren Abbau eingeleitet, was zu einer verminderten Translation des zugehörigen Proteins führt (Knockdown). Als Kontrolle diente eine siRNA mit einer Nonsense-Sequenz (Scramble) sowie Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden (Mock). Die Isolation der RNA bzw. der Proteine erfolgte jeweils 48 h nach der zweiten Transfektion.

##### **2.1.5.1 Transfektion der RAS-ROSE Zellen**

Zur Transfektion wurden selbst hergestellte siRNA-Konstrukte (Herstellung mit Silencer siRNA Construction Kit, Thermo Fisher Scientific, USA) mit einer Endkonzentration von 1 nM verwendet (siehe 2.7). Die Zellen wurden in 6-Wells ( $4 \cdot 10^4$  Zellen/Well) ausplattiert und 24 h sowie 48 h später transfiziert. In unterschiedlichen Ansätzen wurden je 12 µl OptiMEM I mit 3 µl Transfektionsreagenz (Ansatz A), sowie 183 µl OptiMEM I mit 2 µl siRNA (500nM) (Ansatz B) vorbereitet und vorsichtig miteinander gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsmix gleichmäßig auf die vorbereiteten Zellen verteilt. Die Reaktion wurde nach 4 h

Inkubationszeit im Zellinkubator durch Zugabe von 500 µl OptiMEM I mit 30 %igem FCS abgestoppt.

#### **2.1.5.2 Transfektion der kolorektalen Zelllinien HT 29, HCT 116, SW 480**

Zur Transfektion wurden die selbst hergestellten Konstrukte (Scramble für SW 480 und HCT 116, sowie der RALA-Duplex) mit einer Endkonzentration von 1,5 nM verwendet. Für die Zelllinie HT 29 wurde für Scramble eine kommerziell erhältliche siRNA mit einer Endkonzentration von 63 nM verwendet, da die selbst hergestellte siRNA starke off-target Effekte zeigte (Masterarbeit Yu Qian, Charité Berlin 2010). Die Zellen wurden in 10 cm-Schalen ( $1,5 \cdot 10^5$  Zellen bei HT 29 bzw.  $3 \cdot 10^5$  Zellen bei HCT 116 und SW 480) ausplattiert und 24 h sowie 48 h später transfiziert. Es wurden zwei unterschiedliche Ansätze vorbereitet. Für Ansatz A wurde 825 µl OptiMEM I mit 24,75 µl Lipofectamin 2000 (für SW 480) bzw. Lipofectamin RNAiMAX (für HT 29 und HCT 116) vermischt. Für Ansatz B wurde 825 µl OptiMEM I mit 24,75 µl der entsprechenden siRNA vorsichtig vermischt. Beide Ansätze wurden anschließend zusammengeführt und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Danach wurde der Reaktionsmix zu den vorbereiteten Zellen gegeben.

#### **2.1.6 Hemmung des MAPK- und PI3K-Signalweges mit Inhibitoren**

Um den Einfluss des MAPK- und des PI3K-Signalweges auf den Phänotyp der RAS-ROSE Zellen zu untersuchen, wurden diese zwei Signalkaskaden durch spezifische Inhibitoren gehemmt (Favata et al. 1998; Vlahos et al. 1994). Dazu wurden die Zellen in 6-Wells ( $4 \cdot 10^4$  Zellen/Well) ausplattiert. 24 h später erfolgte die Zugabe des MEK1/2-Inhibitors U0126 sowie des PI3K-Inhibitors LY294002 (Stelnic-Klotz et al. 2012). Beide Inhibitoren wurden mit einer Endkonzentration von 10 µM verwendet. Für die Lösungsmittelkontrolle wurde die gleiche Menge an DMSO zu den Zellen gegeben. Nach 48 h Inkubationszeit im Zellinkubator wurden die Zellen untersucht.

#### **2.1.7 Proliferationsmessung nach FCS-Reduktion im Medium**

Um die Migrationseffekte der Zellen gezielt erforschen zu können, musste die Proliferation der Zellen weitestgehend gestoppt werden. Hierzu wurde der FCS-Anteil

im Medium reduziert und die Proliferation der Zellen im XTT-Test (Roche, Mannheim) überprüft. Die XTT-Messung basiert auf der Reduktion eines Tetrazolium-Salzes zu Formazan durch die mitochondriale Dehydrogenase. Die oxidierte und die reduzierte Form haben unterschiedliche Absorptionsmaxima, welche fotometrisch gemessen werden können (Wellenlänge: 490 nm, Referenzwellenlänge: 690 nm). Daraus können Rückschlüsse auf die Zellproliferation gezogen werden.

Für die RAS-ROSE Zellen wurde der optimale FCS-Anteil mit 1 % bereits in Vorversuchen ermittelt (Stelnic-Klotz et al. 2012). Für die verwendeten kolorektalen Zelllinien wurde die nötige FCS-Konzentration zur Hemmung der Proliferation im Rahmen dieser Arbeit bestimmt. Hierzu wurden auf 96-Well-Platten pro Vertiefung je  $5 \cdot 10^3$  Zellen (HCT 116 bzw. SW 480 bzw. HT 29) in 150  $\mu$ l D10-Medium ausplattiert. Am darauf folgenden Tag wurde mit FCS-freiem Medium gewaschen und neues Medium mit entsprechend reduziertem FCS-Anteil hinzugegeben. Eine Stunde später sowie nach 25 und 49 h wurde dann das XTT-Reagenz nach Herstellerangaben hinzugegeben. Nach einer Einwirkzeit von je 4 h im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Absorption im ELISA-Reader gemessen und vom Mediumleerwert abgezogen. Die Absorptionsmessungen ergaben dabei eine optimale Hemmkonzentration von 1 % FCS bei SW 480, 0,5 % FCS bei HCT 116 sowie 0,1 % FCS bei HT 29.

### **2.1.8 Wundheilungs-Assay**

Die Migrationseigenschaften der Zellen wurden mittels Wundheilungs-Assays untersucht (Liang et al. 2007). Hierzu wurden 24 h nach dem transienten siRNA-Transfer in 10 cm Zellkulturschalen die Zellen in kleinere Zellkulturplatten umplattiert (RAS-ROSE in 6-Wells, HT 29 und HCT 116 in 12-Wells, SW 480 in 24-Wells), sodass ein konfluenter Zellrasen entstehen konnte. Nach einer Adaptionzeit (12 h bei RAS-ROSE bzw. 29 h bei den kolorektalen Zelllinien) wurde mit einer Pipettenspitze eine Wunde in den Zellrasen gekratzt. Die Versuchsbedingungen wurden in Vorexperimenten optimiert. Aufgrund unterschiedlicher Zellhaftung an der Oberfläche der Schalen wurden verschiedene Pipettenspitzen zum Setzen der Wunde verwendet (1000  $\mu$ l-Spitze bei RAS-ROSE, 100  $\mu$ l-Spitze bei HCT 116 und HT 29, 10  $\mu$ l-Spitze bei SW 480). Anschließend wurden die Zellen mit FCS-freiem Medium gewaschen, um die

nicht angehefteten Zellen zu entfernen. Bis zum Verschluss der Wunde wurden Fotos in regelmäßigen Abständen gemacht (Keyence Mikroskop BZ8100, 4x Objektiv). Die Fläche der Wunde wurde manuell mit dem Programm ImageJ (Version 1.46) in Pixel bemessen. Damit die unterschiedliche Wundbreite zu Beginn der Experimente nicht das Ergebnis verfälscht, wurden die Migrationsgeschwindigkeiten der Zellen quantitativ (Stelnic-Klotz et al. 2012) nach folgender Formel ausgewertet:

$$\text{Migrationsgeschwindigkeit} \left[ \frac{\text{Pixel}}{\text{Stunde}} \right] = \frac{\text{Fläche der frischen Wunde [Pixel]} - \text{Fläche nach X Stunden [Pixel]}}{X [\text{Stunden}]}$$

### 2.1.9 Zellzyklusanalysen

Die Analysen der Zellzyklen wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Hierzu wurde der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet, welcher stöchiometrisch an doppelsträngige DNA bindet. Die analysierten Zellen konnten somit anhand ihres DNA-Gehalts den einzelnen Zellzyklen zugeordnet werden.

Im Anschluss an die Wundheilungs-Assays wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA von der Kulturplatte gelöst und nach Zugabe von 2 ml D10 zentrifugiert (5 min, 1000 x g). Nach einem Waschschrift mit 1xPBS wurden die Zellpellets in 1 ml 70 %igem Ethanol fixiert (-20 °C, ÜN). Anschließend wurde wieder zentrifugiert (5 min, 1000 x g). Die Zellpellets wurden dann in 500 µl Verdünnungspuffer resuspendiert und mit RNase behandelt (10 mg/ml, 37 °C, 30 min). Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (5 min, 1000 x g) erfolgte die Färbung der Zellen mittels Propidiumiodid im Dunkeln. Hierzu wurden die Zellpellets in 500 µl Verdünnungspuffer mit 20 µg/ml Propidiumiodid vermischt und lichtgeschützt auf Eis inkubiert (20 min). Die Messung der Zellzyklen erfolgte im Durchflusszytometer (FACS Calibur, BD Biosciences, USA). Zur Auswertung und Darstellung der Ergebnisse wurden die Programme Cylchred und WinMDI 2.8 verwendet. Der prozentuale subG1-Anteil wurde aus zwei biologischen Replikaten berechnet und als Mittelwert dargestellt.

### **2.1.10 Kombinierte Hemmung mehrerer Signalwege**

Bei einem Teil der Wundheilungs-Assays, FACS-Analysen und E-Cadherin-Expressionsstudien wurden mehrere Signalwege parallel ausgeschaltet. Hierbei wurden die Inhibitorsubstanzen U0126 (Hemmung des MAPK-Signalweges) und LY294002 (Hemmung des PI3K-Signalweges) im Anschluss an die zweite durchgeführte Transfektion mit RALA-spezifischer siRNA hinzugegeben. Als Kontrollen dienten RAS-ROSE Zellen, die mit Nonsense-siRNA (Scramble) transfiziert wurden, und Zellen, die nur mit Transfektionsreagenz behandelt wurden (Mock). Hier wurde nach der zweiten Transfektion die entsprechende Menge des Lösungsmittels DMSO hinzugegeben. Bei den jeweiligen Experimenten mit zwei Inhibitoren wurden beide Substanzen zeitgleich hinzupipettiert. Die DMSO-Lösungsmittelkontrolle wurde dementsprechend mengenmäßig angepasst. Mittels qPCR wurden die RALA-Knockdowns 48 h nach der zweiten Transfektion exemplarisch nachgewiesen.

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 RNA-Isolation**

Die Gesamt-RNA wurde mithilfe des „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert und gereinigt. Um eine Kontamination mit DNA auszuschließen, erfolgte ein Verdauungsschritt mit DNase. Die RNA wurde in 30 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

Die fotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen erfolgte im Nanofotometer durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260}$ ) und 280 nm ( $OD_{280}$ ). Eine  $OD_{260} = 1$  entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 27-35 µg/ml einzelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Der Reinheitsgrad der Lösung kann durch den Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  ermittelt werden. Für aufgereinigte RNA ist ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 optimal. Die extrahierte RNA wurde anschließend auf 100 ng/µl verdünnt und zur cDNA-Synthese eingesetzt.



### 2.2.2 cDNA-Synthese

Mithilfe des Kits „TaqMan Reverse Transcription Reagents“ (Invitrogen, Karlsruhe) wurde die RNA enzymatisch in cDNA umgeschrieben. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

Nuklease-freies Wasser	4,625 µl
10 x RT-Puffer	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5,5 µl
dNTP Mix	5 µl
Random Hexamers	1,25 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,5 µl
Reverse Transcriptase (50 U/µl)	0,625 µl

Die Reaktion wurde im Thermocycler durchgeführt: Nach dem Inkubationsschritt (10 min, 25 °C) wurde die RNA enzymatisch in cDNA umgeschrieben (30 min, 48 °C). Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms (5 min, 95 °C). Die cDNA wurde bei –20 °C gelagert.

### 2.2.3 Quantitative Real-Time PCR

Die cDNA wurde mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) untersucht (Wong und Medrano 2005). Diese Technik beruht auf der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und erlaubt zusätzlich eine Quantifizierung anhand der Messung von Fluoreszenz-Signalen, da diese proportional mit der Menge an PCR-Amplifikaten zunehmen. Bei den kolorektalen Zelllinien (SW 480, HCT 116, HT 29) wurde mit kommerziell erhältlichen TaqMan-Sonden (siehe 2.10) gearbeitet, die Analysen für die ROSE-Zellen erfolgten mit der SYBR green-Methode. Die zu untersuchenden Proben wurden auf eine optisch durchlässige 96-Well-Platte pipettiert (BD Biosciences, USA), mit optisch durchlässiger Folie verschlossen und kurz zentrifugiert, um den Inhalt gleichmäßig zu verteilen und Luftblasen zu beseitigen. Mithilfe der StepOne Software Version 2.3 wurden die PCR-Daten ausgewertet. Die relative Quantifizierung der jeweiligen Transkripte erfolgte über die Delta-Delta-C<sub>T</sub>-Methode (Livak und Schmittgen 2001).

### 2.2.3.1 TaqMan

Pro Well wurde folgender Pipettieransatz gewählt:

Mastermix Taqman	10 µl
Expressionsassay	1 µl
Nuklease-freies Wasser	8 µl
cDNA	1 µl

Als endogene Kontrolle diente  $\beta$ -Actin bei HT 29 und SW 480 bzw. Ubiquitin (UBE2D2) bei HCT 116 (Masterarbeit Yu Qian, Charité Berlin 2010). Die Messung erfolgte im Gerät StepOnePlus Real-Time-PCR (Thermo Fisher Scientific, USA) unter den Standardeinstellungen (60 °C Annealing-Temperatur, 30 Zyklen).

### 2.2.3.2 SYBR green

Pro Well wurde folgender Pipettieransatz gewählt:

Mastermix SYBR green	5 µl
Primer hin	1 µl
Primer rück	1 µl
Nuklease-freies Wasser	2,5 µl
cDNA	0,5 µl

GAPDH wurde als endogene Kontrolle verwendet. Die Messung erfolgte im Gerät StepOnePlus Real-Time-PCR (Thermo Fisher Scientific, USA) unter den Standardeinstellungen (60 °C Annealing-Temperatur, 40 Zyklen).

### 2.2.4 Isolierung von Gesamtproteinen

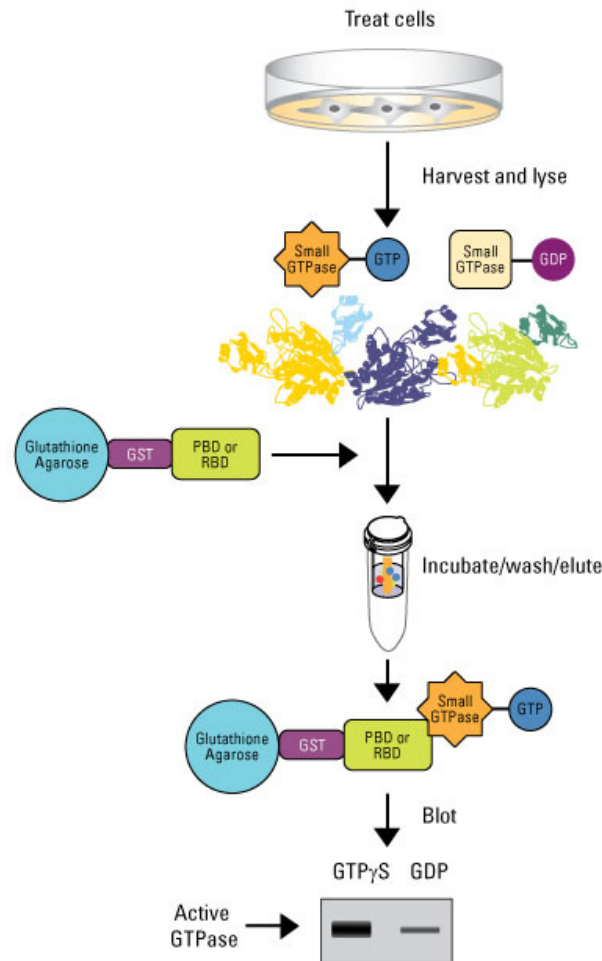
Zur Isolierung der Gesamtproteine wurden die Zellen in 10 cm-Schalen ausplattiert und bei 80-90 % Konfluenz auf Eis lysiert. Hierzu erfolgte nach einem Waschschrift mit eiskaltem TBS die Zugabe von 500 µl Lysepuffer (Thermo Fisher Scientific, USA) mit Protease-Inhibitoren (Roche, Mannheim). Mit einem Zellkulturschaber wurden die lysierten Zellen in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (4 °C, 15 min, 16.000 x g). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß pipettiert.

### **2.2.5 Konzentrationsbestimmung der Proteine**

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Proteine erfolgte mit der Amidoschwarz-Methode (Schaffner und Weissmann 1973). Vorab wurde hierzu eine Eichkurve mit Rinderalbumin erstellt (bovine serum albumin = BSA, Sigma-Aldrich, Steinheim). Es wurden dazu Konzentrationen zwischen 0,125 und 10 mg/ml verwendet. In einer Doppelbestimmung wurden anschließend je 1 µl der Protein- bzw. BSA-Probe auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert. Nach Anfärben der Proteine mit Amidoschwarz (Merk, Darmstadt) folgten mehrere Waschschriffe mit Entfärberlösung. Danach wurden die Proteinproben mit einem Skalpell ausgeschnitten und unter Schütteln in Elutions-Puffer aufgelöst. Im ELISA-Reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, USA) erfolgte dann die fotometrische Messung bei einer Wellenlänge von 630 nm, woraus die Konzentrationswerte bestimmt wurden.

### **2.2.6 RALA-Aktivitäts-Test**

Die GTPase RALA ist aktiv bei einer Bindung an GTP und inaktiv bei einer Bindung an GDP. Der Aktivierungsgrad des RALA-Signalweges lässt sich somit durch GTP-Bindungsstudien bestimmen. Hierzu wurde der „Active GTPase Pull-Down and Detection Kit“ (Thermo Fisher Scientific, USA) eingesetzt. Dieser Test macht sich die Eigenschaft zunutze, dass nur die aktive GTP-gebundene Form der RALA-Proteine mit dem Effektorprotein RALBP1 interagiert. Nach mehreren Waschschriffen und der Eluierung mit SDS-Probenpuffer kann dann mit einem spezifischen RALA-Antikörper im Western Blot die Menge an aktiviertem RALA bestimmt werden (Abb. 4). Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde hierzu je 500 µg an Protein eingesetzt. Als Positiv- und Negativkontrollen wurden die jeweiligen Zelllysate vor dem Protein-Pulldown mit einem GTP-Analogon bzw. GDP-Analogon inkubiert, um das gesamte RALA-Protein in der Zelle zu aktivieren bzw. zu deaktivieren (Abb. 4).



**Abb. 4 Schema des RALA-Aktivitätstests**

(Abbildung aus: Smith et al. 2011. Measure activation of small GTPases via their specific downstream effectors. Thermo Fisher Scientific)

URL: <https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/protein-biology-application-notes/measure-small-gtpase-activation.html> [17.09.2015]

**2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Im Anschluss an den Protein-Pulldown wurden die Lysate mit 50 µl 2xSDS-Probenpuffer gemischt und aufgekocht (5 min, 95 °C). Danach erfolgte die Auftrennung mittels Gelelektrophorese. Hierzu wurden ein 4 %iges Sammel- sowie ein 12 %iges Trenngel vorbereitet (siehe 2.5). Zur Bestimmung der Proteingröße wurden 5 µl des Proteinmarkers Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas, Canada) aufgetragen. Dieser trennt sich in Molekulargewichte zwischen 10 und 170 kDa auf. Von den Proteinlysaten wurden je 25 µl aufgetragen. Bis zum Erreichen des Trenngeles

wurde eine Spannung von 60 V angelegt, im Anschluss wurde sie auf 110 V hochgestellt.

### 2.2.8 Western Blot

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Proteinbanden mittels Semi-Dry-Blot auf eine Nitrozellulosemembran (Protran Whatman, Dassel) übertragen. Der Transfer wurde bei 100 mA pro Membran für die Dauer von 40 min durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran mit 10 %iger Magermilch in TBST geblockt (1 h auf dem Schüttler, RT) und anschließend fünfmal in TBST gewaschen (je 5 min auf dem Schüttler). Als primärer Antikörper gegen RALA wurde der im „Active RalA Pull-Down and Detection Kit“ (Thermo Fisher Scientific, USA) mitgelieferte monoklonale Maus-Antikörper verwendet (1:1000 in 5 % MM in TBST). Die Membran wurde damit über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran erneut fünfmal in TBST gewaschen (je 5 min auf dem Schüttler) und mit einem sekundären Anti-Maus-Antikörper inkubiert (1:5000 in 5 % MM in TBST, 1 h, RT, #325-035-045, Dianova, Hamburg). Nach fünf Waschschritten in TBST (je 5 min auf dem Schüttler) konnten die Proteinbanden mittels Chemolumineszenz (GE Healthcare, München) auf Röntgenfilm nach Herstellerangaben detektiert werden.

## 2.3 Laborgeräte und Materialien

10 cm Petrischalen	BD Biosciences, USA
15 ml + 50 ml Röhrchen	BD Biosciences, USA
6-, 12-, 24-, 96-Well-Platten	BD Biosciences, USA
96-Well PCR-Platte	Thermo Fisher Scientific, USA
Durchflusszytometer, FACS Calibur	BD Biosciences, USA
Elektrophoresekammer und Zubehör	Bio-Rad, München
ELISA-Reader	Bio-Rad, München
Einfrierbehälter	Nalgene, Dänemark
Kryoröhrchen	Sarsted, Nümbrecht
Magnetrührer	IKA Werke, Staufen
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Keyence BZ-8100	Keyence, Japan
Nanofotometer	Implen, München
Nitrozellulosemembran	Protran Whatman, Dassel
Optical 96-Well Fast Plate	BD Biosciences, USA
pH-Meter	Schott, Mainz

Röntgenfilme, Amersham Hyperfilm ECL  
 Semi-Dry-Blotter  
 Spannungsgerät  
 Thermocycler Progene  
 Thermomixer  
 vertikaler Schüttler  
 Vortex-Mixer  
 Waage  
 Wasserbad 1004  
 Zellinkubator  
 Zellkulturflaschen  
 Zentrifuge 5417R  
 Zentrifuge Avanti J-25; Rotor: JA-20

GE Healthcare, München  
 Peqlab, Erlangen  
 Pharmacia Biotech, Waldkirch  
 Biostep, Jahnsdorf  
 Eppendorf, Hamburg  
 Hoefer, USA  
 Heidolph, Schwabach  
 Sartorius, Goettingen  
 GFL, Burgwedel  
 Hera, Blaufelden  
 BD Biosciences, USA  
 Eppendorf, Hamburg  
 Beckmann, München

## 2.4 Kommerzielle Kits

Name	Verwendung	Hersteller
Active RaIA Pull-Down and Detection Kit	RALA-Aktivitätstest	Thermo Fisher Scientific, USA
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Proliferationsmessung	Roche, Mannheim
Chemolumineszenz Detektionskit	Western Blot	GE Healthcare, München
RNeasy Mini Kit (50)	RNA-Isolation	Qiagen, Hilden
Silencer siRNA Construction Kit	siRNA-Herstellung	Thermo Fisher Scientific, USA
SYBR Green PCR Master Mix	qPCR	Thermo Fisher Scientific, USA
TaqMan Gene Expression Master Mix	qPCR	Thermo Fisher Scientific, USA
TaqMan Reverse Transcription Reagents	cDNA-Synthese	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.5 Stammlösungen

### Amidoschwarz (400 ml Ansatz)

0,4 g Amidoschwarz (Merk, Darmstadt)  
90 ml Methanol (J.T.Baker, Niederlande)  
20 ml Eisessig (Merk, Darmstadt)  
add. bi-destilliertes Wasser

### Amidoschwarz-Elutionspuffer (500 ml Ansatz)

250 ml Ethanol (J.T.Baker, Niederlande)  
50 µl 0,5 M EDTA (Merk, Darmstadt)  
25 ml 0,5 M NaOH (Merk, Darmstadt)  
add. bi-destilliertes Wasser

### Amidoschwarz-Entfärberlösung (1000 ml Ansatz)

400 ml Methanol (J.T.Baker, Niederlande)  
100 ml Eisessig (Merk, Darmstadt)  
add. bi-destilliertes Wasser

### D10-Medium

500 ml DMEM (Lonza, Schweiz)  
50 ml FCS (Biochrom AG, Berlin)  
2 mM Ultraglutamine 1 (Lonza, Schweiz)  
100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin)

### 0,5 M EDTA (1000 ml Ansatz)

186,3 g EDTA (Merk, Darmstadt)  
20 g NaOH-Plättchen (Merk, Darmstadt)  
add. bi-destilliertes Wasser  
pH 8,0

### FACS-Verdünnungspuffer (20 ml Ansatz)

0,10 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim)  
0,5 % BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim)  
add. 1 x PBS

#### 10 x PBS (1000 ml Ansatz)

80 g NaCl (Merk, Darmstadt)  
2 g KCl (Merk, Darmstadt)  
14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merk, Darmstadt)  
2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merk, Darmstadt)  
add. bi-destilliertes Wasser  
pH 7,4

#### 4 % Sammelgel (4 Gele)

6,1 ml bi-destilliertes Wasser  
2,5 ml 0,5 M Tris, pH 6,8  
1,33 ml 30 % Acrylamid (Roth, Karlsruhe)  
100 µl 10 % SDS (Serva, Heidelberg)  
50 µl 10 mM APS (Merk, Darmstadt)  
10 µl TEMED (Sigma-Aldrich, Steinheim)

#### 5 x TBS (1000 ml Ansatz)

50 ml 1 M Tris-Base, pH 8,0  
150 ml 5 M NaCl  
add. bi-destilliertes Wasser

#### TBST (1000 ml Ansatz)

10 ml 1 M Tris-Base, pH 8,0  
30 ml 5 M NaCl (Merk, Darmstadt)  
1 ml Tween 20 (Serva, Heidelberg)  
add. bi-destilliertes Wasser

#### 12 % Trenngel (2 Gele)

6,7 ml bi-destilliertes Wasser  
5 ml 1,5 M Tris, pH 8,6  
8 ml 30 % Acrylamid (Roth, Karlsruhe)  
200 µl 10 % SDS (Serva, Heidelberg)  
100 µl 10 mM APS (Merk, Darmstadt)  
10 µl TEMED (Sigma-Aldrich, Steinheim)

#### 0,5 M Tris (500 ml Ansatz)

78,7 g Tris-HCl (Merk, Darmstadt)  
add. bi-destilliertes Wasser  
pH 6,8



### 1,5 M Tris (500 ml Ansatz)

118,7 g Tris-HCl (Merk, Darmstadt)  
add. bi-distilliertes Wasser  
pH 8,7

### Western Blot 5x-Laufpuffer (1000 ml Ansatz)

15,1 g Tris-Base (Merk, Darmstadt)  
72 g Glycin (Merk, Darmstadt)  
5 g SDS (Serva, Heidelberg)  
add. bi-distilliertes Wasser  
pH 8,3

### Western Blot 2,5x-Transferpuffer (1000 ml Ansatz)

14,5 g Tris-Base (Merk, Darmstadt)  
7,3 g Glycerol (Merk, Darmstadt)  
9,37 ml 10 % SDS (Serva, Heidelberg)  
500 ml Methanol (J.T.Baker, Niederlande)  
add. bi-distilliertes Wasser

## **2.6 Sonstige Chemikalien**

DMSO Hybri-Max	Sigma-Aldrich, Steinheim
G418 Sulfat (50 ng/ml)	PAA, USA
LY294002	Alexis Biochemicals, USA
Oligofectamin	Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM I	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
U0126	Promega, USA
Ultraglutamin	Lonza, Schweiz

## **2.7 DNA-Oligonukleotide für die siRNA-Herstellung**

RALA siRNA 1 (ROSE)	sense: 5'-AAC AGT GGA ACG TTA ACT ATG CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAC ATA GTT AAC GTT CCA CTG CCT GTC TC-3'
RALA siRNA 2 (ROSE)	sense: 5'-AAC GGA CTT CAG GGA ACA GAT CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAA TCT GTT CCC TGA AGT CCG CCT GTC TC-3'

RALA siRNA 3 (ROSE)	sense: 5'-AAC GGA AGT AGT TGT CTC TAA CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAT TAG AGA CAA CTA CTT CCG CCT GTC TC-3'
RALA (humane Zelllinien)	sense: 5'-AAC TAA GAT ATC GAT CTG GAC CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAG TCC AGA TCG ATA TCT TAG CCT GTC TC-3'
Sug siRNA 1 (ROSE)	sense: 5'-AAT CAC TGT GTG TGT GTC CAG CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAC TGG ACA CAC ACA CAG TGA CCT GTC TC-3'
Sug siRNA 2 (ROSE)	sense: 5'-AAT AGG GCT GTA CGC TCC TGA CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAT CAG GAG CGT ACA GCC CTA CCT GTC TC-3'
Slug siRNA 3 (ROSE)	sense: 5'-AAA GAC TCC TCA TGT TTA TGC CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAG CAT AAA CAT GAG GAG TCT CCT GTC TC-3'
Snail siRNA 1 (ROSE)	sense: 5'-AAG TCC TGC AGC TCG CTA TAG CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAC TAT AGC CAG CTG CAG GAC CCT GTC TC-3'
Snail siRNA 2 (ROSE)	sense: 5'-AAG GCC TTC AAC TGC AAA TAT CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAA TAT TTG CAG TTG AAG GCC CCT GTC TC-3'
Twist siRNA 1 (ROSE)	sense: 5'-AAA GTC TCT AGA CTG TCC ATG CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAC ATG GAC AGT CTA GAG ACT CCT GTC TC-3'
Scramble (ROSE)	sense: 5'-AAG CGA AGC CCA TTA CCC CTT CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAA AGG GTT AAT GGG CTT CGC CCT GTC TC-3'
Scramble (SW 480)	sense: 5'-AAC GCG AGC TCG TGC GAG GGT CCT GTC TC-3' antisense: 5'-AAA CCC TCG CAC GAG CTC CGC CCT GTC TC-3'

## 2.8 Kommerziell erworbene Kontroll-siRNA

Scramble (HCT 116, HT 29)	Silencer Negative Control No.1, #AM4611 (Ambion, USA)
------------------------------	---

## 2.9 PCR-Primer

E-Cadherin	f: 5'-GGG TTG TCT CAG CCA ATG TT-3' r: 5'-CAC CAA CAC ACC CAG CAT AG-3'
GAPDH	f: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' r: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'
RALA	f: 5'-ACA GCA GGG CAG GAA GAC TA-3' r: 5'-ACG TTC CAC TGG TCA GCT CT-3'

Slug	f: 5'-AAC ACA CAC TGG GGA AAA GC-3' r: 5'-ACA GCA GCC AGA CTC CTC AT-3'
Snail	f: 5'-GAG GAC AGT GGC AAA AGC TC-3' r: 5'-TCG GAT GTG CAT CTT CAG AG-3'
Twist	f: 5'-ACC CTC ACA CCT CTG CAT TC-3' r: 5'-CAG TTT GAT CCC AGC GTT TT-3'

## 2.10 TaqMan-Sonden

RALA	HS00800233_S1 (Thermo Fisher Scientific, USA)
UBE2D2	HS003666152_m1 (Thermo Fisher Scientific, USA)
β-Actin	HS9999903_m1 (Thermo Fisher Scientific, USA)

## 2.11 Computer-Programme

Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS4
FACS-Analysen	Cylchred WinMDI 2.8
Grafiken und statistische Auswertung	GraphPad Prism 6
Messung der Wundfläche des Zellkulturrasens	ImageJ 1.46

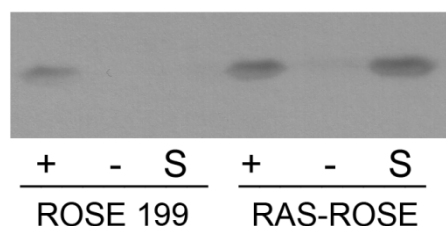
## 3 Ergebnisse

### 3.1 ROSE-Zellsystem

Das ROSE-Zellkulturmodell besteht aus immortalisierten ROSE 199 Zellen (Adams und Auersperg 1985) sowie deren KRAS-transformierten Derivaten ROSE A2/5 [zur Vereinfachung als RAS-ROSE bezeichnet] (Tchernitsa et al. 2004). Phänotypische und transkriptionelle Änderungen der RAS-ROSE Zellen können auf das kontinuierlich aktive KRAS-Onkogen zurückgeführt werden (Tchernitsa et al. 2004). Der KRAS-abhängige Aktivierungsgrad der GTPase RALA war dabei bisher noch ungeklärt.

#### 3.1.1 RALA-Aktivität in RAS-ROSE Zellen

Mithilfe des RALA-Pulldown-Assays (siehe 2.2.6) konnte der Aktivierungsgrad des RALA-Signalweges untersucht werden. Dieser Test macht sich die Eigenschaft zunutze, dass im Zelllysate nur die aktive GTP-gebundene Form mit dem Effektorprotein RaBP1 interagiert. Nach mehreren Waschschrinen und anschließender Eluierung kann dann mit einem spezifischen RALA-Antikörper im Western Blot die Menge an aktiviertem RALA bestimmt werden. Für die Positiv- und Negativkontrolle wurden die jeweiligen Zelllysate vor dem Protein-Pulldown mit einem GTP- bzw. GDP-Analogen inkubiert, um das gesamte RALA-Protein in der Zelle zu aktivieren bzw. zu deaktivieren (Abb. 5).



#### **Abb. 5 RALA-Aktivität im ROSE-Zellsystem**

Western Blot nach RALA-Pulldown-Assay.

(+): aktivierte GTPase, Positivkontrolle. (-): inaktivierte GTPase, Negativkontrolle, (S): Sample, unbehandelte GTPase. Das Molekulargewicht von RALA beträgt ca. 24 kDa. Aufgrund des Protein-Pulldowns war hier keine Ladekontrolle möglich.

Der RALA-Aktivitätstest zeigte eine deutliche Aktivierung des RALA-Signalweges bei RAS-ROSE Zellen und ist vergleichbar mit der Positivkontrolle. Bei den ROSE 199 Zellen hingegen ist der RALA-Signalweg nicht aktiv (Abb. 5). Es liegt daher nahe, die RALA-Aktivität in RAS-ROSE Zellen auf das konstitutiv exprimierte KRAS-Onkogen zurückzuführen.

### **3.1.2 Transienter RALA-Knockdown mittels RNA-Interferenz**

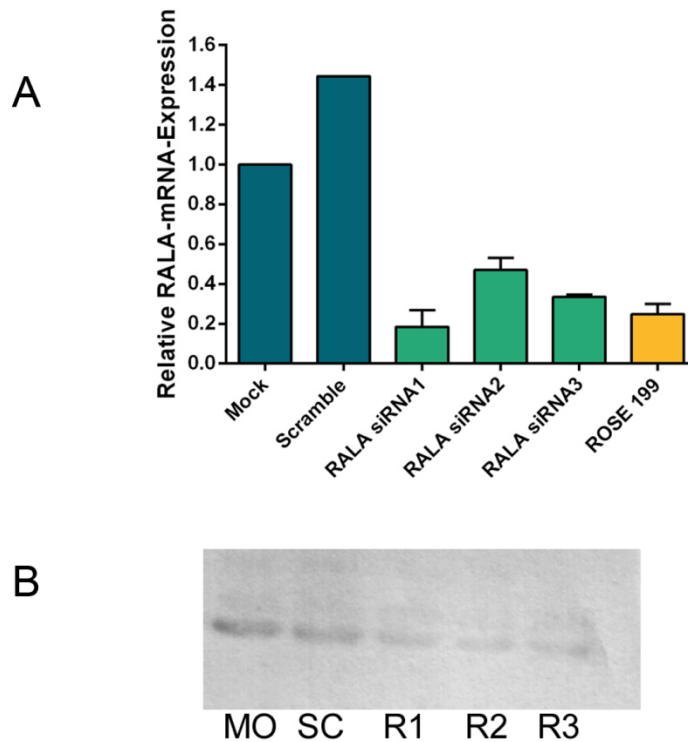
Der Einfluss des RALA-Signalweges auf den Phänotyp der KRAS-transformierten ROSE Zellen wurde mittels RNA-Interferenz untersucht. Hierbei wurden kurze RNA-Duplexe (siRNA) selbst hergestellt, die zur Ziel-mRNA komplementär sind (siehe 2.7). Durch die Anlagerung wird die Expression der Ziel-mRNA drastisch reduziert, was zu einer verminderten Translation des zugehörigen Proteins führt (Dykxhoorn und Lieberman 2005).

Als Kontrolle dienten eine siRNA mit einer Nonsense-Sequenz (Scramble) sowie Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden (Mock). Die Effizienz des RALA-Knockdowns wurde nach 48 h auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR) überprüft.

Die Reduktion der RALA-Expression wurde auf Mock bezogen und ergab für RALA siRNA1 eine Knockdown-Effizienz von 82 %, für RALA siRNA2 eine Knockdown-Effizienz von 53 % und für RALA siRNA3 eine Knockdown-Effizienz von 67 % (Abb. 6A). Als Vergleichsgröße diente die Expression von RALA in nicht transformierten ROSE 199 Zellen, die 75 % unter dem Wert der RAS-ROSE Zellen lag.

Zusätzlich wurde die Qualität des RALA-Knockdowns mit dem RALA-Aktivitätstest auf Proteinebene überprüft. Die Analysen mittels Pulldown-Assay erfolgten dabei 48 h nach der Transfektion. Hierbei zeigte sich eine herabgesetzte RALA-Aktivität durch alle drei siRNA-Konstrukte im Vergleich zu den Kontrollen Mock und Scramble (Abb. 6B).

Aufgrund ihrer Knockdown-Effizienz auf mRNA-Ebene wurden für weitere Arbeiten die siRNA-Konstrukte 1 und 3 verwendet.



### Abb. 6 Effektivität des RALA-Knockdowns in RAS-ROSE Zellen

**A: qPCR.** Reduktion der RALA-mRNA-Menge 48 h nach transienter Ausschaltung in RAS-ROSE Zellen, verglichen mit der Expression in unbehandelten ROSE 199 Zellen. Mock: Kontrolle, mit Transfektionsreagenz behandelte RAS-ROSE Zellen. Scramble: Kontrolle, RAS-ROSE Zellen transfiziert mit Nonsense-siRNA. RALA siRNA 1, 2, 3: RAS-ROSE Zellen transfiziert mit drei unabhängigen siRNA-Duplexen gegen RALA. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei biologischen Experimenten, welche wiederum aus zwei bis drei technischen Replikaten bestehen. Die Normalisierung erfolgte auf Mock. Die Scramble-Kontrolle, die zum Vergleich in der Grafik gezeigt wird, wurde im Rahmen eines unabhängigen Experimentes erhoben und ebenfalls auf die dazugehörige Mock-Kontrolle normalisiert.

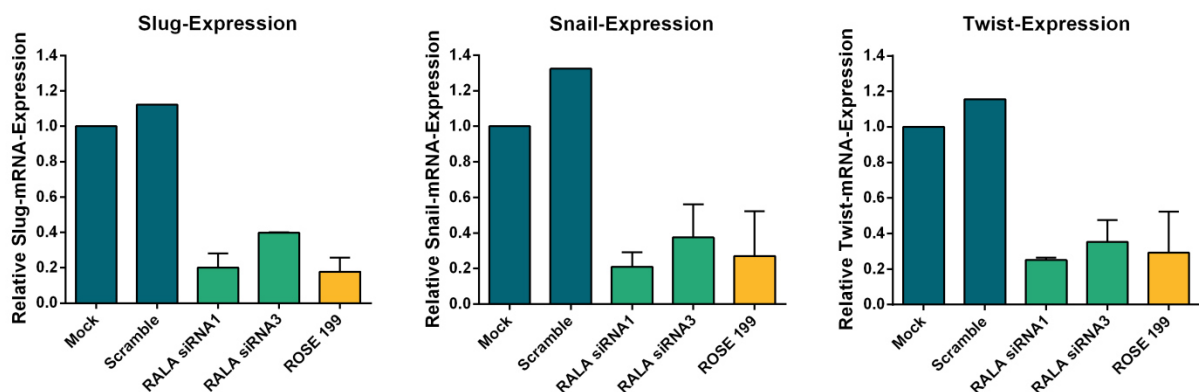
**B: RALA-Aktivitäts-Test:** Reduktion der RALA-Aktivität 48 h nach transienter Ausschaltung in RAS-ROSE Zellen. Pulldown des aktiven RALA mit anschließendem Western Blot. MO: Mock, SC: Scramble, R1: RALA-spezifische siRNA1, R2: RALA-spezifische siRNA2; R3: RALA-spezifische siRNA3. Das Molekulargewicht von RALA beträgt ca. 24 kDa. Aufgrund des Protein-Pulldowns war hier keine Ladekontrolle möglich.

### 3.1.3 Regulation der KRAS-abhängigen EMT-Faktoren Slug, Snail und Twist im ROSE Zellsystem

Vorexperimente der Arbeitsgruppe Molekulare Tumorphathologie (Prof. Schäfer) konnten die KRAS-abhängige Überexpression von Slug, Snail und Twist im ROSE-Modell zeigen (Abb. 3). Um den Einfluss des RALA-Signalweges auf die Expression dieser drei EMT-Faktoren zu klären, wurde deren Expression nach RALA-Knockdown mittels

qPCR bestimmt. Als Vergleichswert diente die Slug-, Snail- und Twist-Expression in unbehandelten ROSE 199 Zellen.

Die qPCR-Analysen ergaben, dass nach RALA-Knockdown die Expression von Slug, Snail und Twist auf das Niveau der nicht transformierten ROSE 199 Zellen herabgesetzt wurde (Abb. 7). Der Einfluss des RALA-Signalweges auf die Expression dieser drei Transkriptionsfaktoren liegt daher nahe.

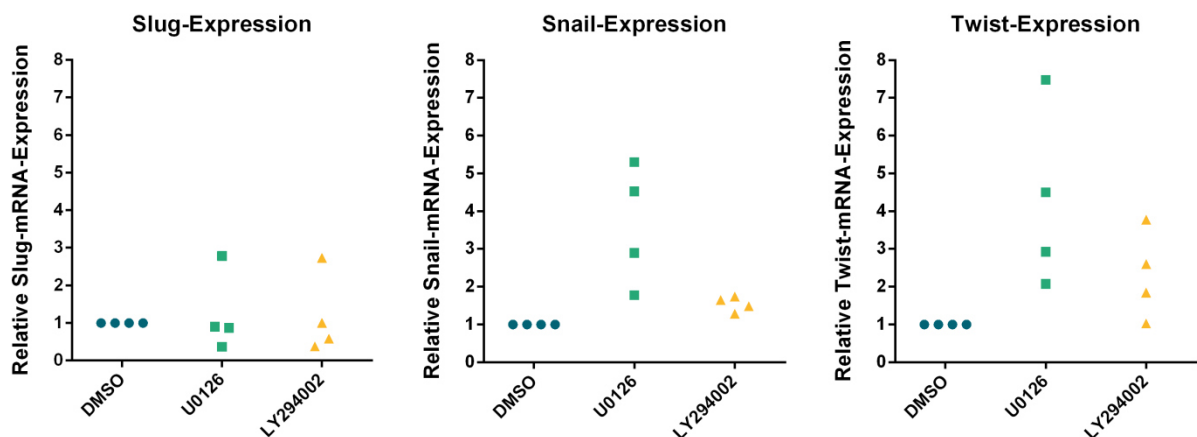


**Abb. 7 Relative Slug-, Snail- und Twist-mRNA-Expression 48 h nach RALA-Knockdown in RAS-ROSE Zellen, verglichen mit unbehandelten ROSE 199 Zellen**

qPCR. Mock: Kontrolle, mit Transfektionsreagenz behandelte RAS-ROSE Zellen. Scramble: Kontrolle, RAS-ROSE Zellen transfiziert mit Nonsense-siRNA. RALA siRNA 1, 3: RAS-ROSE Zellen transfiziert mit zwei unabhängigen siRNA-Duplexen gegen RALA. ROSE 199: Nicht transformierte ROSE-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei biologischen Experimenten, welche wiederum aus zwei bis drei technischen Replikaten bestehen. Die Normalisierung erfolgte auf Mock. Die Scramble-Kontrolle, die zum Vergleich in der Grafik gezeigt wird, wurde im Rahmen eines unabhängigen Experimentes erhoben und ebenfalls auf die dazugehörige Mock-Kontrolle normalisiert.

Um die Regulationskontrollen der EMT-Faktoren in RAS-ROSE Zellen näher zu charakterisieren, wurden Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren durchgeführt. Der MEK-Inhibitor U0126 wurde für eine Unterbrechung der MAPK-Kaskade verwendet (Favata et al. 1998), analog dazu erfolgte die Hemmung der PI3K-Kaskade durch den Inhibitor LY294002 (Vlahos et al. 1994). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit der äquivalenten Menge des Lösungsmittels DMSO behandelt wurden. Nach 48 h Einwirkzeit wurde die Slug-, Snail- und Twist-Expression auf mRNA-Ebene in der qPCR untersucht.

Dabei zeigte deren Expression in vier durchgeführten biologischen Replikaten eine hohe Variabilität (Abb. 8). Anhand der Expressions-Analysen lässt sich jedoch eine Tendenz erkennen: So stieg die Snail-Expression nach Hemmung des MAPK-Signalweges durch den Inhibitor U0126 auf das 1,8- bis 5,3-fache an. Ebenso konnte durch MAPK-Hemmung eine Überexpression von Twist auf das 2,0- bis 7,5-fache des Ausgangsniveaus nachgewiesen werden. Auch nach Hemmung des PI3K-Signalweges wurde für Twist eine bis zu 3,8-fache Überexpression festgestellt. Die Slug-Expression wurde nach spezifischer Inhibitor-Behandlung nicht wesentlich beeinflusst. Einschränkend ist bei diesem Experiment anzumerken, dass es innerhalb der Kontrollgruppe zu Schwankungen kam, die vermutlich auf toxische Effekte des Lösungsmittels DMSO zurückgeführt werden können.



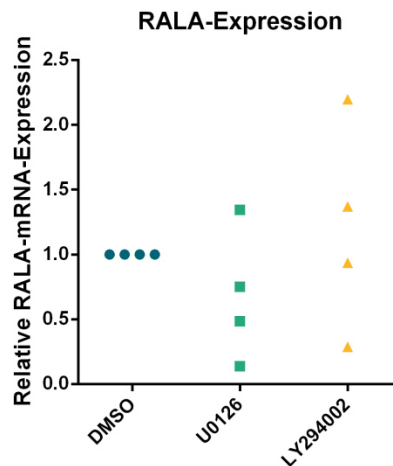
**Abb. 8 Relative Slug-, Snail- und Twist-mRNA-Expression 48 h nach spezifischer Inhibitor-Behandlung der RAS-ROSE Zellen**  
 qPCR. U0126: MEK-Inhibitor. LY294002: PI3K-Inhibitor. DMSO: Lösungsmittelkontrolle. Dargestellt sind die relativen Expressionswerte aus vier unabhängigen biologischen Replikaten nach Normalisierung auf die DMSO-Kontrolle.

### 3.1.4 Einfluss der MAPK- und PI3K-Signalwege auf die RALA-Expression

Der Frage, inwiefern RALA durch den MAPK- und den PI3K-Signalweg reguliert wird, wurde ebenfalls durch Tests mit Inhibitoren nachgegangen. Hierbei wurde die Expression der RALA-mRNA 48 h nach Inhibitorzugabe mittels qPCR untersucht. Auch hier zeigt sich eine hohe Variabilität der relativen Expressionswerte (Abb. 9). Eine Abnahme der RALA-Expression nach Ausschalten des MAPK-Signalweges ist in der Tendenz allerdings erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass der RALA-Signalweg durch



die MAPK-Kaskade aktiviert wird. Die Hemmung der PI3K-Kaskade zeigte hingegen keinen eindeutig zuordenbaren Effekt. Auch bei diesem Experiment kam es zu geringen Schwankungen innerhalb der DMSO-Lösungsmittelkontrolle.



**Abb. 9 Relative RALA-mRNA-Expression 48 h nach spezifischer Inhibitor-Behandlung der RAS-ROSE Zellen**

qPCR. U0126: MEK-Inhibitor. LY294002: PI3K-Inhibitor. DMSO: Lösungsmittelkontrolle. Dargestellt sind die relativen Expressionswerte aus vier unabhängigen biologischen Replikaten nach Normalisierung auf die DMSO-Kontrolle.

### 3.1.5 Rolle von Slug, Snail und Twist an der Transformation der RAS-ROSE Zellen

Um die Rolle von Slug, Snail und Twist an der KRAS-vermittelten Transformation der RAS-ROSE Zellen näher zu untersuchen, wurden diese Transkriptionsfaktoren ebenfalls mittels RNA-Interferenz-Technik transient ausgeschaltet. Die dazu benötigten siRNA-Duplexe wurden nach Ermittlung der passenden Sequenz selbst hergestellt (siehe 2.7). Für Twist konnte ein siRNA-Konstrukt, für Snail konnten zwei und für Slug drei siRNA-Konstrukte hergestellt werden. Die Effizienz der Knockdowns wurde nach 48 h auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR) überprüft (Abb. 10A). Die verwendeten Konstrukte zeigten dabei eine Knockdown-Effizienz von 60-90%. Von den untersuchten siRNAs für Slug wurden aufgrund ihrer Effizienz die Konstrukte 1 und 2 für weitere Arbeiten ausgewählt.

Da sich Signalwege über Rückkopplungsreaktionen stabil aufrechterhalten können (Lindsey und Langhans 2014), wurde untersucht, welchen Einfluss die durch RALA aktivierten Transkriptionsfaktoren Slug, Snail und Twist selbst auf die RALA-Expression

haben. Dazu wurde die relative RALA-Expression nach Knockdown der drei untersuchten Transkriptionsfaktoren in der qPCR bestimmt (Abb. 10B). Hierbei konnte eine Abnahme der relativen RALA-mRNA-Expression um 35 - 60 % beobachtet werden. Zusätzlich wurde die Expression der jeweils beiden anderen Transkriptionsfaktoren erfasst (Abb. 10C). Dabei zeigte sich eine Abnahme der relativen Expressionswerte um 70-85 %.

Die dargestellten Ergebnisse deuten auf eine Regulationsschleife der EMT-Transkriptionsfaktoren hin, die durch RALA vermittelt wird.

Einschränkend ist anzumerken, dass die Untersuchung zur Regulation der RALA-Expression sowie zur gegenseitigen Regulation der Transkriptionsfaktoren nur einmal durchgeführt wurde. Erst weitere Untersuchungen könnten die Ergebnisse validieren. Für zukünftige Forschungsarbeiten wären hier Proteinanalysen mit Western Blots interessant.

## Slug-KD

## Snail-KD

## Twist-KD

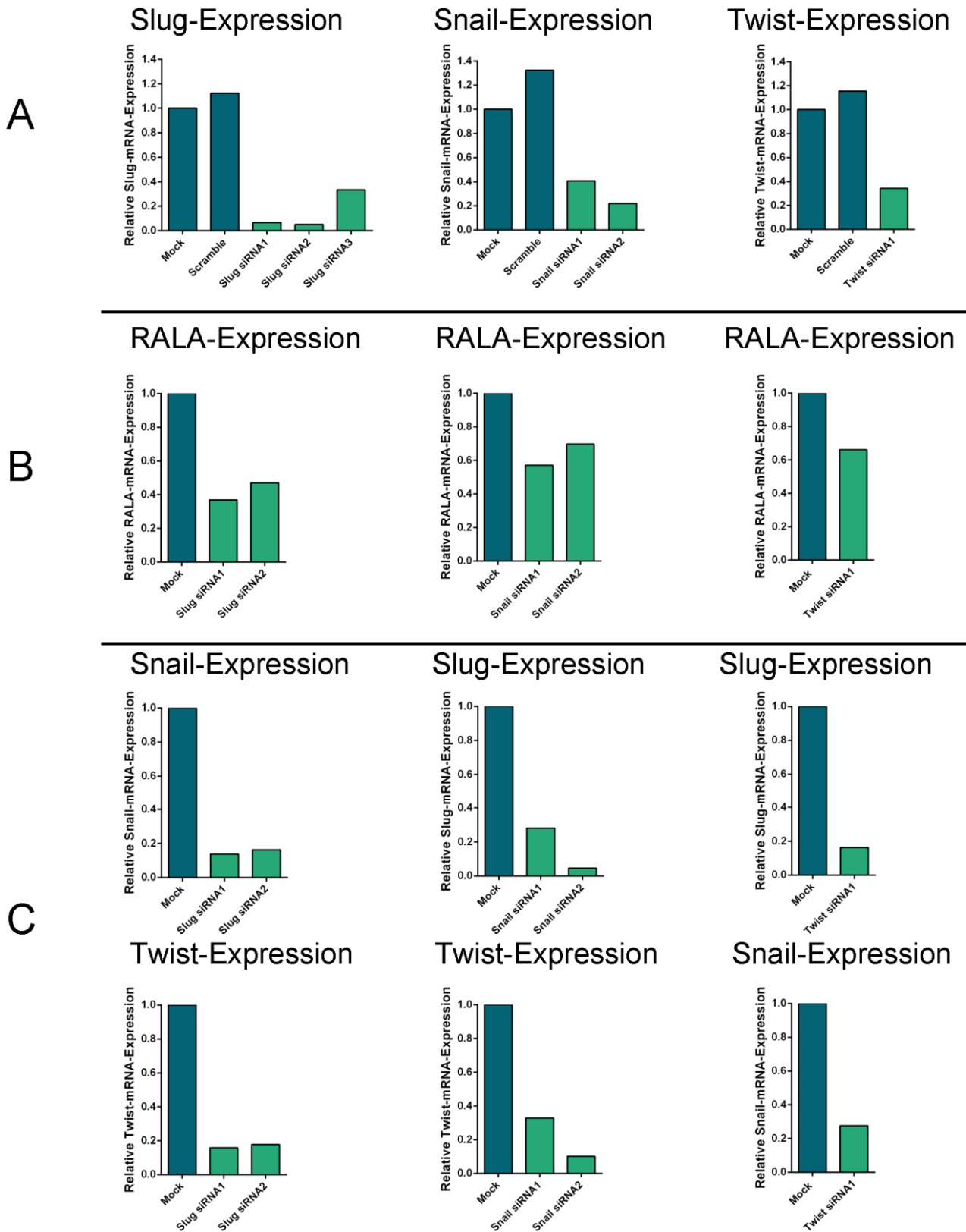


Abb. 10 Slug-, Snail- und Twist-Knockdowns in RAS-ROSE Zellen

### Fortsetzung zu Abb. 10

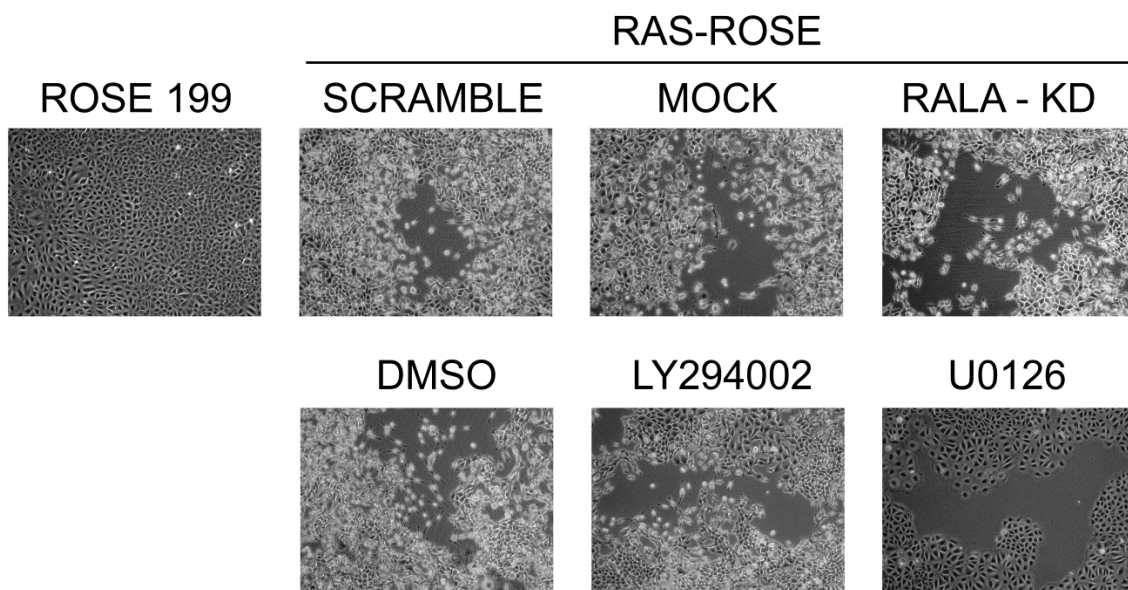
A: Knockdown-Nachweis mittels qPCR. Slug-KD: Knockdown mit drei unabhängigen siRNA-Duplexen gegen Slug. Snail-KD: Knockdown mit zwei unabhängigen siRNA-Duplexen gegen Snail. Twist-KD: Knockdown mit einem siRNA-Duplex gegen Twist. Mock: Kontrolle, mit Transfektionsreagenz behandelte RAS-ROSE Zellen. Scramble: Kontrolle, RAS-ROSE Zellen transfiziert mit Nonsense-siRNA. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus zwei bis drei technischen Replikaten eines biologischen Experimentes nach Normalisierung auf Mock. Die gezeigte Twist-Expression der Scramble-Kontrolle wurde im Rahmen eines unabhängigen Experimentes erhoben und ebenfalls auf die dazugehörige Mock-Kontrolle normalisiert.

B: Relative RALA-mRNA-Expression nach Knockdown von Slug, Snail und Twist. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus zwei bis drei technischen Replikaten eines biologischen Experimentes nach Normalisierung auf Mock.

C: Gegenseitige Regulation von Slug, Snail und Twist. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus zwei bis drei technischen Replikaten eines biologischen Experimentes nach Normalisierung auf Mock.

### 3.1.6 Einfluss des MAPK-, PI3K- und RALA-Signalweges auf die Morphologie der RAS-ROSE Zellen

Die Behandlung der Zellen mit dem MAPK-Inhibitor U0126 führte, wie bereits publiziert (Dissertation Stelniec, HU Berlin 2010), zur morphologischen Reversion der RAS-ROSE Zellen (Abb. 11). Diese nahmen einen epithel-ähnlichen Phänotyp an und ähnelten ROSE 199 Zellen. Die Hemmung des PI3K-Signalweges mit dem Inhibitor LY294002 sowie der siRNA-vermittelte Knockdown von RALA hatten keinen Effekt auf die Morphologie (Abb. 11). Die transiente Ausschaltung von Slug, Snail und Twist konnte die Zellmorphologie ebenfalls nicht beeinflussen (Bilder nicht gezeigt).



**Abb. 11 Zellmorphologie nach RALA-Knockdown bzw. Hemmung des MAPK- und PI3K-Signalweges**

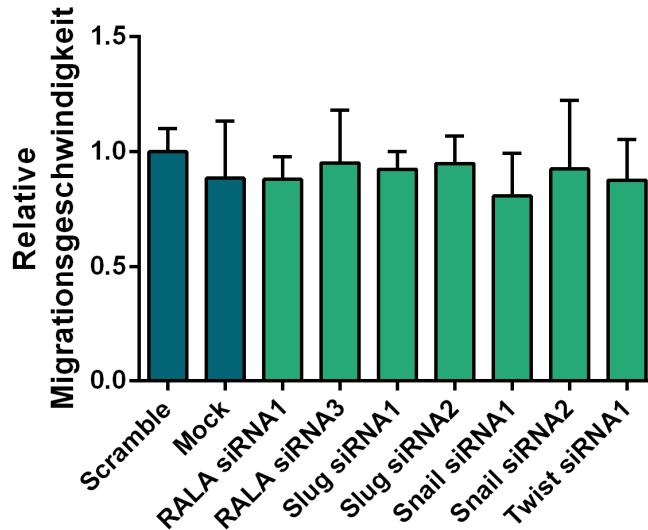
### **Fortsetzung zu Abb. 11**

Im Phasenkontrastmikroskop wurden die RAS-ROSE Zellen 48 h nach RALA-Knockdown bzw. spezifischer Inhibitorzugabe (Endkonzentration 10 µM) betrachtet und mit ROSE 199 Zellen verglichen. Mock: Kontrolle, mit Transfektionsreagenz behandelte RAS-ROSE Zellen. Scramble: Kontrolle, RAS-ROSE Zellen transfiziert mit Nonsense-siRNA. RALA-KD: RAS-ROSE Zellen nach Knockdown mit RALA-spezifischer siRNA. U0126: RAS-ROSE Zellen, behandelt mit dem MAPK-Inhibitor U0126. LY294002: RAS-ROSE Zellen, behandelt mit dem PI3K-Inhibitor LY294002. DMSO: Kontrolle, RAS-ROSE Zellen mit äquivalenter Menge des Lösungsmittels DMSO behandelt.

### **3.1.7 Einfluss von Slug, Snail, Twist und RALA auf die Migration**

Um den Einfluss von RALA und die durch RALA regulierten Transkriptionsfaktoren Slug, Snail und Twist auf die Migration zu erfassen, wurden Migrationsstudien mittels Wundheilungs-Assays durchgeführt (Liang et al. 2007). Hierzu wurden die Zellen mit spezifischer siRNA transfiziert und 48 h später untersucht. Die Knockdowns wurden mittels qPCR exemplarisch nachgewiesen. Um Migrationseffekte gezielt betrachten zu können, ist es wichtig, den Einfluss der Proliferation auszuschalten. Es ist bekannt, dass bei RAS-ROSE Zellen eine Reduktion des FCS-Anteils im Medium auf 1 % die Proliferation der Zellen ausreichend stoppt (Stelnic-Klotz et al. 2012). Nach Setzen einer Wunde in den konfluenten Zellrasen wurden bis zum Wundverschluss durch migrierende Zellen Fotos in regelmäßigen Abständen an einer im Voraus definierten Stelle gemacht. Über die Verringerung der Wundfläche pro Zeiteinheit konnten die Migrationsgeschwindigkeiten quantitativ ausgewertet werden (siehe 2.1.8). Die Normalisierung erfolgte auf RAS-ROSE Zellen, die mit Nonsense-siRNA (Scramble) transfiziert wurden.

Es konnte hierbei kein signifikanter Unterschied der Migrationsgeschwindigkeiten nach Knockdown von Slug, Snail oder Twist festgestellt werden (Abb. 12). Auch ein Knockdown von RALA konnte die Migration nicht signifikant beeinflussen.



**Abb. 12 Quantitative Auswertung der Migrationsgeschwindigkeiten in RAS-ROSE Zellen nach Knockdown von RALA, Slug, Snail und Twist**  
Wundheilungs-Assay. Mock: Kontrolle, mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen. Scramble: Kontrolle, Transfektion mit Nonsense-siRNA. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus fünf bis sechs biologischen Replikaten nach Normalisierung auf Scramble. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unter Verwendung des Post-Hoc Tests „Tukey“.

### 3.1.8 Einfluss kombinierter Signalweg-Hemmung auf die Migration

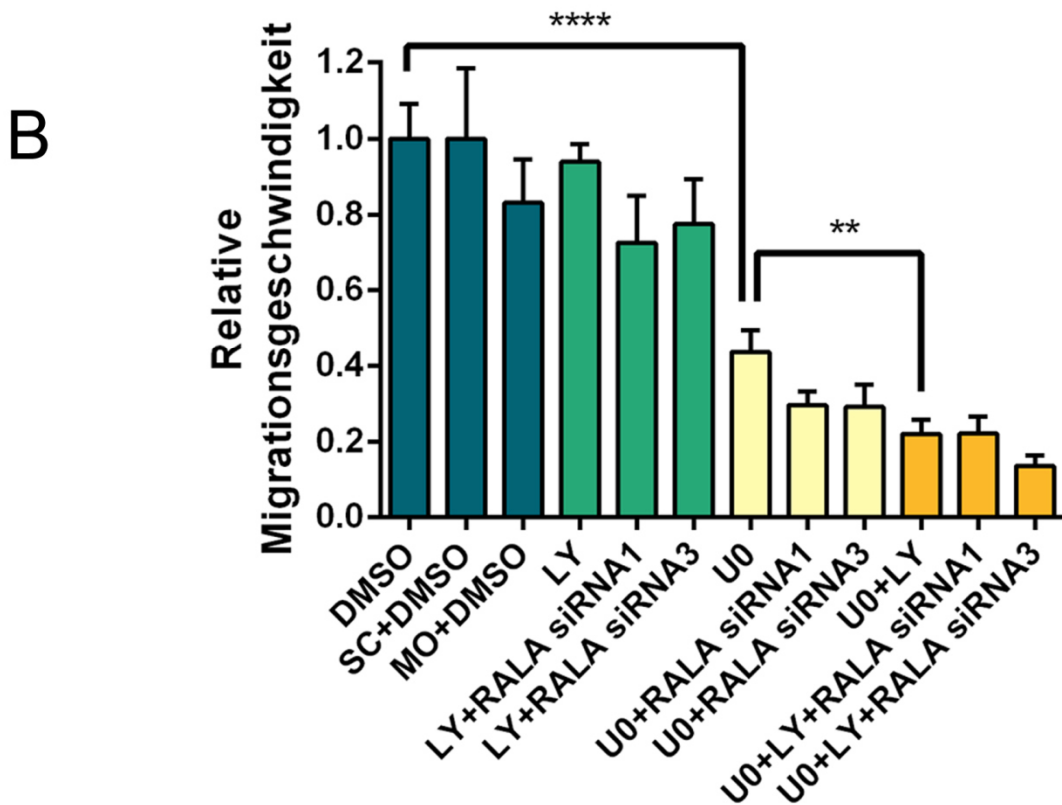
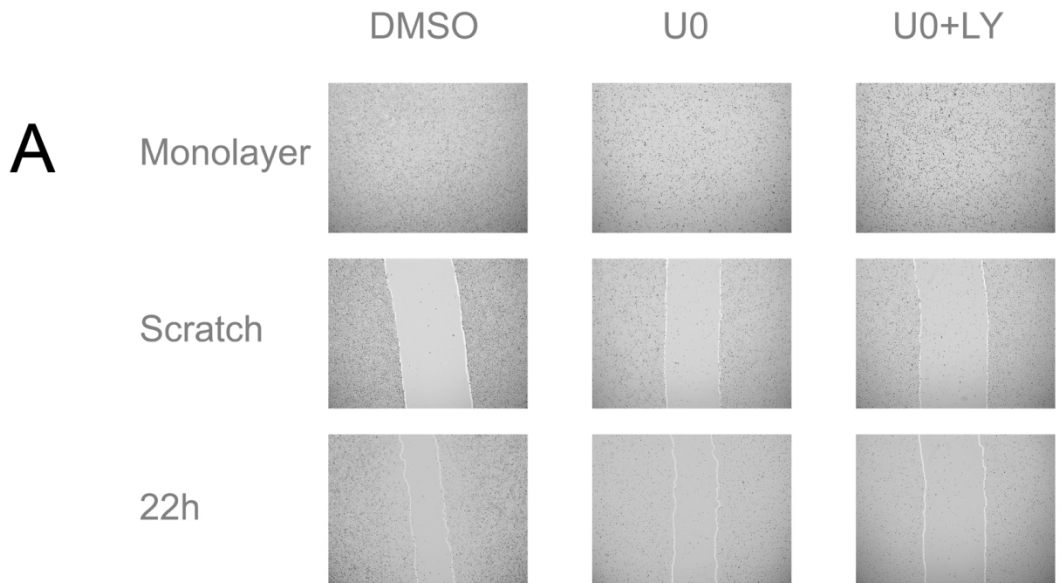
Aus Vorexperimenten der Arbeitsgruppe Molekulare Tumorpathologie (Prof. Schäfer) ging hervor, dass eine Hemmung des MAPK-Signalweges bei RAS-ROSE Zellen die Migrationsgeschwindigkeit verlangsamt, während die alleinige Hemmung des PI3K-Signalweges keinen Effekt auf die Migration hat. Diese Vorkenntnisse warfen die Frage auf, ob eine kombinierte Hemmung mehrerer Signalwege noch stärkere Effekte erzielen kann. Potenziell mögliche Crosstalks bzw. Rückkopplungsreaktionen, die zur stabilen Aufrechterhaltung der Signalwege beitragen, können durch die kombinierte Hemmung unterbrochen werden (Klinger et al. 2013).

Folgende Kombinationen wurden daher untersucht:

- (1) RALA-Knockdown + MAPK-Inhibition
- (2) RALA-Knockdown + PI3K-Inhibition
- (3) MAPK-Inhibition + PI3K-Inhibition
- (4) RALA Knockdown + MAPK-Inhibition + PI3K-Inhibition

Im Anschluss an die zweite Transfektion mit RALA-spezifischer siRNA wurden die Inhibitorsubstanzen U0126 (Hemmung der MAPK-Kaskade) und LY294002 (Hemmung der PI3-Kinase) hinzugegeben. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit Nonsense-siRNA (Scramble) transfiziert wurden und Zellen, die nur mit Transfektionsreagenz behandelt wurden (Mock). Hier wurde nach der zweiten Transfektion die entsprechende Menge des Lösungsmittels DMSO hinzugegeben. Bei Experimenten mit zwei Inhibitoren wurden beide Substanzen zeitgleich hinzupipettiert. Die DMSO-Lösungsmittelkontrolle wurde dementsprechend mengenmäßig angepasst. Mittels qPCR wurden die RALA-Knockdowns exemplarisch nachgewiesen. Die Migrationsgeschwindigkeiten wurden quantitativ ausgewertet (siehe 2.1.8) und auf die jeweilige Kontrolle normalisiert (Abb. 13). Die statistische Auswertung erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unter Verwendung des Post-Hoc Tests „Tukey“.

Die alleinige Hemmung des PI3K-Signalweges zeigte keinen statistisch nachweisbaren Effekt. Durch Hemmung des MAPK-Signalweges nahm die relative Migrationsgeschwindigkeit um 56 % ab (Signifikanzniveau  $p \leq 0,0001$ ). Eine kombinierte Hemmung des MAPK- und des PI3K-Signalweges senkte die relative Migrationsgeschwindigkeit um zusätzlich 22 % auf insgesamt 78 %. Der Unterschied zur alleinigen Hemmung des MAPK-Signalweges war mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,01$  statistisch signifikant. Zusätzliche RALA-Knockdowns konnten in keiner der untersuchten Kombinationen die Migration signifikant beeinflussen (Abb. 13).



**Abb. 13 Einfluss der kombinierten Hemmung mehrerer Signalwege auf die Migration der RAS-ROSE Zellen**

A: Repräsentative Bilder des Wundheilungs-Assays. Monolayer: Konfluenten Zellrasen vor Setzen der Wunde. Scratch: Setzen der Wunde und Waschschrift. 22 h: 22 h nach Setzen der Wunde. U0: Zellen behandelt mit MAPK-Inhibitor U0126. LY: Zellen behandelt mit PI3K-Inhibitor LY294002. DMSO: Zellen behandelt mit Lösungsmittel DMSO.



### **Fortsetzung zu Abb. 13**

B: Quantitative Auswertung. DMSO: Dient als Normalisierung für die mit Inhibitoren behandelten Zellen. SC+DMSO: Transfektion mit Nonsense-siRNA und nachfolgender Zugabe von DMSO; dient als Normalisierung für Zellen, die mit spezifischer siRNA und mit Inhibitoren behandelt wurden. MO+DMSO: Mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen und nachfolgender Zugabe von DMSO. LY: Zellen behandelt mit PI3K-Inhibitor LY294002. LY+RALA1,3: RALA-Knockdown (KD) mit zwei unabhängigen Duplexen und nachfolgender Zugabe von LY294002. U0: Zellen behandelt mit MAPK-Inhibitor U0126. U0+RALA1,3: RALA-KD mit zwei unabhängigen Duplexen und nachfolgender Zugabe von U0126. U0+LY: Zellen behandelt mit U0126 und LY294002. U0+LY+RALA1,3: RALA-KD mit zwei unabhängigen Duplexen und nachfolgender Zugabe von U0126 und LY294002. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus zwei bis vier biologischen Replikaten nach Normalisierung auf die jeweilige Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA) unter Verwendung des Post-Hoc Tests „Tukey“. \*\*\*\* Signifikanzniveau:  $p \leq 0,0001$ ; \*\* Signifikanzniveau:  $p \leq 0,01$

### **3.1.9 Zellzyklusanalysen**

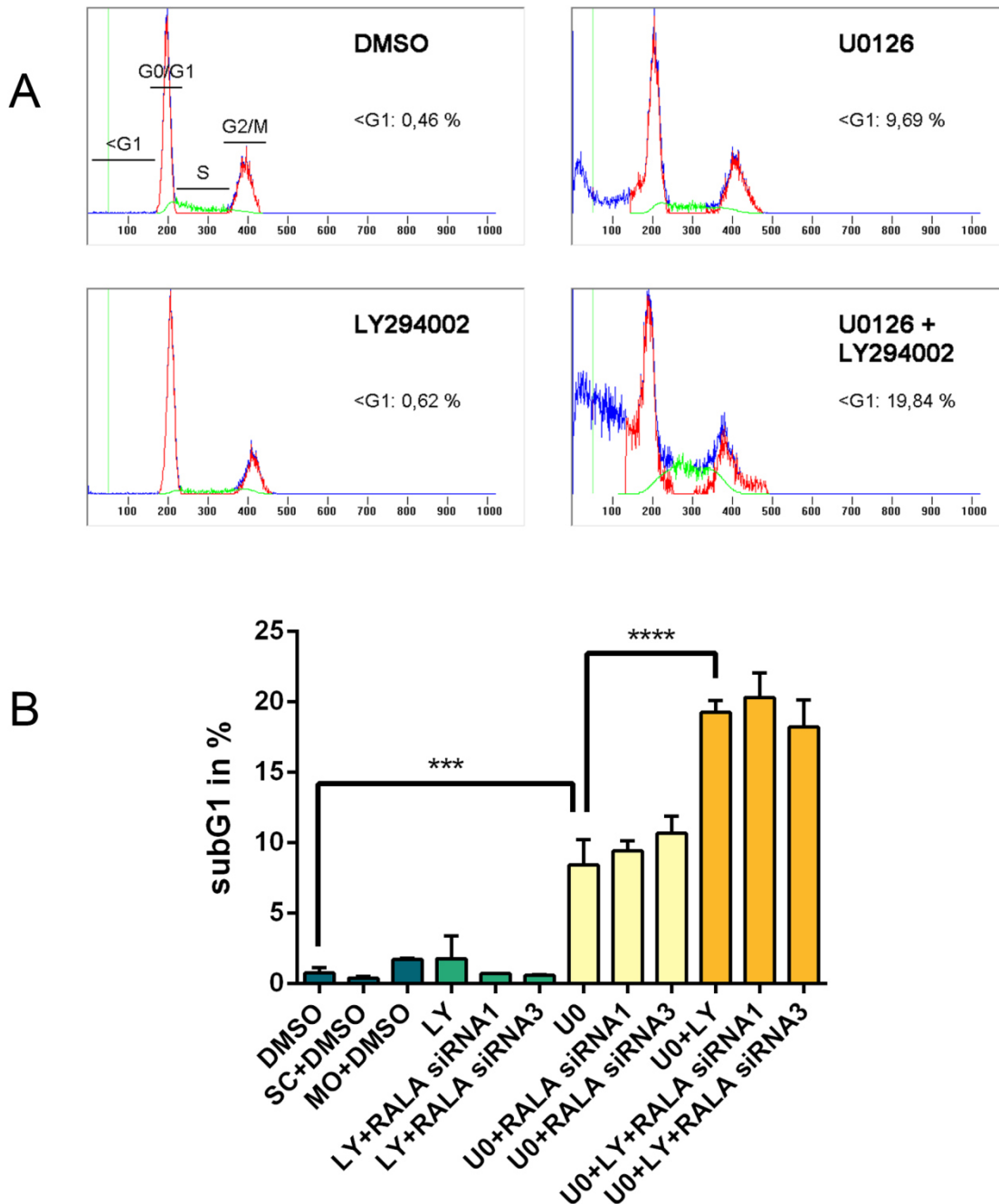
Bei den Migrations-Assays unter kombinatorischer Inhibitorbehandlung gab es morphologische Hinweise auf apoptotische Zellen, die möglicherweise das Ergebnis verfälschten. Daher wurden die Zellen nach Abschluss des Wundheilungs-Assays trypsiniert und Zellzyklusanalysen durchgeführt. Hierfür wurde der Farbstoff Propidiumiodid verwendet. Dieses Molekül interkaliert stöchiometrisch an doppelsträngige DNA. Anhand der detektierten Fluoreszenzsignale im Durchflusszytometer lassen sich die Zellen den einzelnen Zellzyklusphasen zuteilen. Der Zellzyklus wird in vier verschiedene Phasen unterteilt: G1-Phase (diploid, Chromosomensatz  $1n$ ), S-Phase (Synthese, Chromosomensatz zwischen  $1n$  und  $2n$ ), G2-Phase (tetraploid, Chromosomensatz  $2n$ ) sowie M-Phase (Mitose). Im subG1-Peak finden sich apoptotische Zellen, die aufgrund der DNA-Defragmentierung vor den diploiden Zellen erscheinen. Der prozentuale Anteil des subG1-Peaks an allen Zellen wird als Korrelat der Apoptoserate herangezogen (Vermes et al. 2000).

Aus zwei vorausgegangenen Wundheilungs-Assays wurden die Zellen gesammelt und der prozentuale subG1-Anteil am Zellzyklus ermittelt (Abb. 14).

Durch Hemmung des PI3K-Signalweges konnte keine signifikante Erhöhung des subG1-Anteils festgestellt werden. Dagegen erhöhte die Hemmung des MAPK-Signalweges den subG1-Anteil auf 8,4 % (Signifikanzniveau  $p \leq 0,001$ ). Eine kombinierte Hemmung des MAPK- sowie des PI3K-Signalweges führte zu einem subG1-Anteil von 19,2 %, wobei der Unterschied zur singulären MAPK-Hemmung

statistisch signifikant ist ( $p \leq 0,0001$ ). Ein zusätzlicher RALA-Knockdown konnte in keinem Experiment den subG1-Anteil signifikant erhöhen (Abb. 14).

Der stark erhöhte subG1-Anteil unter kombinierter MAPK- und PI3K-Hemmung deutet auf Apoptose-Effekte hin, was mit weiteren Methoden überprüft werden müsste (Vermes et al. 2000). Einschränkend ist anzumerken, dass für die durchgeführten FACS-Analysen ausschließlich Zellen nach Abschluss der Wundheilungs-Assays verwendet wurden. Diese Zellen waren während der Experimente einem besonders starken Stress ausgesetzt.



**Abb. 14 Zellzyklusanalysen der im Wundheilungs-Assay verwendeten Zellen**

**A:** Exemplarische Darstellung der FACS-Analysen. X-Achse: FL2-A = DNA-Gehalt. Y-Achse: Zellzahl. Rot: G0/G1- und G2/M-Peak. Grün: S-Phase. Blau: allgemeine Zellverteilung.

**B:** SubG1-Anteil in %. DMSO: RAS-ROSE Zellen behandelt mit Lösungsmittel DMSO. SC+DMSO: Transfektion mit Nonsense-siRNA und nachfolgender Zugabe von DMSO.

MO+DMSO: Mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen und nachfolgender Zugabe von DMSO. LY: Zellen behandelt mit PI3K-Inhibitor LY294002. LY+RALA1,3: RALA-Knockdown (KD) mit zwei unabhängigen Duplexen und nachfolgender Zugabe von LY294002. U0: Zellen behandelt mit MAPK-Inhibitor U0126. U0+RALA1,3: RALA-KD mit zwei unabhängigen Duplexen und nachfolgender Zugabe von U0126. U0+LY: Zellen behandelt mit U0126 und LY294002. U0+LY+RALA1,3: RALA-KD mit zwei unabhängigen Duplexen und nachfolgender Zugabe von U0126 und LY294002.

### Fortsetzung zu Abb. 14

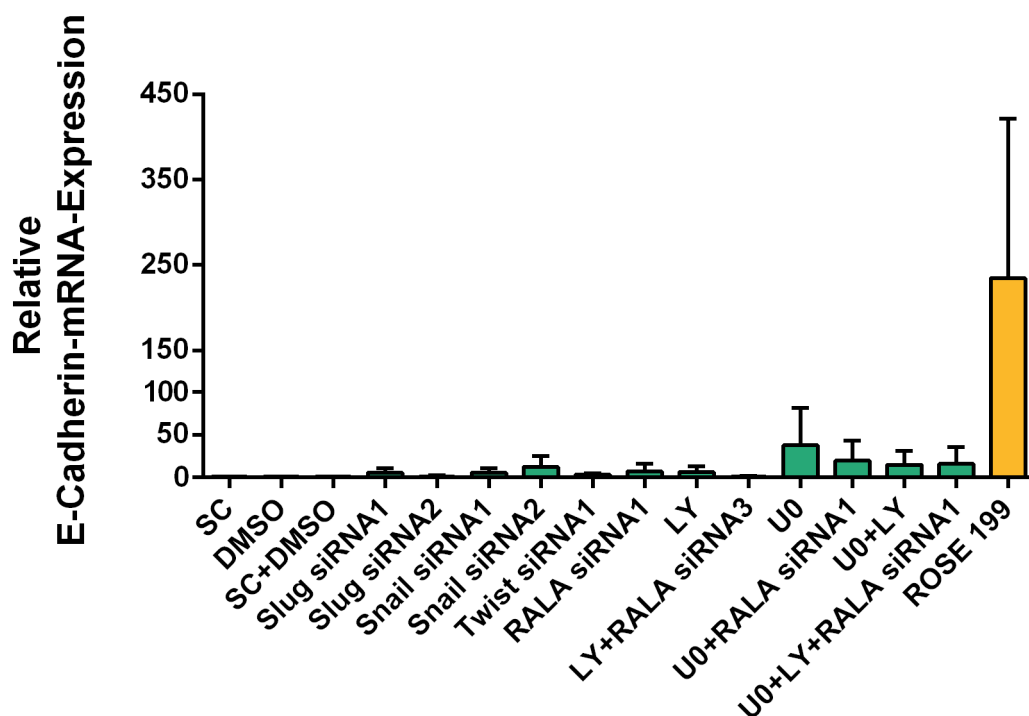
Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus zwei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unter Verwendung des Post-Hoc Tests „Tukey“.

\*\*\* Signifikanzniveau  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* Signifikanzniveau:  $p \leq 0,0001$

### 3.1.10 E-Cadherin-Expression nach Knockdown und Signalweg-Hemmung

Die EMT-Faktoren Slug, Snail und Twist sind als Inhibitoren des epithelialen Markers E-Cadherin bekannt (Thiery et al. 2009). In RAS-ROSE Zellen ist die E-Cadherin-Expression im Vergleich zu den nicht transformierten ROSE 199 Zellen deutlich reduziert (Tchernitsa et al. 2004).

Mittels qPCR wurde nun überprüft, ob durch Knockdown von Slug, Snail oder Twist eine Wiederherstellung des reduzierten E-Cadherin-Spiegels hervorgerufen wird. Dabei konnte jedoch keine relevante Veränderung der mRNA-Expression von E-Cadherin gemessen werden (Abb. 15). Auch durch RALA-Knockdown und der kombinierten Hemmung mehrerer Signalwege konnte keine deutliche Reversion gezeigt werden.



### Abb. 15 Relative E-Cadherin-mRNA-Expression

qPCR: In RAS-ROSE Zellen wurde nach Knockdown von Slug, Snail, Twist und RALA sowie nach Hemmung des MAPK- und PI3K-Signalweges die Expression von E-Cadherin untersucht und mit unbehandelten ROSE 199 Zellen verglichen. Die RNA-Extraktion erfolgte 48 h nach Knockdown bzw. Inhibitorzugabe.

**Fortsetzung zu Abb. 15**

SC: RAS-ROSE Zellen transfiziert mit Nonsense-siRNA (Scramble); dient als Normalisierung für Knockdowns von Slug, Snail, Twist und RALA. DMSO: RAS-ROSE Zellen, behandelt mit dem Lösungsmittel DMSO; dient als Normalisierung für die mit Inhibitoren behandelten Zellen. SC+DMSO: Transfektion mit Nonsense-siRNA und nachfolgender Zugabe von DMSO; dient als Normalisierung für Zellen, die mit spezifischer siRNA und mit Inhibitoren behandelt wurden. U0: Behandlung der Zellen mit dem MAPK-Inhibitor U0126. LY: Behandlung der Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus zwei biologischen Replikaten nach Normalisierung auf die jeweilige Kontrolle.

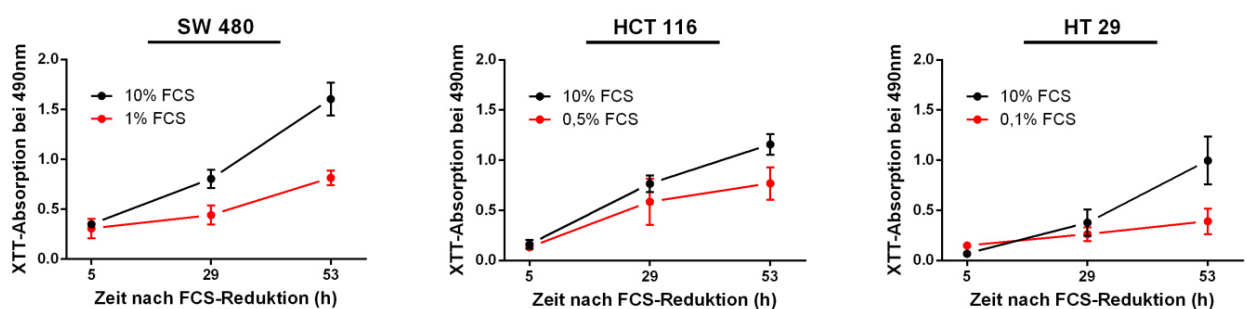
## 3.2 Kolon-Zellsystem

Die Rolle des RALA-Signalweges wurde in einem weiteren System, bestehend aus den drei humanen kolorektalen Tumorzelllinien SW 480, HCT 116 und HT 29, untersucht. Diese Zellen zeichnen sich u. a. durch einen unterschiedlichen KRAS- sowie BRAF-Mutationsstatus aus (siehe 1.6). Der RALA-Signalweg ist dabei in allen drei Zelllinien aktiv (Győrffy et al. 2015). Durch RALA-Knockdown konnte die ankerabhängige und die ankerunabhängige Proliferation der SW 480 und HCT 116 Zellen gestoppt werden (Győrffy et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob RALA auch die Migration der Tumorzellen beeinflusst.

### 3.2.1 Proliferationsmessungen zur Bestimmung der optimalen FCS-Konzentration

Um die Migrationseigenschaften der Zellen gezielt betrachten zu können, war es wichtig den Faktor Proliferation möglichst auszuschalten. Dazu wurde der FCS-Anteil im Nährmedium reduziert. Mittels XTT-Assay wurde bestimmt, bei welchen FCS-Konzentrationen die Proliferation der kolorektalen Zelllinien SW 480, HT 29 und HCT 116 ausreichend gestoppt wird. Die Absorptionsmessungen ergaben dabei eine optimale Hemmkonzentration von 1 % FCS bei SW 480, 0,5 % FCS bei HCT 116 sowie 0,1 % FCS bei HT 29 (Abb.16).



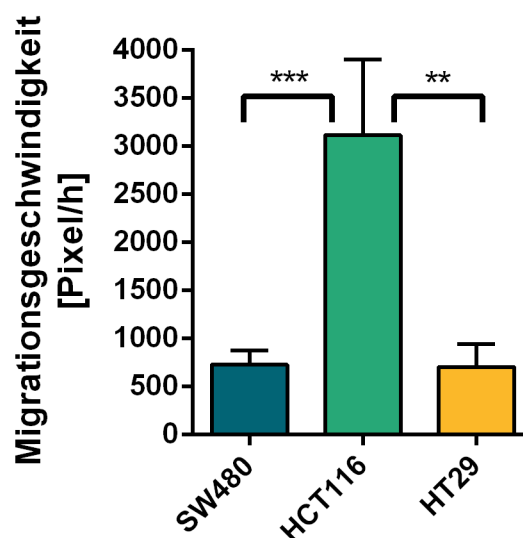
#### Abb. 16 Proliferationsmessung nach FCS-Reduktion

Die XTT-Zugabe erfolgte 1, 25 und 49 h nach FCS-Reduktion. Die Messung im ELISA-Reader erfolgte je 4 h nach der XTT-Zugabe zu den Zeitpunkten 5, 29 und 53 h. Die hier dargestellten Absorptionswerte entsprechen den Werten der Proliferation. Als Kontrolle dienten Zellen, die in D10-Medium (mit der Standardkonzentration von 10 % FCS) wuchsen. Die Grafiken sind exemplarische Darstellungen einer Optimierungsreihe. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten.

### 3.2.2 Migrationsgeschwindigkeiten der untersuchten Zelllinien

Die Migrationsgeschwindigkeiten der Zellen wurden mittels Wundheilungs-Assays untersucht (Liang et al. 2007). Nach Setzen einer Wunde wurden bis zu deren Wiederverschluss durch migrierende Zellen in regelmäßigen Abständen Fotos gemacht. Die Geschwindigkeiten ergeben sich aus der Verringerung der gemessenen Wundflächen pro Zeiteinheit (siehe 2.1.8).

Für die quantitative Analyse der Wundheilungs-Assays wurde die mittlere Migrationsgeschwindigkeit der Zellen berechnet und gegeneinander verglichen. Für SW 480 und HT 29 konnte eine durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von ca. 700 Pixel pro Stunde berechnet werden (Abb. 17). Bei HCT 116 ergibt sich mit durchschnittlich 3100 Pixel pro Stunde die schnellste Migrationsgeschwindigkeit der untersuchten Zellen. Damit migrieren diese Zellen mehr als viermal so schnell. Der Unterschied der Migrationsgeschwindigkeiten von HCT 116 Zellen zu SW 480 ( $p \leq 0,001$ ) sowie zu HT 29 ( $p \leq 0,01$ ) ist statistisch signifikant.

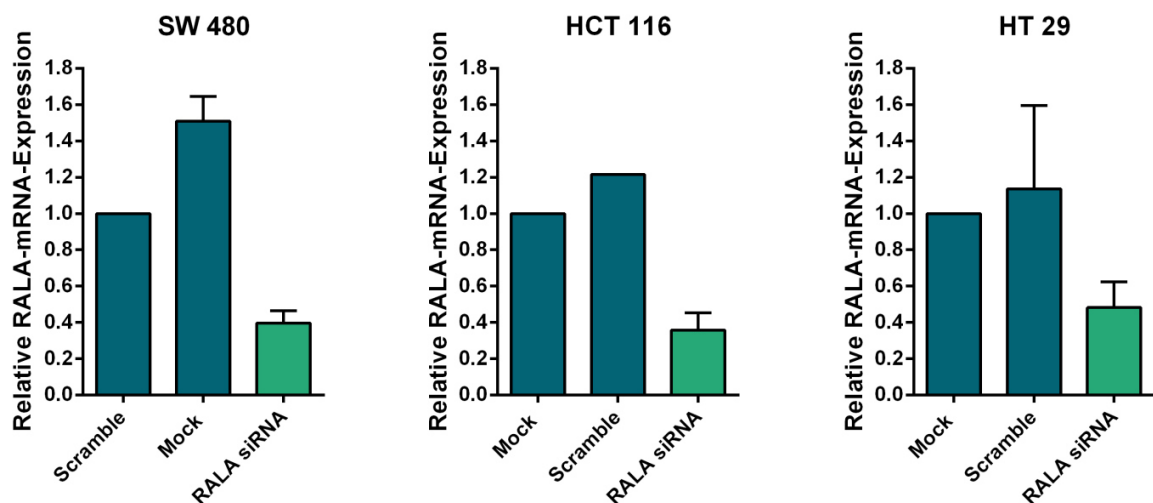


**Abb. 17 Migrationsgeschwindigkeiten der SW 480, HCT 116 und HT 29 Zellen**

Wundheilungs-Assay: Quantitative Auswertung der Migrationsgeschwindigkeiten in Pixel/h. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus fünf biologischen Replikaten bei SW 480, drei biologischen Replikaten bei HCT 116 und zwei biologischen Replikaten bei HT 29. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unter Verwendung des Post-Hoc Tests „Tukey“. \*\* Signifikanzniveau:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* Signifikanzniveau:  $p \leq 0,001$ .

### 3.2.3 Einfluss von RALA auf die Migration

Der Einfluss von RALA auf die Zellmigration wurde mithilfe RALA-spezifischer Knockdowns untersucht. Dazu wurden die Zellen 48 h nach der zweiten Transfektion mittels Wundheilungs-Assays untersucht. Der Nachweis der RALA-Knockdowns geschah mit der qPCR-Methode. Dabei konnte eine Knockdown-Effizienz von 60 % bei SW 480 Zellen, 64 % bei HCT 116 Zellen und 52 % bei HT 29 Zellen erreicht werden (Abb. 18).

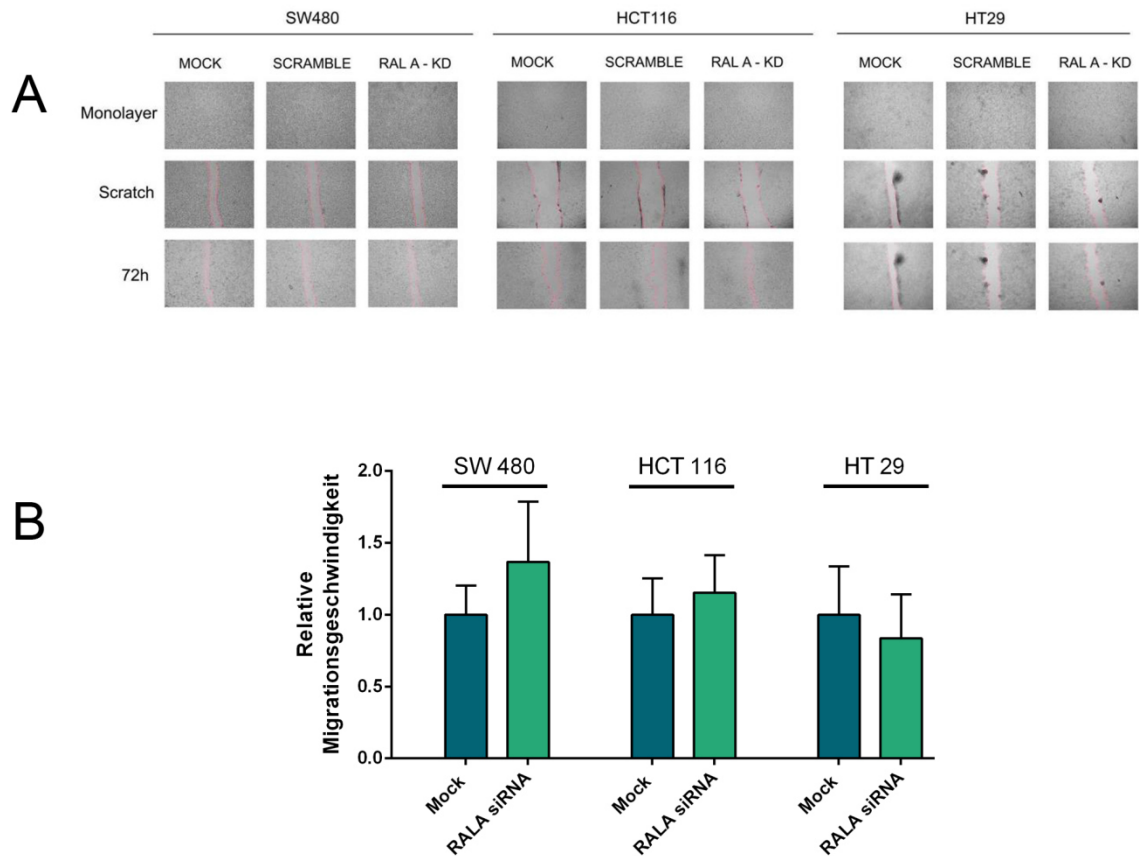


**Abb. 18 Effektivität des RALA-Knockdowns in SW 480, HCT 116 und HT 29 Zellen**

Relative RALA-mRNA-Expression 48 h nach transienter Ausschaltung. Mock: Kontrolle, mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen. Scramble: Kontrolle, Transfektion mit Nonsense-siRNA. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei bis vier biologischen Replikaten. Die Scramble-Kontrolle bei HCT 116 wurde im Rahmen eines unabhängigen Experimentes erhoben und auf die dazugehörige Mock-Kontrolle normalisiert.

Für die quantitative Auswertung der relativen Migrationsgeschwindigkeit nach Knockdown wurden die Ergebnisse der Wundheilungs-Assays auf die unbehandelte Kontrolle (Mock) der jeweiligen Zelllinie normalisiert (siehe 2.1.8). Der Vergleich der relativen Migrationsgeschwindigkeiten ergab keinen signifikanten Unterschied nach RALA-Knockdown bei allen drei untersuchten Zelllinien (Abb. 19).





**Abb. 19 Einfluss des RALA-Knockdowns auf die Migration der SW 480, HCT 116 und HT 29 Zellen**

**A: Repräsentative Bilder des Wundheilungs-Assays.** Monolayer: Aufnahme des konfluenten Zellrasens vor Setzen der Wunde. Scratch: Aufnahme nach Setzen der Wunde und Waschschrift. 72 h: Aufnahme 72 h nach Setzen der Wunde. Mock: Kontrolle, mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen. Scramble: Kontrolle, Transfektion mit Nonsense-siRNA. RALA-KD: Knockdown mit RALA-spezifischer siRNA. Keyence Mikroskop BZ8100, 4 x Objektiv.

**B: Quantitative Auswertung.** Die relative Migrationsgeschwindigkeit wurde nach Normalisierung auf Mock berechnet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus fünf (SW 480), drei (HCT 116) und zwei (HT 29) biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem zweiseitigen t-Test.

## **4 Diskussion**

Die Metastasierung von Tumoren ist der entscheidende Faktor für den weiteren Krankheitsverlauf und die Prognose vieler Patienten (Ramaswamy et al. 2003). Ziel ist es daher, diesen Prozess schon in der frühen Entstehung zu blockieren. Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) gilt für viele Tumoren als Voraussetzung zur Invasion und Metastasierung (Polyak und Weinberg 2009). Eine wesentliche Eigenschaft der EMT ist neben der veränderten Zellmorphologie die Fähigkeit zur verstärkten Migration, welche in dieser Arbeit mithilfe von in vitro Wundheilungs-Assays untersucht wurde. An zwei verschiedenen Zellsystemen, einem KRAS-getriebenen Ovarialepithel-Modell sowie dem Kolon-Zellmodell, wurde der Einfluss verschiedener Signalwege und Transkriptionsfaktoren auf die EMT untersucht. Insbesondere wurde dabei die Rolle des RALA-Signalweges betrachtet. Im Gegensatz zu den gut untersuchten MAPK- und PI3K-Signalwegen ist dieses Signalsystem noch wenig erforscht.

### **4.1 RALA aktiviert Slug, Snail und Twist in RAS-ROSE Zellen**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der RALA-Signalweg in RAS-ROSE Zellen infolge der KRAS-Onkogenexpression aktiviert wird (Abb. 5). Die Hochregulation der EMT-Transkriptionsfaktoren Slug, Snail und Twist wird dabei durch RALA wesentlich beeinflusst (Abb. 7).

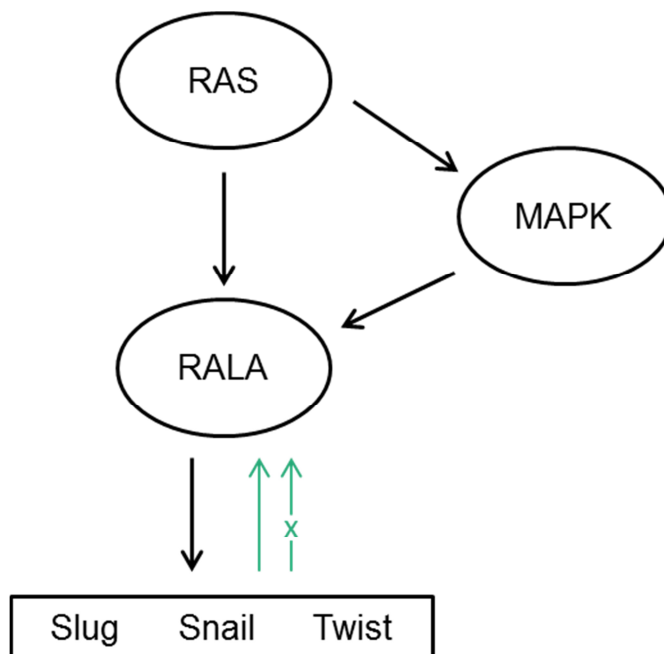
Untersuchungen an Zellen aus malignen peripheren Nervenscheidentumoren zeigten, dass auch dort der RALA-Signalweg für die Hochregulation des Transkriptionsfaktors Snail verantwortlich ist (Bodempudi et al. 2009). Eine Veränderung der Slug-Expression nach RALA-Knockdown wurde in dieser Studie allerdings nicht beobachtet. Die Regulation von Twist durch den RALA-Signalweg wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Interessanterweise führte die transiente Ausschaltung von Slug, Snail oder Twist in RAS-ROSE Zellen jeweils zu einer reduzierten Expression von RALA-mRNA. Dies deutet auf einen möglichen positiven transkriptionellen Rückkopplungsmechanismus zwischen RALA und den untersuchten EMT-Transkriptionsfaktoren hin. Dieser Regulationsmechanismus könnte entweder direkt durch Slug, Snail oder Twist geschehen oder mithilfe eines noch unbekanntem Faktors oder Prozesses vermittelt

werden (in Abb. 20 mit x gekennzeichnet). Da dieses Experiment nur einmal durchgeführt wurde, bedarf es noch weiterer Wiederholungen sowie zusätzlicher Untersuchungen auf Proteinebene, um die Effekte abschließend zu klären.

Nach Hemmung des MAPK-Signalweges in RAS-ROSE Zellen zeigte sich in der qPCR eine Reduktion der RALA-mRNA-Expression. Dies deutet auf eine Aufrechterhaltung des RALA-Signalweges durch die MAPK-Kaskade hin. Durch Aktivierung von RAS könnte somit der RALA-Signalweg nicht nur direkt über RAL-GEFs (Neel et al. 2011), sondern auch gleichzeitig über Querverbindungen (Crosstalks) der MAPK-Kaskade aktiviert werden, was ihn möglicherweise besonders robust macht.

Insgesamt lässt sich auf das in Abbildung 20 gezeigte Regulationsmodell schließen.



**Abb. 20 RALA-abhängige Aktivierung und Regulation von Slug, Snail und Twist in RAS-ROSE Zellen**

Grün dargestellt sind mögliche Rückkopplungsmechanismen. X: Denkbarer Zwischenschritt.

Die Hemmung der MAPK-Kaskade bewirkte eine starke Überexpression von Snail und Twist. Für den Transkriptionsfaktor Slug zeigte die MAPK-Hemmung hingegen keine eindeutigen Effekte. Auch nach Inhibition der PI3-Kinase konnte eine Überexpression von Twist gemessen werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Aktivierung von Slug und Twist durch die MAPK- sowie die PI3K-Signalwege (Hao et al. 2012; Yang und Weinberg 2008; Yang et al. 2014). Diese

Diskrepanzen sowie die beobachtete hohe biologische Variabilität der mRNA-Expression von RALA, Slug, Snail und Twist nach Hemmung des MAPK- bzw. PI3K-Signalweges könnten durch Anpassungsreaktionen der Zelle zu erklären sein. Außerdem ist anzumerken, dass die Experimente nur auf transkriptioneller Ebene durchgeführt wurden. Da diese Untersuchungen nur eine Momentaufnahme der Zelle beschreiben und sich Transkriptomänderungen nicht immer direkt auf das Proteom auswirken, sind zur weiteren Abklärung Western Blot-Analysen notwendig. Auch stabile Knockdowns mit shRNA („small hairpin RNA“) könnten für weitere Experimente angewendet werden (Moore et al. 2010).

#### **4.2 Kombinierte Signalweg-Ausschaltung führt zum effektiven Migrationsstopp in RAS-ROSE Zellen**

Ein transienter Knockdown von Slug, Snail oder Twist führte zu keiner Reversion des mesenchymalen Phänotyps der RAS-ROSE Zellen. Auch in den Wundheilungs-Assays konnte keine Hemmung der Migration beobachtet werden. Die transiente Ausschaltung des RALA-Signalweges, die, wie oben beschrieben, zur gemeinsamen Herabsetzung der Slug-, Snail- und Twist-Expression führt, konnte ebenfalls weder den Phänotyp noch die Zellmigration beeinflussen.

Die wichtige Rolle des MAPK-Signalweges an der Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps ist bereits bekannt (Tchernitsa et al. 2004). Die Inhibierung von MEK bewirkt eine Rückbildung des Phänotyps hin zu epithel-ähnlicher Morphologie der nicht transformierten ROSE 199 Zellen (Tchernitsa et al. 2004). In Northern Blots konnte dabei aber keine Reversion des E-Cadherin-Spiegels nachgewiesen werden. Aus Vorexperimenten der Arbeitsgruppe Molekulare Tumorphologie (Prof. Schäfer) ging hervor, dass die Migration der RAS-ROSE Zellen nach Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126 verlangsamt ist, jedoch nicht vollständig gestoppt wird. Eine Ausschaltung des PI3K-Signalweges hatte keinen Einfluss auf die Migration.

Dies warf die Frage auf, welche Effekte durch eine kombinierte Ausschaltung von Signalwegen zu erwarten sind. Für die therapeutische Anwendung ist die parallele Ausschaltung mehrerer Signalwege bereits ins Interesse gerückt (Baines et al. 2011). Einige Kombinationstherapien von Hemmstoffen der MAPK- sowie der PI3K-Kaskade werden derzeit in klinischen Studien erprobt (Britten 2013). Von der gemeinsamen

Blockade dieser beiden RAS-abhängigen Signalwege verspricht man sich höhere Ansprechraten und weniger Resistenzen (Atefi et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob eine kombinierte Ausschaltung mehrerer Signalketten die beschriebenen Effekte nach MAPK-Hemmung steigern kann. Die Migration der RAS-ROSE Zellen wurde durch kombinierte Hemmung des MAPK- mit dem PI3K-Signalweg signifikant verlangsamt. Phänotypisch waren die Zellen von ausschließlich mit MEK-Inhibitor behandelten Zellen nicht zu unterscheiden. Eine zusätzliche RALA-Hemmung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Migration. Diese Untersuchungen zeigen, dass zur gezielten Hemmung der Zellmigration die Kombination von MAPK- mit PI3K- Inhibitoren besonders effektiv ist. Vermutlich werden hierbei Rückkopplungsreaktionen bzw. Crosstalks zwischen diesen beiden Signalwegen unterbrochen (Klinger und Bluthgen 2014).

Interessanterweise konnte in keiner der untersuchten Inhibitor-Kombinationen eine Reversion des E-Cadherin-Spiegels erreicht werden. Dies zeigt, wie robust die EMT ist und dass außer den drei untersuchten Signalwegen noch weitere Faktoren an der E-Cadherin-Suppression beteiligt sind. So spielt z. B. der Transkriptionsfaktor Zeb1 („Zinc finger E-box binding homeobox 1“) in zahlreichen Tumorentitäten eine wichtige regulatorische Rolle bei der EMT (Brabletz und Brabletz 2010).

Die stabile Aufrechterhaltung der EMT erklärt sich möglicherweise durch zahlreiche Interaktionen der beteiligten Signalwege (Lindsey und Langhans 2014). Da die EMT auch durch epigenetische Prozesse wie die Methylierung bestimmter Genabschnitte beeinflusst wird, könnte die Supprimierung der E-Cadherin-Expression auch darauf beruhen (Bedi et al. 2014; Dumont et al. 2008).

In einer Studie an Mammakarzinom-Zellen mit hoher RAS-Aktivität konnte gezeigt werden, dass die Wiederherstellung von E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Interaktionen nur gelang, wenn neben einer Hemmung des MAPK-Weges zusätzlich E-Cadherin forciert exprimiert wird (Li und Mattingly 2008). Die Entwicklung von Therapeutika, die zur Wiederherstellung des E-Cadherin-Spiegels und zur Unterbrechung der EMT führen, ist daher konzeptionell vielversprechend, aber bisher wenig erfolgreich (Kothari et al. 2014; Li und Li 2015).

### **4.3 RALA trägt nicht zur Migration von kolorektalen Tumorzellen bei**

Der RALA-Signalweg ist in den humanen kolorektalen Karzinom-Zelllinien HCT 116, SW 480 und HT 29 aktiv (Győrffy et al. 2015). Die Migrationseigenschaften der Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Wundheilungs-Assays untersucht. Diese beim ROSE-Modell schon bekannte Methode wurde für die kolorektalen Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit neu etabliert.

Bei den drei untersuchten Zelllinien ergaben sich große Unterschiede bezüglich ihrer Migrationsgeschwindigkeiten. HCT 116 Zellen mit KRAS-Mutation in Codon 13 zeigten die schnellste Migrationsgeschwindigkeit. SW 480 Zellen mit KRAS-Mutation in Codon 12 sowie die BRAF-mutierten HT 29 Zellen zeigten eine im Vergleich deutlich niedrigere Migrationsgeschwindigkeit. Interessanterweise gibt es auch mutationsabhängige Unterschiede im klinischen Outcome bei Patienten mit kolorektalen Tumoren, die eine KRAS-Mutation tragen. Eine KRAS-Mutation in Codon 13 ist im Vergleich zu Codon 12 mit einer höheren Metastasierungsrate und einer schlechteren Prognose assoziiert (Bazan et al. 2002; Modest et al. 2011).

Nach transienter Ausschaltung von RALA ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Migrationsgeschwindigkeit. Anscheinend steuert der RALA-Signalweg in diesen Zellen nicht die Migration. An der ankerabhängigen und ankerunabhängigen Proliferation der SW 480 und HCT 116 Zellen ist der RALA-Signalweg allerdings beteiligt (Győrffy et al. 2015).

### **4.4 Schlussfolgerung**

Der RALA-Signalweg trägt in RAS-ROSE Zellen zur Hochregulation der E-Cadherin-Suppressoren Slug, Snail und Twist bei. Die Ausschaltung von Slug, Snail und Twist genügt jedoch nicht zur Reversion der EMT. Die niedrige E-Cadherin-Expressionsrate auch nach Hemmung mehrerer Signalwege zeigt, dass die stabile Aufrechterhaltung der EMT einem komplexen Regulationssystem unterliegt. Möglicherweise spielen dabei auch weitere RAS-abhängige Signalwege eine Rolle.

Da RALA weder in RAS-ROSE Zellen noch in den kolorektalen Zelllinien zur Migration beiträgt, sollte erforscht werden, ob hier die Isoform RALB nicht doch eine bedeutendere Rolle spielt als angenommen.

## 5 Ausblick

### 5.1 Die Isoformen RALA und RALB im organspezifischen Kontext

Mehrere Studien konnten je nach Organsystem unterschiedliche Rollen für RALA und RALB bezüglich ihrer Notwendigkeit für die Zellmigration belegen. So scheint bei Pankreaskarzinomzellen außer RALA auch RALB für die Migration verantwortlich zu sein, und zwar mit einem weitaus größeren Effekt (Lim et al. 2006).

Auch bei Blasenkarzinomzellen scheint RALB die entscheidende Rolle für die Migration zuzukommen (Oxford et al. 2005). Interessanterweise hatte in diesen Zellen ein kombinierter Knockdown von RALA und RALB keinen Effekt auf die Migration. Daraus zogen die Autoren den Schluss, dass RALA und RALB antagonistische Funktionen in Bezug auf die Migration haben. Ähnliche Ergebnisse konnten in vivo Experimente an Hamstern belegen, an denen das Metastasierungsverhalten nach Injektion von Fibroblasten mit konstitutiv erhöhtem RALA- bzw. RALB-Level untersucht wurde (Rybko et al. 2011). Zwar konnte RALA-Expression hier die Metastasierungsrate steigern, RALB-Expression sorgte aber für einen dreifach so starken Effekt. Zellen in denen RALA und RALB gemeinsam konstitutiv überexprimiert wurden, zeigten hingegen ein deutlich geringeres Metastasierungsverhalten in Analogie zu den bei Oxford et al. gezeigten Ergebnissen.

Experimente in einem Modell für Plattenepithelkarzinome weisen auf eine migrationshemmende Rolle von RALA in diesem Zellsystem hin. So zeigen RAS-transformierte Keratinozyten verstärkt invasives Verhalten nach RALA-Knockdown. In diesem Modell scheint RALA als Tumorsuppressor zu fungieren (Sowalsky et al. 2010).

Die organspezifischen Unterschiede sowie die unterschiedlichen Funktionen der beiden RAL-Isoformen werfen Fragen nach der dahinterstehenden Regulation auf. Zahlreiche posttranskriptionelle Änderungen können die Funktion der RAL-Proteine beeinflussen (Cascone et al. 2008; Neel et al. 2011). So ist bekannt, dass RALA und RALB jeweils durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert werden, was die unterschiedlichen Rollen der RAL-Proteine erklären könnte (Sablina et al. 2007; Wang et al. 2010). Auch ist denkbar, dass sich die Effektor-Kaskade von RALA und RALB organspezifisch unterscheidet oder es für die jeweilige RAL-Isoform spezifische Effektoren gibt, die noch

unentdeckt sind (Gentry et al. 2014). Möglicherweise ist auch der Zeitpunkt der Aktivierung der RAL-GTPasen und der damit verbundene Zeitraum zur Ausbildung von Anpassungsreaktionen entscheidend für die Funktion in der Zelle.

Auch die Regulation durch microRNA spielt bei der Aktivierung der RAL-Signalwege eine wichtige Rolle. In einer chronisch myeloischen Leukämie-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass miR-181a die Expression von RALA-mRNA sowie die Proteinexpression herunterreguliert (Fei et al. 2012).

Vor einem möglichen therapeutischen Einsatz von Inhibitoren der RAL-Kaskade ist daher ein deutlich umfassenderes Verständnis ihrer biologischen Funktionen notwendig. Dabei muss auch noch ausführlicher erforscht werden, über welche Wege es zu einer Aktivierung der RAL-Signalkaskade kommen kann. Nicht immer geschieht die Aktivierung von RAL in Abhängigkeit von RAS-Proteinen (Song et al. 2013; Suzuki et al. 2000). So konnte beispielsweise in verschiedenen Melanomzellen mit Wild-Typ-RAS und onkogenem BRAF eine erhöhte RALA-Aktivität nachgewiesen werden (Zipfel et al. 2010). Auch bei der in dieser Arbeit verwendeten kolorektalen Karzinomzelllinie HT 29 mit BRAF V600E Mutation ist der RALA-Signalweg aktiv (Györfly et al. 2015). Die Aktivierung des RALA-Signalweges könnte hierbei durch autokrine Stimulation des EGF-Rezeptors erklärt werden (Roberts und Der 2007).

Eine wesentliche Rolle für den Aktivitätszustand der RAL-Proteine konnte für die sog. „GTPase-activating proteins“ (RAL-GAPs) gezeigt werden. RAL-GAPs katalysieren normalerweise die Hydrolyse von GTP zu GDP und sind damit an der Inaktivierung von RALA und RALB beteiligt (Shirakawa et al. 2009). In Blasenkarzinomzellen ist die verminderte Expression der RAL-GAP $\alpha$ 2-Untereinheit für die erhöhte Aktivität der RAL-Proteine verantwortlich (Saito et al. 2013). Dies führte zu verstärkter Invasivität der Zellen.

## **5.2 Therapeutische Möglichkeiten zur Blockade der RAL-Signalkaskade**

Die intensive Erforschung von RAS-abhängigen Signalkaskaden hat zur Entwicklung von Inhibitoren und Antikörpern geführt, die bereits Eingang in die medikamentöse Tumorthherapie gefunden haben (Mattingly 2013). In die Blockade der RAL-Signalkaskade werden nun ebenfalls große Hoffnungen gesetzt, auch wenn die



biologischen Funktionen von RALA und RALB noch nicht ausreichend geklärt sind. Da die RAL-Proteine ähnlich wie die RAS-Proteine aufgrund der hohen GTP-Affinität schwer zu inhibieren sind, liegt der Fokus bisher vor allem auf einer indirekten Unterdrückung der Signalweiterleitung (Cooper et al. 2013; Neel et al. 2011).

Die posttranslationale Prenylierung verschiedener onkogener Proteine mit Lipidresten ist entscheidend für die Assoziation mit der Plasmamembran und die damit verbundene Funktion (Berndt et al. 2011). Geranylgeranyltransferase-I-Inhibitoren können die Lokalisation der RAL-Proteine an der Plasmamembran verhindern und dadurch deren onkogene Aktivität teilweise vermindern (Falsetti et al. 2007). Allerdings wirken sie nicht spezifisch auf die RAL-Proteine und verhindern auch die Prenylierung anderer Substrate (Baines et al. 2011).

Die Aktivität der RAL-Proteine kann, wie viele andere Proteine auch, durch Phosphorylierungsvorgänge beeinflusst werden. Die Phosphorylierung durch die Kinase Aurora A führt zur Aktivierung von RALA, zu dessen Translokation von der Plasmamembran und Aktivierung des Effektors RALBP1 (Lim et al. 2010). Inhibitoren der Aurora Kinase A befinden sich derzeit in klinischen Studien. Die Phosphorylierung von RALB durch die Proteinkinase C (PKC) scheint für das Wachstum und die Metastasierung von Blasenkarzinomzellen verantwortlich zu sein (Wang et al. 2010). Daher ist auch das Ausschalten der PKC ein denkbarer Angriffspunkt. Eine weitere wichtige Rolle für die Aktivität der RAL-GTPasen spielen die sog. Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) (Feldmann et al. 2010). Der CDK5-Inhibitor Dinaciclib konnte in Pankreaskarzinomzellen die RALA-Aktivität senken und das Tumorwachstum in vivo verlangsamen (Feldmann et al. 2011).

Die RAL-GAPs stellen ebenfalls eine Möglichkeit zur Beeinflussung des RAL-Aktivitätsgrades dar (Saito et al. 2013). Da RAL-GAPs die Aktivität der RAL-Proteine reduzieren, wären hier therapeutische Analoga denkbar.

Als weitere therapeutische Angriffspunkte könnten die zahlreichen Effektoren der RAL-Kaskade dienen. Die Ausschaltung des gemeinsamen RALA- und RALB-Effektors RALBP1, welcher eine wesentliche Rolle bei der Zellmigration spielt, wäre vorstellbar (Wu et al. 2010).

Zur zielgerichteten Therapie gegen Signalproteine ist die RNA-Interferenztechnik ein schwer umsetzbarer, aber vielversprechender Ansatz (Ozcan et al. 2015). Derzeit wird in klinischen Studien der Einsatz von RNA-Therapeutika in der Tumorbehandlung erprobt (Burnett und Rossi 2012). Vor allem der Transport zur Zelle und der schnelle Abbau der RNA-Therapeutika stellen bei dieser Behandlungsform die größten Herausforderungen dar (Ozcan et al. 2015).

Möglicherweise wird es auch in Zukunft gelingen, kleine GTPasen wie RAS oder RAL therapeutisch zu inhibieren (Thompson 2013; Yan et al. 2014). Bei der Ausschaltung der RAL-Proteine bleibt aufgrund der unterschiedlichen biologischen Funktionen abzuwarten, ob Isoform-spezifische Inhibitoren oder pan-RAL-Therapeutika erfolgreich sein werden (Martin et al. 2011).

## 6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<G1	subG1
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Akt	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
APS	Ammoniumpersulfat
biolog.	biologisch
BRAF	V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BSA	Bovine serum albumin = Rinderalbumin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	Zu mRNA komplementäre DNA
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FACS	Fluorescence-activated cell sorting = Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosindiphosphat

GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
Knockdown	Durch RNA-Interferenz verminderte Genexpression
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LY294002	PI3K-spezifischer Inhibitor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
min	Minute
miRNA	microRNA
MM	Magermilch
Mock	Mit Transfektionsreagenz behandelte Kontrollzellen
mRNA	Messenger-RNA
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
Pulldown	Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
RALA	V-ral simian leukemia viral oncogene homolog A
RALB	V-ral simian leukemia viral oncogene homolog B

RALBP1	Ral Binding Protein 1
RAS	Rat sarcoma
RAS-ROSE	ROSE A2/5 Zellen
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROSE A2/5	KRAS-transformierte Derivate von ROSE 199 Zellen [=RAS-ROSE]
ROSE	Rat ovarian surface epithelial cells
RT	Raumtemperatur
Sc	Scramble, siRNA mit Nonsense-Sequenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
Slug	Snail2
Snail	Snail1
Tab.	Tabelle
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
Twist	Twist1
U	Unit
U0126	MEK1/2-spezifischer Inhibitor
ÜN	Über Nacht
Wnt	Wingless-related integration site
x g	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung (Zentrifugation)
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid – Natriumsalz
Zeb1	Zinc finger E-box binding homeobox 1

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	RAS-Signalsystem	Seite 7
Abb. 2	Übersicht über häufig verwendete EMT-Marker	Seite 11
Abb. 3	Expression der EMT-Marker im ROSE-Zellsystem	Seite 13
Abb. 4	Schema des RALA-Aktivitätstests	Seite 25
Abb. 5	RALA-Aktivität im ROSE-Zellsystem	Seite 33
Abb. 6	Effektivität des RALA-Knockdowns in RAS-ROSE Zellen	Seite 35
Abb. 7	Relative Slug-, Snail- und Twist-mRNA-Expression 48 h nach RALA-Knockdown in RAS-ROSE Zellen, verglichen mit unbehandelten ROSE 199 Zellen	Seite 36
Abb. 8	Relative Slug-, Snail- und Twist-mRNA-Expression 48 h nach spezifischer Inhibitor-Behandlung der RAS-ROSE Zellen	Seite 37
Abb. 9	Relative RALA-mRNA-Expression 48 h nach spezifischer Inhibitor-Behandlung der RAS-ROSE Zellen	Seite 38
Abb. 10	Slug-, Snail- und Twist-Knockdowns in RAS-ROSE Zellen	Seite 40
Abb. 11	Zellmorphologie nach RALA-Knockdown bzw. Hemmung des MAPK- und PI3K-Signalweges	Seite 41
Abb. 12	Quantitative Auswertung der Migrationsgeschwindigkeiten in RAS-ROSE Zellen nach Knockdown von RALA, Slug, Snail und Twist	Seite 43
Abb. 13	Einfluss der kombinierten Hemmung mehrerer Signalwege auf die Migration der RAS-ROSE Zellen	Seite 45
Abb. 14	Zellzyklusanalysen der im Wundheilungs-Assay verwendeten Zellen	Seite 48

Abb. 15	Relative E-Cadherin-mRNA-Expression	Seite 49
Abb. 16	Proliferationsmessung nach FCS-Reduktion	Seite 51
Abb. 17	Migrationsgeschwindigkeiten der SW 480, HCT 116 und HT 29 Zellen	Seite 52
Abb. 18	Effektivität des RALA-Knockdowns in SW 480, HCT 116 und HT 29 Zellen	Seite 53
Abb. 19	Einfluss des RALA-Knockdowns auf die Migration der SW 480, HCT 116 und HT 29 Zellen	Seite 54
Abb. 20	RALA-abhängige Aktivierung und Regulation von Slug, Snail und Twist in RAS-ROSE Zellen	Seite 56
Tab. 1	Kolorektale Karzinomzelllinien und ihr Mutationsstatus	Seite 14

## 8 Literaturverzeichnis

- Acloque H, Thiery JP, Nieto MA. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Rep* 2008;9:322-326.
- Adams AT, Auersperg N. A cell line, ROSE 199, derived from normal rat ovarian surface epithelium. *Exp Cell Biol* 1985;53:181-188.
- Atefi M, von EE, Attar N, Ng C, Chu C, Guo D, Nazarian R, Chmielowski B, Glaspy JA, Comin-Anduix B, Mischel PS, Lo RS, Ribas A. Reversing melanoma cross-resistance to BRAF and MEK inhibitors by co-targeting the AKT/mTOR pathway. *PLoS One* 2011;6:e28973.
- Baines AT, Xu D, Der CJ. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med Chem* 2011;3:1787-1808.
- Bedi U, Mishra VK, Wasilewski D, Scheel C, Johnsen SA. Epigenetic plasticity: a central regulator of epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Oncotarget* 2014;5:2016-2029.
- Benlloch S, Paya A, Alenda C, Bessa X, Andreu M, Jover R, Castells A, Llor X, Aranda FI, Massuti B. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *J Mol Diagn* 2006;8:540-543.
- Berndt N, Hamilton AD, Sebti SM. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011;11:775-791.
- Bodempudi V, Yamoutpoor F, Pan W, Dudek AZ, Esfandyari T, Piedra M, Babovick-Vuksanovic D, Woo RA, Mautner VF, Kluwe L, Clapp DW, De Vries GH, Thomas SL, Kurtz A, Parada LF, Farassati F. Ral overactivation in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Mol Cell Biol* 2009;29:3964-3974.
- Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep* 2010;11:670-677.
- Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, Smits KM, de Bruine AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 2003;24:703-710.
- Britten CD. PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;71:1395-1409.
- Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem Biol* 2012;19:60-71.
- Cabrera MC, Hollingsworth RE, Hurt EM. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World J Stem Cells* 2015;7:27-36.



- Cascone I, Selimoglu R, Ozdemir C, Del NE, Yeaman C, White M, Camonis J. Distinct roles of RalA and RalB in the progression of cytokinesis are supported by distinct RalGEFs. *EMBO J* 2008;27:2375-2387.
- Castellano E, Downward J. Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;346:143-169.
- Castellano E, Santos E. Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. *Genes Cancer* 2011;2:216-231.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563-572.
- Chardin P, Tavitian A. The ral gene: a new ras related gene isolated by the use of a synthetic probe. *EMBO J* 1986;5:2203-2208.
- Chien Y, White MA. RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO Rep* 2003;4:800-806.
- Ciurea ME, Georgescu AM, Purcaru SO, Artene SA, Emami GH, Boldeanu MV, Tache DE, Dricu A. Cancer stem cells: biological functions and therapeutically targeting. *Int J Mol Sci* 2014;15:8169-8185.
- Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci* 2013;14:16365-16385.
- Cooper JM, Bodemann BO, White MA. The RalGEF/Ral pathway: evaluating an intervention opportunity for Ras cancers. *Enzymes* 2013;34 Pt. B:137-156.
- Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:828-851.
- Dasgupta P, Rizwani W, Pillai S, Kinkade R, Kovacs M, Rastogi S, Banerjee S, Carless M, Kim E, Coppola D, Haura E, Chellappan S. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 2009;124:36-45.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-954.
- De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013;13:97-110.

- Drake JM, Lee JK, Witte ON. Clinical targeting of mutated and wild-type protein tyrosine kinases in cancer. *Mol Cell Biol* 2014;34:1722-1732.
- Dumont N, Wilson MB, Crawford YG, Reynolds PA, Sigaroudinia M, Tlsty TD. Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:14867-14872.
- Dykxhoorn DM, Lieberman J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu Rev Med* 2005;56:401-423.
- Falsetti SC, Wang DA, Peng H, Carrico D, Cox AD, Der CJ, Hamilton AD, Sefti SM. Geranylgeranyltransferase I inhibitors target RalB to inhibit anchorage-dependent growth and induce apoptosis and RalA to inhibit anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol* 2007;27:8003-8014.
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feese WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 1998;273:18623-18632.
- Fei J, Li Y, Zhu X, Luo X. miR-181a post-transcriptionally downregulates oncogenic RalA and contributes to growth inhibition and apoptosis in chronic myelogenous leukemia (CML). *PLoS One* 2012;7:e32834.
- Feig LA. Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol* 2003;13:419-425.
- Feldmann G, Mishra A, Bisht S, Karikari C, Garrido-Laguna I, Rasheed Z, Ottenhof NA, Dadon T, Alvarez H, Fendrich V, Rajeshkumar NV, Matsui W, Brossart P, Hidalgo M, Bannerji R, Maitra A, Nelkin BD. Cyclin-dependent kinase inhibitor Dinaciclib (SCH727965) inhibits pancreatic cancer growth and progression in murine xenograft models. *Cancer Biol Ther* 2011;12:598-609.
- Feldmann G, Mishra A, Hong SM, Bisht S, Strock CJ, Ball DW, Goggins M, Maitra A, Nelkin BD. Inhibiting the cyclin-dependent kinase CDK5 blocks pancreatic cancer formation and progression through the suppression of Ras-Ral signaling. *Cancer Res* 2010;70:4460-4469.
- Ferro E, Trabalzini L. RalGDS family members couple Ras to Ral signalling and that's not all. *Cell Signal* 2010;22:1804-1810.
- Garg M. Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. *World J Stem Cells* 2013;5:188-195.
- Gayet J, Zhou XP, Duval A, Rolland S, Hoang JM, Cottu P, Hamelin R. Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 2001;20:5025-5032.
- Gentry LR, Martin TD, Reiner DJ, Der CJ. Ral small GTPase signaling and oncogenesis: More than just 15minutes of fame. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843:2976-2988.

- Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012;481:306-313.
- Guin S, Ru Y, Wynes MW, Mishra R, Lu X, Owens C, Barn AE, Vasu VT, Hirsch FR, Kern JA, Theodorescu D. Contributions of KRAS and RAL in non-small-cell lung cancer growth and progression. *J Thorac Oncol* 2013;8:1492-1501.
- Gunasinghe NP, Wells A, Thompson EW, Hugo HJ. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2012;31:469-478.
- Gupta PB, Mani S, Yang J, Hartwell K, Weinberg RA. The evolving portrait of cancer metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005;70:291-297.
- Györfy B, Schäfer R. Biomarkers downstream of RAS: a search for robust transcriptional targets. *Curr Cancer Drug Targets* 2010;10:858-868.
- Györfy B, Stelnic-Klotz I, Sigler C, Kasack K, Redmer T, Qian Y, Schäfer R. Effects of RAL signal transduction in KRAS- and BRAF-mutated cells and prognostic potential of the RAL signature in colorectal cancer. *Oncotarget* 2015;6:13334-13346.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
- Hao L, Ha JR, Kuzel P, Garcia E, Persad S. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. *Br J Dermatol* 2012;166:1184-1197.
- Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 1995;154:8-20.
- He B, Guo W. The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:537-542.
- Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998;153:333-339.
- Issaq SH, Lim KH, Counter CM. Sec5 and Exo84 foster oncogenic ras-mediated tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2010;8:223-231.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420-1428.
- Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 2004;118:277-279.
- Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:517-531.

- Kaufhold S, Bonavida B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *J Exp Clin Cancer Res* 2014;33:62.
- Kidd AR, III, Snider JL, Martin TD, Graboski SF, Der CJ, Cox AD. Ras-related small GTPases RalA and RalB regulate cellular survival after ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;78:205-212.
- Klinger B, Bluthgen N. Consequences of feedback in signal transduction for targeted therapies. *Biochem Soc Trans* 2014;42:770-775.
- Klinger B, Sieber A, Fritsche-Guenther R, Witzel F, Berry L, Schumacher D, Yan Y, Durek P, Merchant M, Schäfer R, Sers C, Bluthgen N. Network quantification of EGFR signaling unveils potential for targeted combination therapy. *Mol Syst Biol* 2013;9:673.
- Kothari AN, Mi Z, Zapf M, Kuo PC. Novel clinical therapeutics targeting the epithelial to mesenchymal transition. *Clin Transl Med* 2014;3:35.
- Kurrey NK, K A, Bapat SA. Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. *Gynecol Oncol* 2005;97:155-165.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006;172:973-981.
- Li L, Li W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: Comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacol Ther* 2015, im Druck.
- Li Q, Mattingly RR. Restoration of E-cadherin cell-cell junctions requires both expression of E-cadherin and suppression of ERK MAP kinase activation in Ras-transformed breast epithelial cells. *Neoplasia* 2008;10:1444-1458.
- Li Y, Liu Y, Xu Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. UV irradiation induces Snail expression by AP-1 dependent mechanism in human skin keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2010;60:105-113.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007;2:329-333.
- Lim KH, Brady DC, Kashatus DF, Ancrile BB, Der CJ, Cox AD, Counter CM. Aurora-A phosphorylates, activates, and relocalizes the small GTPase RalA. *Mol Cell Biol* 2010;30:508-523.
- Lim KH, O'Hayer K, Adam SJ, Kendall SD, Campbell PM, Der CJ, Counter CM. Divergent roles for RalA and RalB in malignant growth of human pancreatic carcinoma cells. *Curr Biol* 2006;16:2385-2394.
- Lindsey S, Langhans SA. Crosstalk of Oncogenic Signaling Pathways during Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Oncol* 2014;4:358.

- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
- Madrid LV, Wang CY, Guttridge DC, Schottelius AJ, Baldwin AS, Jr., Mayo MW. Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 2000;20:1626-1638.
- Malek A, Bakhidze E, Noske A, Sers C, Aigner A, Schäfer R, Tchernitsa O. HMGA2 gene is a promising target for ovarian cancer silencing therapy. *Int J Cancer* 2008;123:348-356.
- Martin TD, Der CJ. Differential involvement of RalA and RalB in colorectal cancer. *Small GTPases* 2012;3:126-130.
- Martin TD, Samuel JC, Routh ED, Der CJ, Yeh JJ. Activation and involvement of Ral GTPases in colorectal cancer. *Cancer Res* 2011;71:206-215.
- Mattingly RR. Activated Ras as a Therapeutic Target: Constraints on Directly Targeting Ras Isoforms and Wild-Type versus Mutated Proteins. *ISRN Oncol* 2013;2013:536529.
- Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol* 2010;629:141-158.
- Mott HR, Owen D. Structure and function of RLIP76 (RalBP1): an intersection point between Ras and Rho signalling. *Biochem Soc Trans* 2014;42:52-58.
- Neel NF, Martin TD, Stratford JK, Zand TP, Reiner DJ, Der CJ. The RalGEF-Ral Effector Signaling Network: The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery. *Genes Cancer* 2011;2:275-287.
- Nieto MA. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:347-376.
- Oxford G, Owens CR, Titus BJ, Foreman TL, Herlevsen MC, Smith SC, Theodorescu D. RalA and RalB: antagonistic relatives in cancer cell migration. *Cancer Res* 2005;65:7111-7120.
- Ozcan G, Ozpolat B, Coleman RL, Sood AK, Lopez-Berestein G. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2015, im Druck.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007;7:415-428.
- Peschard P, McCarthy A, Leblanc-Dominguez V, Yeo M, Guichard S, Stamp G, Marshall CJ. Genetic deletion of RALA and RALB small GTPases reveals redundant functions in development and tumorigenesis. *Curr Biol* 2012;22:2063-2068.

- Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009;9:265-273.
- Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2012;72:2457-2467.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* 2011;11:761-774.
- Qian, Y. The role of the GTPase RALA in the control of transformed phenotypes in colon carcinoma cells. Masterarbeit Charité Berlin 2010.
- Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003;33:49-54.
- Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:395-403.
- Roberts AB, Tian F, Byfield SD, Stuelten C, Ooshima A, Saika S, Flanders KC. Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:19-27.
- Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007;26:3291-3310.
- Rybko VA, Knizhnik AV, Komelkov AV, Aushev VN, Trukhanova LS, Tchevkina EM. Different metastasis promotive potency of small G-proteins RalA and RalB in in vivo hamster tumor model. *Cancer Cell Int* 2011;11:22.
- Sablina AA, Chen W, Arroyo JD, Corral L, Hector M, Bulmer SE, DeCaprio JA, Hahn WC. The tumor suppressor PP2A A $\beta$  regulates the RalA GTPase. *Cell* 2007;129:969-982.
- Saito R, Shirakawa R, Nishiyama H, Kobayashi T, Kawato M, Kanno T, Nishizawa K, Matsui Y, Ohbayashi T, Horiguchi M, Nakamura T, Ikeda T, Yamane K, Nakayama E, Nakamura E, Toda Y, Kimura T, Kita T, Ogawa O, Horiuchi H. Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer. *Oncogene* 2013;32:894-902.
- Schäfer R, Schramme A, Tchernitsa OI, Sers C. Oncogenic signaling pathways and deregulated target genes. *Recent Results Cancer Res* 2007;176:7-24.
- Schäfer R, Sers C. RAS oncogene-mediated deregulation of the transcriptome: from molecular signature to function. *Adv Enzyme Regul* 2011;51:126-136.
- Schaffner W, Weissmann C. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* 1973;56:502-514.
- Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol* 2012;22:396-403.

- Shirakawa R, Fukai S, Kawato M, Higashi T, Kondo H, Ikeda T, Nakayama E, Okawa K, Nureki O, Kimura T, Kita T, Horiuchi H. Tuberous sclerosis tumor suppressor complex-like complexes act as GTPase-activating proteins for Ral GTPases. *J Biol Chem* 2009;284:21580-21588.
- Smith SC, Baras AS, Owens CR, Dancik G, Theodorescu D. Transcriptional signatures of Ral GTPase are associated with aggressive clinicopathologic characteristics in human cancer. *Cancer Res* 2012;72:3480-3491.
- Smith SM, Opperman KK, Kaboord BJ, Farooqui R. Measure Activation of Small GTPases via their Specific Downstream Effectors. Thermo Fisher Scientific 2011. URL: <https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/protein-biology-application-notes/measure-small-gtpase-activation.html> [17.09.2015]
- Song SP, Hennig A, Schubert K, Markwart R, Schmidt P, Prior IA, Bohmer FD, Rubio I. Ras palmitoylation is necessary for N-Ras activation and signal propagation in growth factor signalling. *Biochem J* 2013;454:323-332.
- Sowalsky AG, Alt-Holland A, Shamis Y, Garlick JA, Feig LA. RalA suppresses early stages of Ras-induced squamous cell carcinoma progression. *Oncogene* 2010;29:45-55.
- Stelniec, I. Deregulation transkriptioneller Netzwerke in Abhängigkeit von onkogener KRAS-Signaltransduktion in einem Ovarialkarzinom-Modell. Dissertation Humboldt-Universität zu Berlin 2010.
- Stelniec-Klotz I, Legewie S, Tchernitsa O, Witzel F, Klinger B, Sers C, Herzel H, Bluthgen N, Schäfer R. Reverse engineering a hierarchical regulatory network downstream of oncogenic KRAS. *Mol Syst Biol* 2012;8:601.
- Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, McCormick F. Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell* 2014;25:272-281.
- Suzuki J, Yamazaki Y, Li G, Kaziro Y, Koide H. Involvement of Ras and Ral in chemotactic migration of skeletal myoblasts. *Mol Cell Biol* 2000;20:4658-4665.
- Talbot LJ, Bhattacharya SD, Kuo PC. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int J Biochem Mol Biol* 2012;3:117-136.
- Tchernitsa OI, Sers C, Zuber J, Hinzmann B, Grips M, Schramme A, Lund P, Schwendel A, Rosenthal A, Schäfer R. Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells. *Oncogene* 2004;23:4536-4555.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871-890.
- Thompson H. US National Cancer Institute's new Ras project targets an old foe. *Nat Med* 2013;19:949-950.

- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000;243:167-190.
- Vigil D, Martin TD, Williams F, Yeh JJ, Campbell SL, Der CJ. Aberrant overexpression of the Rgl2 Ral small GTPase-specific guanine nucleotide exchange factor promotes pancreatic cancer growth through Ral-dependent and Ral-independent mechanisms. *J Biol Chem* 2010;285:34729-34740.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994;269:5241-5248.
- Wang H, Owens C, Chandra N, Conaway MR, Brautigan DL, Theodorescu D. Phosphorylation of RalB is important for bladder cancer cell growth and metastasis. *Cancer Res* 2010;70:8760-8769.
- Wang K, Terai K, Peng W, Rouyanian A, Liu J, Roby KF, Wise AL, Ezzeldin M, Larson J, Woo RA, Lialyte K, Farassati F. The role of RalA in biology and therapy of ovarian cancer. *Oncotarget* 2013, im Druck.
- Wang X, Zheng M, Liu G, Xia W, McKeown-Longo PJ, Hung MC, Zhao J. Kruppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res* 2007;67:7184-7193.
- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005;39:75-85.
- Wu Z, Owens C, Chandra N, Popovic K, Conaway M, Theodorescu D. RalBP1 is necessary for metastasis of human cancer cell lines. *Neoplasia* 2010;12:1003-1012.
- Yan C, Liu D, Li L, Wempe MF, Guin S, Khanna M, Meier J, Hoffman B, Owens C, Wysoczynski CL, Nitz MD, Knabe WE, Ahmed M, Brautigan DL, Paschal BM, Schwartz MA, Jones DN, Ross D, Meroueh SO, Theodorescu D. Discovery and characterization of small molecules that target the GTPase Ral. *Nature* 2014;515:443-447.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927-939.
- Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008;14:818-829.
- Yang Y, Zhang J, Zhu Y, Zhang Z, Sun H, Feng Y. Follicle-stimulating hormone induced epithelial-mesenchymal transition of epithelial ovarian cancer cells through follicle-stimulating hormone receptor PI3K/Akt-Snail signaling pathway. *Int J Gynecol Cancer* 2014;24:1564-1574.
- Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res* 2011;9:1608-1620.



- Yin J, Pollock C, Tracy K, Chock M, Martin P, Oberst M, Kelly K. Activation of the RalGEF/Ral pathway promotes prostate cancer metastasis to bone. *Mol Cell Biol* 2007;27:7538-7550.
- Yoshida J, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi A, Osada R, Ohira S, Shiozawa T, Konishi I. Changes in the expression of E-cadherin repressors, Snail, Slug, SIP1, and Twist, in the development and progression of ovarian carcinoma: the important role of Snail in ovarian tumorigenesis and progression. *Med Mol Morphol* 2009;42:82-91.
- Zipfel PA, Brady DC, Kashatus DF, Ancrile BD, Tyler DS, Counter CM. Ral activation promotes melanomagenesis. *Oncogene* 2010;29:4859-4864.
- Zuber J, Tchernitsa OI, Hinzmann B, Schmitz AC, Grips M, Hellriegel M, Sers C, Rosenthal A, Schäfer R. A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat Genet* 2000;24:144-152.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Christian Manuel Sigler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Die Rolle des RALA-Signalweges bei der epithelial-mesenchymalen Transition von Tumorzellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

### Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Christian Sigler hatte Anteil an folgender Publikation:

Balázs Győrffy, Iwona Stelnic-Klotz, **Christian Sigler**, Katharina Kasack, Torben Redmer, Yu Qian, Reinhold Schäfer. Effects of RAL signal transduction in KRAS- and BRAF-mutated cells and prognostic potential of the RAL signature in colorectal cancer. Oncotarget 2015;6:13334-13346.

Beitrag im Einzelnen:

Christian Sigler hat die Migrationseigenschaften der kolorektalen Zelllinien HCT 116, SW 480 und HT 29 mit Wundheilungs-Assays analysiert. Diese Methode wurde für die genannten Zellen neu etabliert. Durch siRNA-vermittelte Knockdowns wurde der Einfluss des RALA-Signalweges auf die Migration der Zellen untersucht.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

## **Lebenslauf**

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

## Publikationsliste

Gyórfy B, Stelniec-Klotz I, **Sigler C**, Kasack K, Redmer T, Qian Y, Schäfer R. Effects of RAL signal transduction in KRAS- and BRAF-mutated cells and prognostic potential of the RAL signature in colorectal cancer. *Oncotarget* 2015;6:13334-13346.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Reinhold Schäfer möchte ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Überlassung dieses spannenden Promotionsthemas herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Stelniec-Klotz für die hervorragende Betreuung und Einweisung in die experimentelle Laborarbeit.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Tumorphathologie möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und große Hilfsbereitschaft bedanken.

Für die finanzielle Förderung meiner Promotion danke ich der Berliner Krebsgesellschaft sowie der Studienstiftung des Deutschen Volkes.

Meinen Eltern und meiner Freundin Irina danke ich für die liebevolle Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit.