

Aus dem Institut für Pathologie
Labor für Molekulare Tumorpathologie
der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Die transkriptionelle Grundlage der neoplastischen Transformation
durch Onkogene der RAS-Familie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von
Anne Chantal Lieber
aus Euskirchen

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Schäfer
2. Prof. Dr. B. Seliger
3. Prof. Dr. F. Theuring

Datum der Promotion: 28.01.2008

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinhold Schäfer für seine Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen hat.

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiter des Labors für Molekulare Tumorpathologie am Institut für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Besonderer Dank gebührt Dr. rer. nat. Oleg Tchernitsa und Dr. med. Johannes Zuber, die ebenfalls mit fachlichem Rat und viel Geduld zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein persönlicher Dank gilt meinem Ehemann. Danken möchte ich außerdem meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden. Sie alle haben mir die Kraft zur Fertigstellung dieser Arbeit gegeben.

Gewidmet meinen Eltern

4.1.9. Quantitative Messung der ankerunabhängigen Proliferation auf PolyHEMA-beschichteten Oberflächen	S. 23
4.2. Molekularbiologische Methoden	S. 24
4.2.1. Western-Blot	S. 24
4.2.2. Gesamt-RNA Isolation	S. 29
4.2.2.1. Zelllysis	S. 29
4.2.2.2. RNA-Gelelektrophorese	S. 30
4.2.3. Poly(A)+-RNA Anreicherung	S. 31
4.2.4. Northern-Blot	S. 32
4.2.4.1. Konventioneller Northern-Blot	S. 33
4.2.4.1.1. Membranherstellung	S. 33
4.2.4.1.2. Sondenherstellung	S. 33
4.2.4.1.3. Hybridisierung	S. 34
4.2.4.2. Reverser Northern-Blot	S. 35
4.2.4.2.1. Membranherstellung	S. 35
4.2.4.2.2. Sondenherstellung	S. 36
4.2.4.2.3. Hybridisierung	S. 36
4.2.4.3. Semi-quantitative Auswertung der Daten aus den konventionellen und reversen Northern-Blots	S. 37
5. Resultate	S. 38
5.1. Phänotypische Charakterisierung von Fibroblasten, welche durch onkogene RAS-Isoformen und das Src-Onkogen transformiert wurden	S. 38
5.2. Vergleich der Genexpressionsprofile RAS-transformierter Zellen	S. 42
5.2.1. Konsistente Deregulation von Zielgenen in Zellen, die durch H-, K- und NRAS-Isoformen transformiert wurden	S. 42
5.2.2. Spezifische Effekte der Expression der RAS-Isoformen auf die Transkription in transformierten Zellen	S. 42
5.2.2.1. Analysen mit reversem Northern-Blot	S. 42
5.2.2.2. Analysen mit konventionellem Northern-Blot	S. 60
5.2.3. Tabellarische Zusammenfassung der Resultate aus den reversen und konventionellen Northern-Blots	S. 65
5.3. Vergleich der Deregulation von Zielgenen in Zellen, die durch RAS- oder Src-Onkogene transformiert wurden	S. 66

6. Diskussion	S. 71
6.1. Zellbiologische Grundlage der vergleichenden Expressionsanalyse in HRAS-, KRAS- und NRAS-transformierten Zellen	S. 71
6.2. Gemeinsame Effekte der RAS-Isoformen auf das Expressionsprogramm	S. 71
6.3. RAS-isoformspezifische Unterschiede in der Regulation von Zielgenen der Signalkette	S. 73
6.3.1. HRAS-spezifische Genregulation	S. 73
6.3.2. KRAS-spezifische Genregulation	S. 77
6.3.3. NRAS-spezifische Genregulation	S. 78
6.4. Funktioneller Zusammenhang zwischen Src-induzierter Transformation und Deregulation von RAS-Zielgenen	S. 80
6.5. Transformationsassoziierte transkriptionelle Deregulation in Src- und RAS-exprimierenden Zellen	S. 84
6.6. Genexpressionsunterschiede - Ursache oder Folge der Transformation durch RAS- oder Src-Onkogene?	S. 86
6.7. Ausblick	S. 86
7. Zusammenfassung	S. 88
8. Literaturverzeichnis	S. 89
9. Anhang	S. 109
9.1. Reverse Northern-Blots	S. 109
9.2. Konventionelle Northern-Blots	S. 115
9.2.1. Hochregulierte Gene in H-/KRAS transformierten Zellen im Vergleich zu 208F-Zellen in Vorexperimenten	S. 116
9.2.2. Supprimierte Gene in H-/KRAS transformierten Zellen im Vergleich zu 208F-Zellen in Vorexperimenten	S. 121

1. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACR/Bis	Acrylamid/Bisacrylamid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
cpm	Zählimpulse pro Minute (Counts per minute)
dATP/dCTP/	
dGTP/dTTP	Desoxy-Adenosin/-Cytosin/-Guanin/-Thymin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DENHARDT's	Lösung aus Polyvinylpyrrolidon, Ficoll [®] und BSA
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
Ets	Transkriptionsfaktor
FCS	Fetales Rinderserum
g	Gramm
G418	Antibiotikum Neomycin
h	Stunde
HEMA	2 - <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl <u>m</u> eth <u>a</u> crylat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure
HRAS	Harvey-Ratten-Sarkom-Virusonkogen
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kD	kiloDalton
KN	Konventioneller Northern-Blot

KRAS	Kirsten-Ratten-Sarkom-Virusonkogen
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
NRAS	Neuroblastom-RAS-Virusonkogen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Phosphatpuffer
PBS	mit Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMS/PMSF	Phenylmethylsulfat/-sulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAS	Ratten-Sarkom-Virusonkogen
RN	Reverser Northern-Blot
RNA	Ribonukleinsäure, mRNA = messenger RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Lauryl Sulfat (n-Dodecylsulfat)
sim.	similar; ähnlich
Src	Rous-Sarkom-Virusonkogen/Serinthyrosinkinase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxy)methylaminomethan
Triton X-100	Polyethylenglycol Tert-octylphenylether
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-Sorbitanmonolaurat
U	Einheit (Unit)
UV	Ultraviolett (256 nm)
V	Volt
XTT	[Natrium 3-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzolsulfonsäurehydrat]

2. Einleitung

2.1. RAS-Proteine als zentrale Schalter in der Signaltransduktion

RAS-Gene wurden als erste und häufigste Onkogene in menschlichen und tierischen Tumoren gefunden (Barbacid, M., 1987; Guerrero, I. and Pellicer, A., 1987). RAS-Proteine wirken als molekulare Schalter, die je nach Zelltyp, Zellzyklusphase und RAS-Gen-Veränderung viele Signaltransduktionswege kontrollieren und dadurch Proliferation, Differenzierung und Entwicklung regeln (Olson, M. F. et al., 2000).

2.1.1. Signaltransduktion von extrazellulären Stimuli zu RAS

Die RAS-Proteine sind kleine, GDP/GTP- (Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat) bindende Proteine, die an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert sind. Die Analyse der biologischen Funktion hat gezeigt, dass RAS-Proteine extrazelluläre Signale ausgehend von Wachstumsfaktoren in das Zytoplasma weiterleiten. Dies geschieht z.B. bei der T-Zellaktivierung, der zytokin-induzierten Proliferation, der Differenzierung hämatopoetischer Zellen, der Entwicklung bzw. Regeneration des nervalen Systems und der Epithelzellproliferation (Lowy, D. R. et al., 1993, Downward, J., 1998).

Zu den Rezeptoren, über die Signale aufgenommen werden und die RAS transient aktivieren, gehören Tyrosinkinase-Rezeptoren, z.B. Rezeptoren für PDGF (Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor) oder EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor), Zytokinrezeptoren, z.B. der IL-2-Rezeptor, und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. In Säugetierzellen ist die Aktivierung durch Rezeptor-Tyrosinkinasen der bekannteste und wahrscheinlich auch wichtigste Mechanismus zur Signalweiterleitung von externen Stimuli zu RAS.

Wie am Beispiel des EGF-Rezeptors gezeigt, bewirkt die Ligandenbindung eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten an der intrazellulären Domäne. Diese ermöglichen die Bindung der Adaptormoleküle Shc (Src-Homologie- und Kollagenen) und Grb2 (Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein). Grb2 bildet mit dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS ("son of sevenless", Genprodukt in *Drosophila melanogaster*) über eine SH3-(Src-Homologie-) Domäne in der Zelle einen RAS-spezifischen Komplex. Durch die Bindung von Grb2 wird der Grb2/SOS-Komplex an die Zellmembran herangeführt, wo SOS membrangebundenes RAS in den aktiven GTP-bindenden Zustand überführt (Schlessinger, J., 1993).

Alternativ zu diesem Mechanismus der Signalweiterleitung spielen weitere RAS-spezifische Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF), wie RASGRP (Guanyl Nukleotid-freigebendes Protein) und p140 RASGRF (Cdc25-Thyrosinphosphatase) als weitere Effektormoleküle eine Rolle (Ebinu, J. O. et al., 1998; Jones, M. K. et al., 1998).

RAS besitzt eine langsame intrinsische GTPase-Aktivität, die jedoch für eine effiziente Überführung in seine GDP-bindende Form nicht ausreicht. Eine vollständige Inaktivierung von RAS wird erst durch verstärkende Adaptermoleküle (GTPase aktivierende Proteine; GAP) ermöglicht.

2.1.2. Intrazelluläre Signalweiterleitung

Die RAS-Protein-Aktivierung bewirkt eine Konformationsänderung der RAS-Struktur (Wittinghofer, A. et al., 1996; Geyer, M. et al., 1997). Dadurch können Effektorproteine an das RAS-Protein binden. Diese Effektorproteine, z.B. die Raf1-Proteinkinase (Maus-Sarkom-Virusonkogen-Kinase), Mitglieder der RaIGDS-Familie (Guaninnukleotid-Dissoziationsstimulator-Protein, das das RAS-ähnliche Protein aktiviert), PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und Mitglieder der Rho- ("RAS-Homologie 27") Familie, übermitteln die zytoplasmatische Transduktion des RAS-Signals.

Jeder der RAS-Effektoren kann durch Signaltransduktionsprozesse eine Vielzahl von zellulären Wirkungen erreichen, welche zum Teil gewebespezifisch sind (Plattner, R. et al., 1999). Im Folgenden werden die wichtigsten Signaltransduktionswege unterhalb von RAS erläutert (s. auch Abb.1).

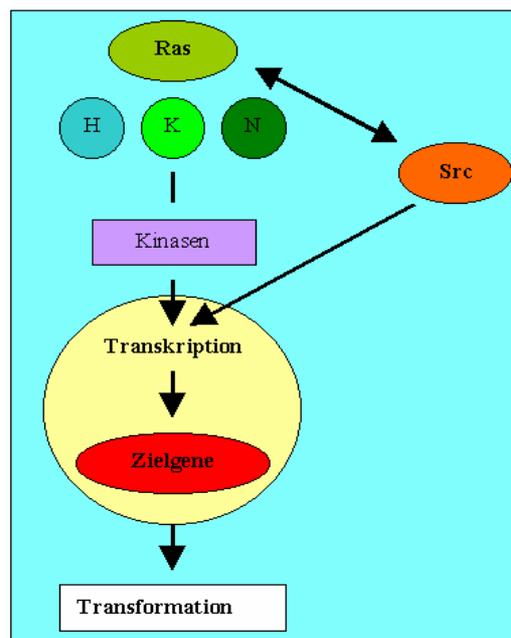


Abb.1, Referenz: Hunter, T., 1997; Bos, J. L., 1995

2.1.2.1. Raf und MEK/ERK-Weg

GTP-gebundenes RAS bindet zytoplasmatisches Raf1-Protein und transloziert es zur Plasmamembran, wo die Raf1-Kinase durch einen RAS-unabhängigen Mechanismus aktiviert wird (Stokoe, D. et al., 1994). Die aktivierte Raf-Kinase phosphoryliert MEK (MAP/ERK-Kinase - auch MAP-Kinase-Kinase genannt (Kyriakis, J. M. et al., 1992)), welches wiederum die beiden Formen p42 und p44 der MAPK/ERK-Kinase (Mitogen-aktivierte Kinase/extrazelluläre Signalregulierende Kinase) phosphoryliert.

Die ERK-Phosphorylierung bewirkt eine Translokation der Effektor kinase in den Zellkern. Dort werden Transkriptionsfaktoren direkt phosphoryliert (z.B. Ets-2 und p62TCF/Elk-1 (E62 transformationsspezifisches und Ets-ähnliches Protein)). Diese wiederum beeinflussen die Zellproliferation und die Genexpression von "immediate-early" Genen, wie Fos (FBJ-Maus Osteosarkom-Virusonkogen) und HB-EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) (Treisman, R., 1996).

Dieser Signaltransduktionsweg wird für die maligne Transformation mitverantwortlich gemacht, da durch eine MEK-Protein-Kinase-Aktivierung (und folglich auch durch ERK-Signaltransduktion) eine "Nachahmung" der Effekte von aktiviertem Wild-Typ RAS möglich ist (Mitin, N. et al., 2005).

2.1.2.2. Weitere Effektoren

Funktionelle Analysen haben gezeigt, dass Ral (RAS-verwandtes Protein) und der RalGDP-Dissoziationsstimulator wichtige Effektoren der RAS-induzierten Transformation sein können. Bei dominant-negativen Mutanten von Ral konnte in 50-75 % aller Fälle die neoplastische Transformation durch RAS verhindert werden. Als Reaktion auf extrazelluläre Signale bindet RalGDS auch an GTP-gebundenes RAS (Miller, M. J. et al., 1997) und stimuliert RAS-abhängig und örtlich begrenzt den GDP/GTP-Austausch von Ral.

RASGTP kann eine Untereinheit von PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase, p110 α) aktivieren und auf diese Weise Signale von RAS auf die Zelle übertragen (Rodriguez-Viciano, P. et al., 1997). Durch PI3K und ihre Effektoren werden die Zellproliferation, das Überleben der Zelle und metabolische Veränderungen kontrolliert.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Proteine der Rho-Familie (Rho, Rac und Cdc42) in der durch RAS ausgelösten Transformation eine essentielle Rolle spielen (Prennergast, G. C. et al., 1995; Qiu, R. G. et al., 1995 a, b). Der Verlust von funktionellem Rac (RAS-verwandtes C3-Botulinum-Toxin-Substrat) oder Rho führt zur Hemmung RAS-induzierter

Transformation. Die GTPasen der Rho-Familie regulieren die Organisation des Zytoskeletts und den Jun-Kinase (JNK)-Weg. Während Rho die Neuformation und Umgestaltung von Aktinfasern und fokalen Adhäsionskomplexen kontrolliert, reguliert Rac die Anordnung von Aktinfilamenten an der Plasmamembran, um Lamellipodien und Membranfalten zu produzieren. Cdc42 stimuliert die Bildung von Filopodien (Scita, G. et al., 2000; Sahai et al., 2001).

Alle Proteine der Rho-Familie stimulieren außerdem die Progression der G1-Phase und die DNA-Synthese. Rac1 und Cdc42 schaffen außerdem eine weitere Querverbindung im Signalnetz. Sie stimulieren die JNK/SAPK (Stress-aktivierte Proteinkinase)-Kaskade, die zur Jun (Hühner-Sarkom-Onkogen)-Transkriptionsaktivität führt (Hill, C. S. et al., 1995). Teilweise komplementieren diese Proteine auch aktivierende Signale des Raf-ERK-Signalweges.

Es gibt außer der Raf/ERK-Kaskade zwei weitere MAPK-Signaltransduktionswege, die mit RAS über Rac/Cdc42 oder MEKK1 (MEK-Kinase), einem möglicherweise direkten physiologischen Effektor von RAS, in Verbindung stehen. MEKK1 aktiviert zunächst JNKK (SEK1/SAPKK1), welche dann - parallel mit aktiviertem ERK - die Kerntranslokation von JNK/SAPK, der letzten Kinase der Kaskade, bewirkt. Diese Kinase aktiviert schließlich die Transkriptionsfaktoren im Zellkern (Malumbres, et al., 1998).

Zu dem Effektorsystem von RAS gehören auch negative Regulatoren, die GTPase aktivierenden Proteine (GAPs) p120-GAP und NF-1. Auch diese binden an die GTP-Form von RAS und stimulieren die Inaktivierung von RAS. Zusätzlich besitzt p120-GAP neben der RAS-Bindungsdomäne weitere Domänen, die mit anderen Proteinen wie Rho-GAP (p190), EGFR, und den Kinasen Src, LcK und Bcr-Abl interagieren können.

Abbildung 2 zeigt einige zelluläre Funktionen der wichtigsten RAS-Effektoren:

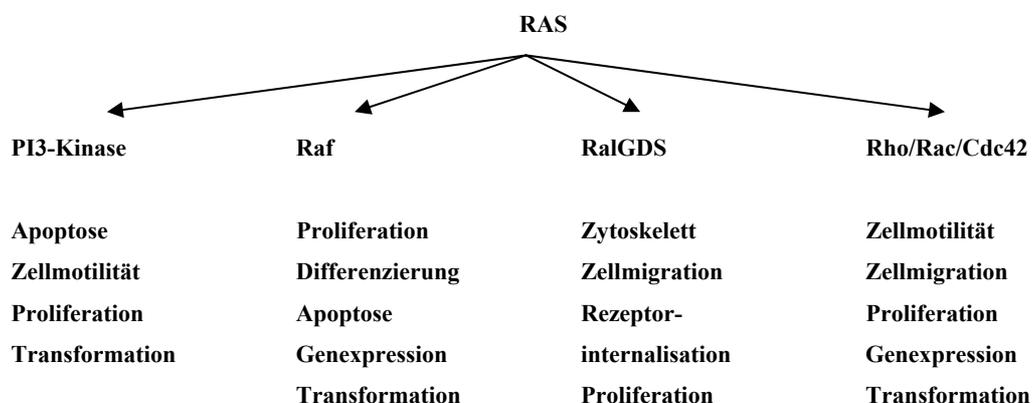


Abb. 2, in Anlehnung an Abbildung von Karsten Jürchott, Labor für Molekulare Tumorpathologie der Charité Berlin

2.1.3. Zellzyklusregulation durch RAS

Aktiviertes RAS beeinflusst den Zyklus der Zelle nur in der G₀- und G₁-Phase, jedoch bereits nicht mehr in der S-Phase. Es spielt dabei die Rolle des Übermittlers von proliferierenden (mitogenen) Signalen auf die Genexpression. Desgleichen wird durch RAS die G₁-Phase einer Zelle verkürzt, in dem über den Raf/ERK-, den Ral- und PI3K-Signalweg die Cyclin D-Expression stimuliert und der Weg für den Übergang in die S-Phase frei gegeben wird.

Transduktionswege für den Übergang von der G₁- in die S-Phase, die normalerweise hintereinander geschaltet sind, werden durch eine RAS-Aktivierung gleichzeitig eröffnet und der Übergang von der G₁- zur S-Phase wird schnell und kontinuierlich betrieben. Angefallene DNA-Strukturfehler, die normalerweise in dieser Phase "repariert" werden, können in Folge der anormalen Zyklusregulation nur noch insuffizient entfernt werden. Dadurch wird die ungehemmte Weiterentwicklung der Krebszelle beschleunigt (Gille, H. and Downward, J., 1999). Eine ausreichende G₁-Progression ist jedoch nur mit der zusätzlichen Aktivierung des Cyclin E-CDK2-Komplexes und der Degradation des Zellzyklusinhibitors, p27Kip1 (Aktas, H. et al., 1997, Fan, J. et al., 1997) möglich. Die Degradation wird ebenfalls durch die RAS-Aktivierung bewirkt. Wenn der p27Kip1-Inhibitor konstant vorhanden ist, kann die Transformation einer Zelle durch RAS sogar verhindert werden (Winston, J. T. et al., 1996).

RAS besitzt aber auch eine zellzyklushemmende Wirkung, die durch die p53 und p16INK4a Proteine vermittelt wird (Serrano, M. et al., 1997). Aktiviertes RAS reguliert p53 hoch, was in einigen Zelllinien zu einer Hemmung der Transformation (Michieli, P. et al., 1996), in anderen Zelllinien zu einem Wachstumsstillstand führt (Lloyd, A. C. et al., 1997; DePinho, R. A., Jacks, T., 2001).

2.1.4. RAS-Mutationen

Die Familie der RAS-Proteine wird durch die drei Hauptvertreter H-, K- und NRAS charakterisiert. Die Gene H- und KRAS wurden als die transformierenden Gene sarkomgener Retroviren der Stämme Harvey bzw. Kirsten in der Maus identifiziert: Ha-MSV (Harvey murine sarcoma virus, Harvey, J. J., 1964) und Ki-MSV (Kirsten murine sarcoma virus, Kirsten, W. H. and Mayer, L. A., 1967). NRAS, für das bis heute kein virales Homolog gefunden ist, wurde ursprünglich aus einem menschlichen Neuroblastom isoliert (Shimuzu, K. et al., 1983).

2.1.4.1. Aktivierung der RAS-Gene

Die Aktivierung der RAS-Gene kann auf verschiedene Weise erfolgen. Zum einen können RAS-Gene durch Punktmutationen aktiviert werden, wodurch ihre GTPase-Aktivität weitgehend verloren geht. Sie liegen dann konstant in der GTP-gebundenen Form vor (Rodenhuis, S., 1992). Zum anderen können bestimmte Zellen durch Überexpression von normalem p21-RAS auch ohne Präsenz von Mutationen transformiert werden. Die Gesamtmenge der RAS-GTP-gebundenen Proteine pro Zelle nimmt zu (Feng, J. et al., 2001; Hori, M. et al., 2000). Als dritte Form der permanenten RAS Aktivierung besteht die Möglichkeit, dass GTPase-aktivierende Proteine mutiert sind oder überexprimierte Rezeptoren die GTP-Spiegel hoch halten (Rodenhuis, S., 1992; Montagner, A. et al., 2005, von Lintig, F. C. et al., 2000).

2.1.4.2. Strukturelle Unterschiede der drei Isoformen

Die drei RAS-Gene besitzen eine sehr ähnliche Struktur mit 4 Exons und einem am 5`-Ende gelegenen, nicht-kodierenden Exon. Der Unterschied besteht hauptsächlich in der Intronlänge und -sequenz. Während das HRAS-Gen nur 3 kb groß ist, beträgt die Größe des NRAS-Gens 7 kb und des KRAS-Gens sogar 35 kb. Besonders bemerkenswert ist der hohe Grad an Übereinstimmung der RAS-Gene bei Zellen von Hefe, Tier und Mensch. Die vier Proteine sind zu 85 % homolog (León, J. at al., 1987; Furth, M. E. et al., 1987). Insbesondere die HRAS-Proteine von Maus und Mensch sind identisch, während bei NRAS drei, bzw. bei KRAS 2-5 (K-B, K-A) Änderungen der Aminosäurepositionen existieren (Maher, J. et al., 1995). Die RAS-Gene kodieren vier 21kD Proteine: H-, N-, K4A- und K4B-RAS-Proteine (das KRAS Gen kodiert 2 Proteine durch alternatives „Splicing“).

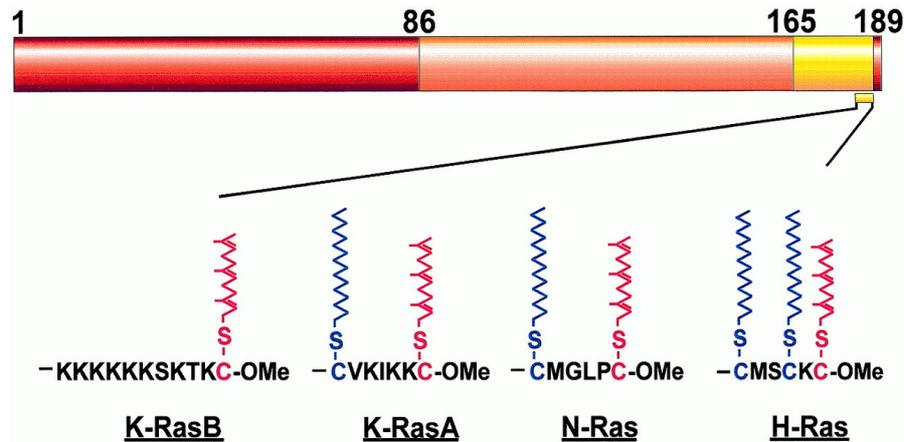


Abb. 3; Konservierung der Sequenz zwischen den vier RAS Proteinen:

Basierend auf Sequenzvergleichen können RAS-Proteine in drei Regionen eingeteilt werden. Sie haben eine nahezu identische Sequenz im Bereich der rot dargestellten Switch I Region (Aminosäuren 32-40) und der orange dargestellten Switch II Region (Aminosäuren 60-72). Sie variieren jedoch in der gelb dargestellten hypervariablen Region. Der Farbgradient von rot über orange zu gelb verdeutlicht die Abnahme der Sequenzidentität von 100% auf 0%. Die Membranbindungsregionen sind mit ihren jeweiligen, der Lokalisation des Proteins dienenden posttranslationalen Modifikationen gezeichnet: rot = farnesylierter Zysteinrest, der in allen RAS-Proteinen konserviert ist; blau = palmitoylierte Zysteinreste in N- und H-RAS-Proteinen (Bar-Sagi, D., 2001).

2.1.4.3. Unterschiedliche Inzidenz der mutierten Isoformen in Tumoren

RAS-Gene werden bei Säugetieren in allen Zelltypen und Organen exprimiert. Je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium des Säugetiers gibt es jedoch Unterschiede in der Expression. Das HRAS-Gen wird vorzugsweise in Haut und Skelettmuskel exprimiert, das KRAS-Gen vorrangig in Darm und Thymus. Die Expression des NRAS-Gen ist ebenfalls im Thymusgewebe und in männlichen Keimzellen spezifisch hochreguliert.

In den meisten menschlichen Tumoren trägt die Aktivierung von RAS-Onkogenen wesentlich zur Malignität bei (s. Tabelle 1). Deshalb wurde seit der Entdeckung der transformierenden RAS-Allele in menschlichen Tumoren im Jahr 1982 besonders intensiv über die RAS-Gene geforscht und ihre Rolle in der neoplastischen Transformation näher bestimmt.

Das Verteilungsmuster der onkogenen Formen der RAS-Gene (s. Tabelle 1) deutet auf einen funktionellen Unterschied hin, denn organspezifischer Krebs mit aktivierten RAS-Onkogenen ist häufig mit einer spezifischen RAS-Isoform assoziiert (Fiorucci, G. and Hall, A., 1988; Bos, J. L., 1989).

Tab. 1: Inzidenz mutierter RAS-Isoformen in menschlichen Tumoren

HRAS:	Blasenkarzinome (7%, 10%, 17%) Nierenkarzinome (10%, 13%)
KRAS	Lunge: Adenokarzinome (33%) Nichtkleinzellige Karzinome (33%) Kolon: Adenome (50%) Adenome bei fam. adenomatöser Polyposis (7%, 13%) Adenokarzinome (44%, 47%) Pankreaskarzinome (75%, 84%, 90%, 93%)
NRAS	Melanome (8%, 13%, 19%) Leberkarzinome (30%) Myeloische Erkrankungen: Myelodysplastisches Syndrom (38%, 41%) Idiopathische Myelofibrose (22%) Akute myeloische Leukämie (19%, 26%, 27%, 28%, 30%, 50%, 56%, 63%, 70%) Chronisch myeloische Leukämie: chronische Phase (17%) akute Phase (50%) Akute lymphatische Leukämie (11%)

Die Prozentzahlen in Klammern stellen die Ergebnisse verschiedener unabhängiger Studien dar (Rodenhuis, S., 1992; Bos, J. L., 1989; Demunter, A. et al., 2001; Macaluso, M. et al., 2002).

Bei Tumoren, die mit HRAS in Verbindung gebracht werden, sind Genmutationen jedoch selten (Blasen- und Nierenkarzinome, s.o.). Allerdings fallen hohe HRAS-Proteinniveaus in Mammakarzinomen (Hori, M. et al., 2000) und Kolonkarzinomen, insbesondere bei Frauen und metastasierten Stadien (Feng, J. et al., 2001), auf.

Die unterschiedliche Inzidenz der RAS-Isoformen in bestimmten menschlichen Tumoren wirft die Frage nach der molekularen Bedeutung auf. Entweder wird die Gewebespezifität durch das RAS-Protein selbst oder durch RAS-Signalkettenabhängige differentielle Genexpression (Kim, K. et al., 2002) verursacht. Einen Hinweis für die unterschiedliche Rolle der RAS-Isoformen liefern Experimente mit gendefizienten Mäusen.

2.1.5. Unterschiedliche Rolle der Isoformen in der Entwicklung von Mäusen

Das KRAS-Gen ist notwendig für die normale Entwicklung der Maus. Während das H- und NRAS-Gen für die Entwicklung einer Maus entbehrlich sind, wirkt eine Deletion des KRAS-Gens letal (Esteban, L. et al., 2001; Umanoff, H. et al., 1995; Johnson, L. et al., 1997). Dazu passt, dass das KRAS-Gen vor allem in Embryonalzellen im Vergleich zu Zellen adulter Säugtiere hoch exprimiert ist.

Tab. 2: "Knock-out" Mausmodelle zum Nachweis der Rolle der RAS-Isoformen in der Entwicklung

Allele	Phänotyp
KRAS -/-	embryonal letal Herzabnormalitäten Tod neuronaler Zellen
HRAS -/-	ohne Befund
NRAS -/-	ohne Befund
HRAS +/- und gleichzeitig NRAS +/-	ohne Befund
NRAS +/- und gleichzeitig KRAS +/-	embryonal letal Dottersackdefekte

Allel vorhanden (+), Allel nicht vorhanden (-)

Eine der Grundlagen für diese funktionellen Besonderheiten sind die in Abb. 3 gezeigten biochemischen Unterschiede der RAS-Protein-Isoformen (Rodenhuis, S., 1992; Prior, I. A. et al., 2000; Apolloni, A. et al., 2000; Bar-Sagi, D., 2001).

Der erste Schritt der posttranslationalen Modifikation der hypervariablen Region ist die irreversible Farnesylierung der Cystein-Reste im CAAX-Motiv. Dann werden die AAX-Reste proteolytisch entfernt; das übrigbleibende C-terminale Cystein wird nunmehr methyliert.

Im nächsten Schritt wird die hypervariable Region der H-, N- und KRAS A-Proteine palmitoyliert und die Proteine auf dem klassischen Sekretionsweg durch den Golgikomplex an die Zellmembran gebracht. Dort binden sie an cholesterinreiche Membrandomänen, sogenannte Caveolae. Im Gegensatz dazu wird das KRAS B-Protein nicht palmitoyliert. Dessen polybasische Domäne aus sechs Lysin-Resten bewirkt - auf bislang unbekanntem Weg, jedoch nicht über den Golgiapparat - einen direkten Transport an die Plasmamembran. Dort kann das KRAS B-Protein

überall ankernd und mit der eigenen polybasischen Einheit kleine Signalzentren für die Effektoren bilden.

Entsprechend den Unterschieden in der posttranslationalen Modifikation und der Membranverankerung leiten die RAS-Isoformen Signale in unterschiedlicher Weise oder Stärke weiter. Das unterschiedliche Potential zur Raf-1-Aktivierung durch die drei RAS-Isoformen wurde von Voice, J. K. wie folgt auf einer vergleichenden Skala beschrieben (Voice, J. K. et al., 1999):

KRAS 4B > KRAS 4A >>> NRAS > HRAS.

In einer anderen Arbeit zeigen beispielsweise H- und NRAS eine unterschiedliche Affinität zur Signalkinase Raf-1 *in vivo*. Die ERK-Aktivierung durch Raf-1 erfolgt primär nicht über HRAS als Signalgeber, sondern über NRAS (Hamilton, M. et al., 1998).

Eine Forschungsgruppe zeigte, dass HRAS - und nicht KRAS - für den Signalweg über Raf/MEK/MAPK von der Endozytose und dem endozytotischen Recycling abhängig ist (Roy, S. et al., 2002).

Ein weiterer spezifischer Funktionsunterschied wurde für das Calmodulin-bindende Protein nachgewiesen. Allein KRAS B ist ein Calmodulin-bindendes Protein, die anderen RAS-Isoformen binden Calmodulin aufgrund ihrer variablen Carboxyregionen nicht. Die KRAS B-vermittelte Signaltransduktion wird somit negativ moduliert (Villalonga, P. et al., 2001).

Die spezifische Signalweiterleitung der drei RAS-Isoformen ergibt sich auch aus ihrem unterschiedlichen Bindungsverhalten mit verschiedenen RAS-Guanin-Austauschfaktoren. Obwohl p120-GAP an N- und HRAS bindet, hat NF1-GAP eine 4-fach höhere Bindungsaffinität zu HRAS als zu NRAS (Bollag, G. et al., 1991). Smg-GDS bindet an aktives und inaktives KRAS, aber nicht an aktives N- und HRAS (Mizuno, T. et al., 1991; Vikis, H. G. et al., 2002).

2.1.6. Transformation von Zellen durch die RAS-Onkogene

Zelluläre RAS-Onkogene sind in der Lage, bestimmte immortalisierte Nagetierzelllinien neoplastisch zu transformieren. Zur Transformation humaner Zellen bedarf es weiterer genetischer Aberrationen, um durch RAS-Onkogene transformiert zu werden (Hahn, W. C. et al. 1999). Dazu zählen die Aktivierung kooperierender Onkogene wie Fos oder Myc (Myelozystomatosis-Virusonkogen), der Verlust von Tumorsuppressorgenen wie p53, die Überexpression von Cyclin D, Cyclin E oder cdc25 (ausgelöst durch das Myc-Onkogen) und die Dysregulation von E2F-Transkriptionsfaktoren (Haas, K. et al., 1997; Sinn, E. et al., 1987; Johnson, D. G. and Schneider-Broussard, R., 1998; Land, H. et al., 1983). Zudem müssen inhibitorische Effekte von „normalen“ Nachbarzellen verloren gehen (Schwieger, A. et al., 2001). Zum Beispiel können durch

Aufnahme von viralen Onkogenen in die Zelle (HPV E6 und 7, E1A, SV40LT) die Inhibitoren p16INK4a und p53 blockiert werden (Lloyd, A. C., 1998).

Insbesondere die Transformation von Epithelzellen durch onkogenes RAS führt zu epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) unter Mitwirkung von TGF β -Rezeptor-Signalen (transformierender Wachstumsfaktor β). Die EMT ist charakterisiert durch eine spindelähnliche Zellgestalt, den Verlust epithelialer Marker und die Induktion mesenchymaler Marker (Janda, E. et al., 2002). Zu den Effekten der neoplastischen Transformation in Fibroblasten zählen das ankerunabhängige Wachstum und der Verlust der dichteabhängigen Wachstumskontrolle. Die Proliferation der Zellen wird bei hoher Dichte nicht gehemmt und es bilden sich fokal wachsende Zellaggregate (Foci). RAS-transformierte Fibroblasten erzeugen nach Injektion in Nacktmäuse Tumore (Barbacid, M., 1987).

Die verschiedenen RAS-Gene zeigen je nach Zelltyp ein unterschiedliches Transformationspotential. HRAS hat z.B. ein 10-fach höheres Potential als K- und NRAS, Rat-2 und NIH 3T3 Fibroblasten zu transformieren. Das Transformationspotential von NRAS in menschlichen hämatopoetischen TF-1-Zellen und hämatopoetischen Zelllinien FDC-P1 der Maus ist, im Vergleich zu den anderen Isoformen, signifikant erhöht (Maher, J. et al., 1995).

Das unterschiedliche Potential der drei RAS-Isoformen, den neoplastischen Phänotyp zu induzieren, wurde von Voice J. K. et al. anhand folgender Skala beschrieben (Voice, J. K. et al., 1999):

Fokusbildung: HRAS \geq KRAS 4A \gggg NRAS = KRAS 4B

Ankerunabhängiges Wachstum: KRAS 4A \geq NRAS \gggg KRAS 4B = HRAS

Zellmigration: KRAS 4B \gggg HRAS $>$ NRAS = KRAS 4A

Onkogene Rattenembryofibroblasten, die ein mutiertes KRAS-Gen exprimieren, haben einen Wachstumsvorteil gegenüber HRAS-transformierten Tumorzellen (Walsh, A. B. et al., 2001). Infolge der unterschiedlichen Membranverankerung aktiviert hier KRAS den Effektor Rac effizienter und intensiver als HRAS. Normalerweise führt die Rac-Aktivierung über bestimmte Signaltransduktionswege zur Apoptose. Die Apoptose wird in diesem Fall jedoch verhindert.

Aktivierte RAS-Gene treten auch in präkanzerösen Läsionen auf. Offenbar spielen sie ebenfalls eine Rolle in der Tumorinitiation. Die Gene führen jedoch erst zu einer onkogenen Transformation, wenn weitere genetische Veränderungen vorliegen. Man fand aktivierte HRAS-Gene in Papillomen und Karzinomen der Haut von Mäusen, die mit Dimethylbenzanthrazen behandelt worden waren (Balmain, A. et al., 1984). Die Nachkommen von Mäusen, die mit Nitrosomethylharnstoff behandelt worden waren, zeigten Mammakarzinome mit HRAS Mutationen (Sukumar, S. et al., 1983; Zarbl, H. et al., 1985). Desgleichen wiesen durch Nitrosomethylharnstoff oder mit

γ -Strahlen induzierte Lymphome des Thymus von Mäusen NRAS Mutationen auf (Guerrero, I. et al., 1984 a, b).

2.1.7. Rolle der RAS-vermittelten Signaltransduktion in der zellulären Transformation durch das Src-Onkogen

Das v-Src Onkogen transformiert Zellen in Kultur ebenso effektiv wie mutierte RAS-Gene. Es wurde als das transformierende Gen des „Rous Sarcoma Virus“ entdeckt und kodiert eine membranassoziierte Tyrosinkinase, welche nicht als Rezeptor wirkt.

Während der Translation wird zelluläres Src (c-Src) durch Myristoylierung modifiziert, wodurch eine Membranlokalisierung des Proteins möglich wird. In einem weiteren posttranslationalen Schritt werden die myristoylierten Proteinformen palmitoyliert. Die Palmitoylierung hat den Effekt, Src vorzugsweise an die Plasmamembran statt an intrazelluläre Membranen heran zu führen und die Membranbindung zu stabilisieren.

Ebenso wie einige Mitglieder der RAS-Familie konzentriert sich auch palmitoyliertes Src in speziellen Strukturen der Zellmembran, den Caveolae. Hierdurch befindet es sich stets in der Nähe der Zelloberflächenrezeptoren und seiner potentiellen Effektoren. Src wird über zahlreiche extrazelluläre Signale (z.B. über EGF und β -adrenerge Rezeptoren) aktiviert und reguliert die Funktionen einer Vielzahl von zellulären Proteinsubstraten. Dazu gehören z.B. die Phosphorylierung von Shc, was zu einer Aktivierung der RAS/Raf/ERK-Kaskade und des PI3K/Akt-Weges im Sinne mitogener Überlebenssignale führt.

Weitere Effektoren von Src sind STAT3 (Signalvermittler und -aktivator der Transkription), Cortactin, FAK (Fokale Adhäsionskinase) und Proteine wie Clathrin und Dynamin. Während STAT3 über den mitochondrialen Weg die Apoptose verhindert, sind die übrigen Effektoren für die Endozytose verantwortlich (Odajima, J. et al., 2000; Goi, T. et al., 2000).

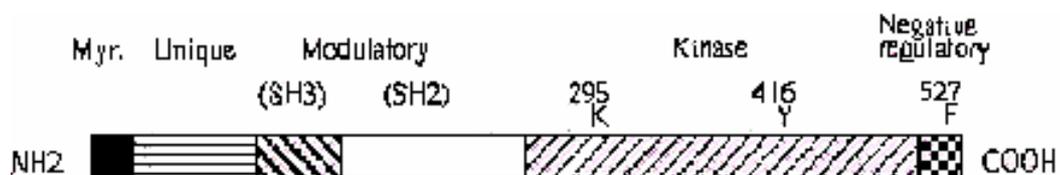


Abb. 4: aus Hirai, H. and Varmus, H. E., 1990; Struktur des Src-Proteins des Huhns (533 AS); Einteilung in Regionen, die für die Myristoylierung (Myr.) nötig sind, die bestimmte Funktionen bei den jeweiligen Src-Familienmitglieder tragen (Unique), die die Aktivität modulieren (SH3, SH2, src homology region), die Proteinkinaseaktivität besitzen oder die die Kinaseaktivität negativ beeinflussen.

Es gibt acht weitere Tyrosinkinase, die aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten zur Src-Familie gehören und ähnliche Funktionen erfüllen. Src-Familienmitglieder kommen in den meisten Geweben des Körpers redundant vor; desgleichen zeigten Maus-Experimente mit defizientem Src-Gen keine dramatischen Effekte. Dennoch gibt es Zelltypen, wie z.B. hämatopoetische Zellen, bei denen der Verlust einer spezifischen Src-Kinase zu einer Immundefizienz führt (Brown, M. T., 1996).

Die maligne Transformation von Fibroblasten durch onkogenes Src ist RAS-abhängig. So können Src-transformierte Zellen die Zellproliferation und den transformierten Phänotyp nicht aufrechterhalten, wenn die RAS-Aktivität in der Zelle durch Antikörper neutralisiert wird (Stacey, D. W. et al., 1991, Tokumitsu, Y., 2000). Src agiert daher als ein Signalvermittler oberhalb von RAS.

Aktiviertes mutiertes Src hat onkogenes Potential, wenn es an fokalen Adhäsionsstellen der Zellmembran angehäuft wird. Auch durch Überexpression von normalem Src können Zellen transformiert werden, ebenso wie dies bei anderen Onkogenen der Fall ist.

Die Transformation durch Überexpression des Proteins ist allerdings weniger effektiv als durch mutierte Varianten (Campbell, G. S. et al., 1997). Man nimmt an, dass ein von der Proteinmenge abhängiger Schwellenwert existiert, den auch mutiertes Src überschreiten muss, um eine komplette zelluläre Transformation zu erreichen (Hirai, H. et al., 1990).

Src wird auch in direkte Verbindung mit der Entstehung und der Progression von menschlichen Tumorzellen gebracht. Zum Beispiel weisen Kolon- und Mammakarzinome erhöhte Aktivität von Src und STAT3 auf (Biscardi, J. S. et al., 1999; Garcia, R. et al., 1997).

2.1.8. Effekte der RAS-Onkogene auf das genetische Programm

In der normalen Zelle beeinflusst GTP-gebundenes RAS die Genexpression als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli. In der Tumorzelle induziert permanent aktives, onkogenes RAS dagegen anhaltende transkriptionelle Veränderungen, wodurch zelluläre Gene entweder stärker oder schwächer exprimiert werden (Groudine, M. et al., 1980; Aoyama, A. and Klemenz, R., 1993). Es ist daher anzunehmen, dass RAS-Signalketten-induzierte transkriptionelle Veränderungen die Grundlage für die maligne Transformation darstellen. Aus Einzelgen-Untersuchungen ist bekannt, dass die Transkriptionsfaktoren (Mitglieder der Ets-Familie, Jun, Fos, SRF), Zellzyklusregulatoren (Cyclin D, p16INK4a), Signalmoleküle (Cyclooxygenase 1 und 2), verschiedene Metalloproteinasen (MMP's), Angiogenesefaktoren (VEGF), Oberflächenmoleküle (CD44) und

extrazelluläre Proteine (Collagen-alpha, Mob-1) in RAS-transformierten Zellen verstärkt exprimiert werden.

Unter den durch RAS in ihrer Expression gehemmten Genen fand man die Klasse-II-Tumorsuppressoren, wie z.B. Connexin, Maspin, alpha-6-Integrin, Mac 25 (Mitglied der Insulinwachstumsfaktor-bindenden Proteinfamilie) und H-Rev107 (Sager, R. et al., 1997; Sers, C. et al., 1997). Mit Hilfe neuer Methoden zur Erstellung von Expressionsprofilen kann man heute die komplexen transkriptionellen Veränderungen durch Onkogene genomweit bestimmen (Diatchenko, L. et al., 1996; Zhang, L. et al., 1997; Bowtell, D. D., 1999, Tchernitsa, O. et al., 2006, Schäfer, R. et al., 2006).

In der Arbeit von Zuber et al. (2000) wurden erstmals genomweite Expressionsprofile für RAS-transformierte Fibroblasten beschrieben. Diese Studie basiert auf einer PCR-gestützten cDNA-Subtraktionsmethode (Subtraktion-Suppressionhybridisierung), die zum Zeitpunkt ihrer Anwendung die Detektion bekannter, differentiell exprimierter Sequenzen sowie noch nicht auf Microarrays repräsentierter Sequenzen mit hoher Empfindlichkeit erlaubte.

Von 823 untersuchten Gensequenzen wurden 393 Gene identifiziert, die durch eine HRAS-Transformation entweder stimuliert oder unterdrückt wurden. Hierzu gehörten 104 ESTs, 45 neue Sequenzen und 244 bekannte Gene (Zuber, J. et al., 2000). Das verwendete Zellmodell eignete sich hervorragend zur Untersuchung transkriptioneller Alterationen, da die normalen und Onkogen-transformierten Zellen genetisch eng verwandt sowie chromosomal stabil sind und keine numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen aufweisen. Eine ähnliche Studie wurde mit KRAS-transformierten Ovarialepithelzellen der Ratte durchgeführt (Tchernitsa, O. et al., 2004).

Unabhängige Studien zeigen, dass sich Tumor- und Normalzellen durch eine signifikante Anzahl differentiell exprimierter Gene unterscheiden (Zhang, L. et al., 1997; Schulze, A. et al., 2001; Heinrich, J. et al., 2000 und Ebert, A. D. et al., 2000). Das Genexpressionsmuster von Zellen, die unterschiedliche RAS-Isoformen exprimieren ist nicht identisch. Beispielsweise kann HRAS exklusiv die c-Fos-Induktion durch den Proteinkinase C-Aktivatoren (TPA) verhindern (Carbone, A. et al., 1991). KRAS vermittelte Signaltransduktion supprimiert spezifisch die Expression von TTF-1 (Thyroid transcription factor 1), dagegen beeinflusst HRAS die TTF-1 Expression nicht, kontert jedoch TTF-1 Zielgene (Francis-Lang, H. et al., 1992).

Im Gegensatz zu onkogenem HRAS blockiert onkogenes KRAS die Glykosylierung von β 1-Integrin und reguliert das onkofetale Tumorantigen (carcinoembryonic antigen - CEA) hoch. Dadurch wird die Zelladhäsion, welche durch Kollagen1 und Laminin normalerweise aufrecht-

erhalten wird, zerstört und die basolaterale Polarität von Kolonepithelzellen aufgehoben (Yan, Z. et al., 1997 a, b).

Unterschiede in der Deregulation der Zielgene onkogener RAS-Signalketten, gesteuert durch die drei Isoformen, wurden auf Ebene der Transkription bisher nicht untersucht, obwohl funktionelle relevante Unterschiede zu erwarten sind (Guerrero, S. et al., 2000). Dies bildet den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

3. Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Das Säugetiergenom enthält drei funktionelle RAS-Gene, H-, K- und NRAS, die große Ähnlichkeiten in Struktur und Funktion aufweisen. Die drei RAS-Isoformen zeigen eine präferentielle Aktivierung in Tumoren unterschiedlicher Organe. Ursache und funktionelle Konsequenzen dieser Isoformspezifität sind ungeklärt. In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, inwieweit sich die mRNA-Expressionsmuster in Abhängigkeit der Signalkettenaktivierung durch die drei RAS-Isoformen unterscheiden.

Mit Hilfe eines Fibroblastenmodells für die neoplastische Transformation sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie unterscheiden sich die Genexpressionsprofile von Fibroblasten, die durch aktivierte HRAS-, KRAS- und NRAS-Gene neoplastisch transformiert wurden?
2. Erlauben Unterschiede im genetischen Programm Aufschlüsse über die unterschiedliche Rolle der drei Isoformen?

Darüber hinaus wird untersucht, inwieweit sich die Bedeutung der RAS-Proteine als Vermittler der Transformation durch die Src-Tyrosinkinase in den Genexpressionsprofilen widerspiegelt.

Die Expression RAS-regulierter Gene wurde mittels konventioneller Hybridisierungsanalysen erfasst. Ausgangspunkt sind jene differentiell exprimierten Gene, welche in HRAS-transformierten Fibroblasten (Zuber, J. et al., 2000) und KRAS-transformierten Epithelzellen (Tchernitsa, O. et al., 2004) identifiziert worden waren.

4. Material und Methoden

4.1. Zellbiologische Methoden

4.1.1. Verwendete Zelllinien

Die für die Studie verwendeten transformierten Zelllinien sind Derivate immortaler, nicht-tumorigener 208F-Rattenfibroblasten (Quade, K., 1979). FE-8-Zellen wurden durch Ko-Transfer des mutierten HRAS-Gens und pSV2neo (Southern, P. J. and Berg, P., 1982) neoplastisch transformiert (Griegel, S. et al., 1986). KRAS-transformierte 208F-Zellen wurden kotransfiziert mit dem pSV2neo-Gen und dem mutierten KRAS C12V-Gen, kloniert in den Expressionsvektor pEF-BOS (Tchernitsa, O. et al., 2004). Zur Herstellung NRAS-transformierter Zellen wurden 208F-Fibroblasten mit dem mutierten NRAS(-G12D)-Gen und dem Resistenzgen pcDneo transfiziert. Die Src-transformierten Zellen wurden durch Kotransfektion mit dem Plasmid pMV3/ASVSrc (DeLorbe, W. J. et al., 1980) und dem pSV2gpt-Expressionsvektor (Mulligan, R. C., Berg, P., 1981) hergestellt. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte in mit G418/Neomycin versetztem Medium.

4.1.2. Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s Medium, Bio Whittaker[®]), versetzt mit 10% FCS (PAN[™] Bio) und 1% Glutamax, bis auf 70% Konfluenz in T75-Zellkulturflaschen in einem Zellkulturinkubator (Stericult 200, Forma Scientific) bei 37°C in kontrollierter CO₂-Atmosphäre (5%) kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage erneuert. Sterilkontrollen der Medien und Kulturen wurden regelmäßig durchgeführt. Standardmäßig wurde bei allen Zelllinien ein Mykoplasmentest durchgeführt und kontaminationsfreie Zelllinien verwendet. Die Passagierung der Zelllinien erfolgte in der Regel alle 2-3 Tage.

Dazu wurde das Medium entfernt, die adhären Zellen einmal mit PBS (1x PBS, pH 7,4: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ 7 mM H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄) gewaschen und durch fünfminütige Inkubation mit 2 ml einer Lösung aus 0,05% Trypsin/0,01% EDTA (Firma Biochrom AG) bei 37°C abgelöst. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe von 8 ml DMEM gestoppt und die Zellsuspension 10 Minuten in einem konischen Schraubdeckelröhrchen bei 800 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Zellknetenzentrifuge, MLW T54).

Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in DMEM mit gewünschtem Volumen resuspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt. Alle Arbeiten erfolgten unter einer Zellkulturbank (Lamin-Air[®] HBB 2472, Heraeus Instruments). Zur Präparation von größeren RNA-Mengen wurden die Zellen auf mehrere Petrischalen (135mm \varnothing) verteilt. Die Kulturen wurden bei Erreichen von 70% Konfluenz für die RNA-Herstellung verwendet.

4.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Jeweils 2×10^6 Zellen wurden in DMEM (90%) mit den üblichen Zusätzen und mit DMSO (Dimethylsulfoxid) (10%) in 2 ml-Kryoröhrchen in einer Einfrierbox (Nalgene) bei -80°C eingefroren und anschließend in Tanks mit flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus den Tanks entnommen und vorsichtig in ein Wasserbad (37°C) getaucht. Nach raschem Auftauen unter Schütteln wurde die Zellsuspension in ein neues Röhrchen pipettiert und tropfenweise 9 ml DMEM-Kulturmedium unter leichtem Schütteln zugegeben. Anschließend wurde die Suspension 5 min bei 700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellsediment in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und zunächst auf zwei T75-Zellkulturflaschen (Falcon[®]) verteilt.

4.1.4. Zelltransfektion mittels CaPO_4 -Präzipitation (Wigler, M. et al., 1978)

Die Kotransfektion von Onkogen und Resistenzgen wurde mittels CaPO_4 -Präzipitation durchgeführt (Wigler, M. et al., 1978). Die Expressionsvektoren für KRAS bzw. NRAS und das Neomycinresistenzgen wurden im Verhältnis 5:1 transferiert. Als Träger-DNA diente genomische Rat-2-DNA.

10^6 208-F Zellen wurden in T75-Flaschen in DMEM ausplattiert und mit 1,5 ml CaPO_4 /DNA-Co-Präzipitat transfiziert. Zur Herstellung des Präzipitats (1,5 ml) wurden zwei getrennte Lösungen verwendet. Lösung A enthält 750 μl 2x HBS und 15 μl 100x PO_4 . Lösung B ohne DNA enthält 90 μl CaCl_2 ad 750 μl Gesamtvolumen. Lösung B mit DNA enthält 90 μl CaCl_2 , 20 μl Träger-DNA (Rat-2, 20 μg), 1,5 μl Resistenz-DNA (1 μg) und 5 μl Onkogen-DNA (5 μg) ad 750 μl Gesamtvolumen.

Da für eine hohe Transfektionsausbeute ein pH-Wert von 6,9 +/- 0,05 eingehalten werden muss, wurden zunächst Testpräzipitate ohne DNA hergestellt. Ansatz B wurde dazu tropfenweise in Ansatz A gegeben und der pH-Wert gemessen (pH-Meter: CG840, Schott). Gegebenenfalls wurde der Ansatz mit Veränderungen der 100x PO_4 -Menge in Ansatz A wiederholt. Ansatz B mit

DNA wurde sodann tropfenweise in Ansatz A gegeben. Die Bildung des Präzipitats war an der Trübung der Lösung erkennbar. Falls die Präzipitate großflockig wurden, war eine Durchmischung des Präzipitats durch mehrfaches Pipettieren oder eine Scherung der hochmolekularen DNA durch Passage durch eine 21G-Kanüle vor Herstellung der Ansätze notwendig. Die vollständige Präzipitatbildung erfolgte ca. nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur. Das DMEM-Medium in der Zellkulturflasche mit den Empfängerzellen (10 ml) wurde um 1,5 ml reduziert und das Präzipitat gleichmäßig auf die gesamte Oberfläche der Zellkultur getropft. Unter dem Mikroskop war nun erkennbar, dass die Präzipitate über dem Zellrasen schwebten.

Aufgrund der wachstumshemmenden Wirkung des CaPO_4 wurde das Medium 12 h nach der Transfektion ausgetauscht. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen im Verhältnis 1:40 verdünnt und in 10 ml Petrischalen in Selektionsmedium (DMEM + 400 $\mu\text{g/ml}$ G418/Neomycin) ausplattiert. Nach 2-3 Wochen wurden die resistenten Kolonien isoliert.

2x HBS: HEPES 10 g/l + NaCl 16 g/l; pH von 7,1 +/- 0,05 (ggf. mit 1 M NaOH einstellen)

100x PO_4 : 70 mM Na_2HPO_4 + 70 mM NaH_2PO_4 1:1 mischen

2 M CaCl_2 : CaCl_2 294,04 g/l

alle Lösungen wurden steril filtriert.

4.1.5. Zellklonisation

Die transfizierten Zellen wurden in neomycinhaltigem Medium selektiert. Um resistente Klone zu isolieren, wurden sie auf der Unterseite der Petrischale mit einem Filzstift markiert. Um Vermischungen zu vermeiden, wurden vorrangig die Klone ausgewählt, die sich in einigem Abstand zu Nachbarklonen befanden. Das Medium wurde dann abgesaugt. Die Klonierungsringe wurden mit der Unterseite in Silikonpaste getaucht und auf die Klone gesetzt. Der Einschluss anderer Klone wurde durch eine mikroskopische Kontrolle ausgeschlossen.

Sodann wurden jeweils 2 Tropfen Trypsin mit einer sterilen Glaspipette für 2 min in die Klonierungsringe gegeben. Die Zellklone wurden mit einem Tropfen Medium vom Boden der Petrischale abgespült und abgesaugt. Die Zellsuspension wurde nun in eine mit 4 ml Medium gefüllten T25-Flasche (Falcon[®]) überführt. Schließlich wurde mit dem Mikroskop kontrolliert, ob der Inhalt des Klonierungsrings zellfrei war.

4.1.6. Fokustest in nicht-selektivem Medium

Da sich RAS-transformierte Fibroblasten von normalen nicht-transfizierten Zellen durch die Fokusbildung leicht unterscheiden lassen, wurden alternativ transfizierte Zellen nach Verdünnung in DMEM ohne Neomycin kultiviert. Die Foci waren nach 2-3 Wochen sichtbar.

4.1.7. Fokusanfärbung mit Methylenblau

Zur quantitativen Bestimmung der Fokusbildung wurden die Zellrasen angefärbt. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und mit 5 ml Methanol 10-15 min bei RT fixiert. Dann wurde das Methanol abgegossen, 1 ml Methylenblau (1%) verdünnt in PBS auf die Zellen gegeben und bei RT 0,5 h stehen gelassen. Sodann wurde auch das Methylenblau abgegossen und die Zellen mehrfach mit Wasser gespült, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen.

4.1.8. Kultur in Weichagar-Medium

Ein Merkmal transformierter Zellen ist die Fähigkeit, in halbfestem Agarmedium Kolonien zu bilden. Um festzustellen, ob Zellen diese Eigenschaft besitzen, wurden 10^2 - 10^3 Zellen in 65 ml Weichagarmedium plattiert (T25 Zellkulturflasche). Dazu wurden Zellen aus exponentiell wachsenden Vorkulturen mit Trypsin/EDTA abgelöst, gezählt und in 1 ml einfach konzentriertes Medium gegeben. Die entsprechende Zellzahl wurde zu 32 ml doppelt konzentriertem Medium in einer T25 Zellkulturflasche gegeben und sofort mit 32 ml auf 42°C vorgewärmtem Weichagar (DIFCO-Noble-Agar in 0,3%iger Lösung) vermischt. Die Zellen wurden zur Abkühlung kurz in ein Eiswasserbad gestellt und anschließend bei 37°C inkubiert. Nach 2-3 Wochen wurde die Anzahl der Klone in Weichagar mit den Weichagarkulturen der 208F-Zellen verglichen. Nicht-transformierte Zellen bildeten nach Aussähen von 10^4 - 10^5 Zellen keine Weichagar-Kolonien.

DMEM doppelt konzentriert zur Herstellung des Agarmedium für 400 ml

(entspricht 12 Agar-T25-Ansätzen):

144 ml steriles $H_2O_{\text{bidest.}}$

80 ml 2x DMEM (doppelt konzentriert)

80 ml FCS (10%)

8 ml Glutamax (1%)

80 ml Natrium- HCO_3 (7,4 g/l), getrennt autoklavieren oder steril filtrieren

Doppelt-konzentrierte Weichagarlösung (für Nagetierzellen 0,3 %):

0,3 g DIFCO Noble Agar auf 100 ml H₂O

bei 121 °C für 20 min autoklavieren

im Wasserbad bei 45 °C aufbewahren (noch am selben Tag verwenden!)

4.1.9. Quantitative Messung der ankerunabhängigen Proliferation auf PolyHEMA-beschichteten Oberflächen (Fukazawa, H. et al., 1995)

Nach 5 Tagen Proliferationsdauer der Zellen wurde der XTT-Reduktionstest durchgeführt. Er basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes XTT in orangefarbenes Formazan. Diese Farbreaktion wird von der mitochondrialen Dehydrogenase metabolisch aktiver Zellen durchgeführt. Das Produkt der Zellen, der wasserlösliche Formazanfarbstoff, wird in das wässrige Medium abgegeben und konnte so direkt spektrofotometrisch von einem ELISA-Gerät (EL 340 Microplate Bio Kinetics reader, Bio-TEK™ Instruments) gemessen werden.

Vorbereitung:

Zunächst wurden 96er-Mikrogefäßplatten (Mikrotiterplatten, Nunc®) mit PolyHEMA (Poly-2-Hydroxyethyl-Methacrylat) beschichtet. Das PolyHEMA-Granulat wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml in 100%igem EtOH vollständig aufgelöst. Die Beschichtung der Mikrogefäßplatten wurde mit 100 µl/Mikrogefäß PolyHEMA-Lösung durchgeführt. Bei 37°C im Trockeninkubator wurde die Lösung 3-4 Stunden getrocknet, wobei das Ethanol verdampfte.

Durchführung des PolyHEMA-Assay (Roche, Mannheim):

Die Zellen wurden ausplattiert (jeweils 150 µl Zellmedium/Mikrogefäß). Die optimale Zellzahl lag bei 1000 Zellen/Mikrogefäß. Es wurden 6 Mikrogefäße pro Zellart gefüllt und 6 Leerkontrollen mit einfach konzentriertem DMEM-Medium/Mikrogefäßplatte parallel durchgeführt. Der so ermittelte Hintergrundwert wurde bei der numerischen Auswertung der Proliferationsmesswerte abgezogen. Es wurden 5 ml vollständig gelöste XTT-Lösung mit 100 µl Elektronen-koppelndem Reagenz gemischt und sodann in jedes Mikrogefäß 75 µl des XTT-Gemisches auf 150 µl Medium gegeben (Konzentration: 0,3 mg/ml). Nach jeweils 0, 30, 60, 120 und 180 min wurde mittels ELISA-Messgerät die optische Dichte bei 490 nm gemessen. Nach drei Stunden wurde SDS/HCL-Lösung (100 µl 20% SDS und 10 mM HCL/Mikrogefäß) mit der Pipette hinzugefügt und sofort erneut gemessen. Die Zugabe von SDS/HCL zerstört die Zellen und stoppt die En-

zymreaktion. Eine letzte Messung wurde nach 24 h durchgeführt. Die in der Arbeit gezeigte graphische Auswertung entspricht den 24-h-Mittelwerten (s. Resultate). Für die graphische Darstellung der Resultate aus den Proliferationstests (XTT-Tests) wurde das Programm Microsoft[®]Excel benutzt.

Elektronen-koppelndes-Reagenz:

0,383 mg/ml 1,25 mM PMS in PBS gelöst

kurz vor Gebrauch vollständig im Warmwasserbad bei 37°C auftauen

stabil bei -20°C lichtgeschützt lagern

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1. Western-Blot

Der Western-Blot dient der immunologischen Identifikation und semiquantitativen Erfassung spezifischer Proteine in Zelllysaten.

Für die Gewinnung der Gesamtproteinextrakte wurde das Medium von den auf Petrischalen kultivierten Zellen (ca. 70% Konfluenz) abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gespült. Daraufhin wurden 3 ml RIPA-Puffer pro 10 cm Schale hinzu gegeben und 10 min Einwirkzeit auf Eis gegeben. Anschließend wurde das Zelllysate mit einem Gummischaber abgelöst. Das Lysat wurde in einen Homogenisator gegeben und mit 5-10 Stößen homogenisiert (mikroskopische Kontrolle, ob Zellen zerstört, oder noch intakt waren).

Das Lysat wurde dann in ein Beckmannzentrifugenröhrchen überführt und mit 1000 rpm 10 min bei 4 °C zentrifugiert (Beckmann-Avanti J25, Rotor JA-20). Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen gefüllt (3 ml/Röhrchen) und im TLA 100.3 Rotor der Ultrazentrifuge (Beckmann TL-100) bei 60000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Für den Nachweis der RAS-Proteine wurden zytoplasmatische Proteine im Rohextrakt abgetrennt. Der die Zytoplasmaproteine enthaltende Überstand wurde verworfen und das Membransediment in ca. 50 µl PBS gelöst. Nach Zugabe von 50 µl 4 x Ladepuffer wurde die Lösung 10 min durch Kochen denaturiert. Sodann wurde die Lösung, um nicht gelöste Partikel zu entfernen, 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

<u>RIPA-Puffer</u>	<u>50 ml:</u>	<u>2% SDS:</u>	
150 mM NaCl	0,438 g	Laurylsulfat	20 g
NP-40 %	5 ml aus 10 %-Stammlsg.	H ₂ O _{DEPC}	1000 ml
0,5% DOC	0,25 g		
0,1% SDS	0,25 ml aus 20% SDS		
50 mM Tris-HCl	2,47 ml aus 1 M-Lösung	<u>Lade-Puffer für Proteine</u>	<u>4x (5 ml):</u>
(pH 8,0)		1 M Tris-HCl	1,2 ml
Erst vor Gebrauch hinzufügen:		DTT	247 mg
Aprotinin	2 µg/ml (20 µl/ml aus 100 µg/ml-stock)	20% SDS	2 ml
Na-Orthovanat	100 µM (1 µl/ml aus 100 µM-stock)	100% Glycerol	2 ml
		Bromphenolblau	0,5 mg
<u>Aprotinin:</u>		<u>Tris HCl, 1M:</u>	
10 mg/ml in 0,01 M HEPES (pH 0,8)		Tris Base	121 g
		H ₂ O	800 ml
		mit konz. HCl den erwünschten pH (7) einstellen, mischen und mit H ₂ O auf 1 l auffüllen.	

Messung der Proteinkonzentration mittels Amido-Schwarzmethode:

Mit einer im gleichen Versuchsansatz mitgeführten BSA-Verdünnungsreihe mit bekannter Proteinkonzentration ließ sich aus den fotometrisch gemessenen Werten eine Eichkurve ermitteln. Anhand der Eichkurve konnten die Konzentrationen der einzelnen Proteinextrakte abgelesen werden.

Zur Proteinmengenbestimmung wurden 1 µl einer BSA-Standardverdünnungsreihe in den Konzentrationen 0,5; 1; 3 und 5 µg/µl zweifach auf ein Filterpapier Proton-Nitrocellulose-Roth (Schleicher&Schuell) mit einer Pipette aufgetragen. Genauso wurde mit den zu bestimmenden Proteinproben verfahren. Dann wurde die Membran 1 min in Amidoschwarzlösung getaucht und anschließend mit Entfärberlösung übergossen. Nur der an das Protein gebundene Farbstoff war als angefärbter Kreis sichtbar. Die Kreise mit der Eichkonzentration und den verschiedenen Proben wurden ausgeschnitten und in Eppendorfgefäßen mit 1 ml Elutionslösung hineingegeben. Für die Leerwertkontrolle wurde nur Elutionslösung in ein Eppendorfgefäß gegeben. Alle Gefäße wurden dann bei Raumtemperatur 30 min lang im Thermomixer geschüttelt, die Extinktion

des Eluats fotometrisch bei 360 nm gemessen und die Konzentration anhand der Referenzwerte errechnet.

Proteinfractionierung:

Die Auftrennung der zellulären Proteine erfolgte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Das Trenngel wurde zunächst zwischen Glasplatten gegossen und auf der Oberkante mit 5 ml Isopropanol überschichtet. Nach 30 minütiger Polymerisationszeit bei RT wurde das Isopropanol abgegossen und die Geloberkante mit H₂O gespült. Das Sammelgel wurde in der Glaskammer über das Trenngel gegossen und ein Teflonkamm für die Geldaschen eingesetzt (Geldicke: 0,5 bis 0,75 mm). Die Glasplatten wurden nach einer halben Stunde in die Elektrophoresekammer (Bio-Rad; Trans-Blot[®]SD) gestellt, der Teflonkamm entfernt und die Kammer mit Lauf-Puffer aufgefüllt.

Jeweils 20 µg von den 10 min lang bei 56 °C denaturierten Proteinproben und von einem Längenstandard (GIBCO[®]) wurden in die Auftragstaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 68V solange, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Danach wurde das Gel für 20 min in Transfer-Puffer gelegt und leicht bewegt.

<u>Trenngel (12%)</u>	<u>5 ml:</u>	<u>Sammelgel (4%)</u>	<u>3 ml:</u>
H ₂ O	1,675 ml	H ₂ O	2,2 ml
1,5 M Tris (pH 8,6)	1,25 ml	1,0 M Tris (pH 6,8)	0,375 ml
20% SDS	25 µl	20% SDS	15 µl
30% Acr/Bis	2 ml	30% Acr/Bis	0,399 ml
10% APS	25 µl	10% APS	15 µl
TEMED	2,5 µl	TEMED	3 µl

5x Lauf-Puffer :

Tris-HCl	15,1 g
Glycin	72 g
SDS (0,5%)	5 g
mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen	

Transfer-Puffer:

Tris-base	5,81 g
Glycin	2,93 g
SDS 10%	3,75 ml
Methanol	200 ml
mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen	

Acrylamid-Bis (pH 7,0), bei 4°C lagern:

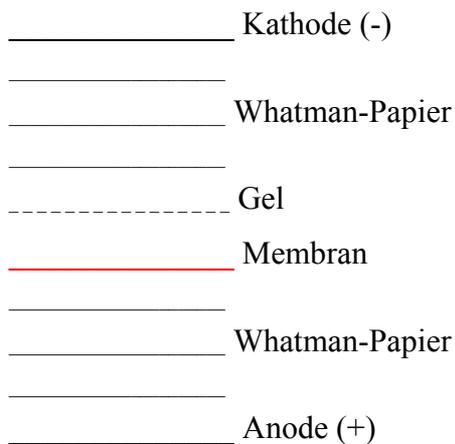
30% Acrylamid (30 g)

0,8% Bisacrylamid (0,8 g)

mit H₂O_{DEPC} auf 100 ml auffüllen

Zum Nachweis der im Gel aufgetrennten Proteine mit einem Antikörper wurden die Proteine vom Gel durch ein elektrisches Blotting-Verfahren auf PVDF-Membranen (Amersham, Hybond™ -P) überführt. Die PVDF-Membranen wurden hintereinander für 5 sec in Methanol, 5 min in H₂O_{DEPC} und 10 min in Transfer-Puffer gelegt. Gleichzeitig wurden 6 Blätter Whatman-Papier in Transfer-Puffer angefeuchtet.

Der Blot wurde dann wie folgt aufgebaut:



Der Transfer der RAS 21 kD Proteine erfolgte auf einem ca. 5 x 5 cm Gel bei 16 Volt für 20 min. Die Membran wurde nach dem Transfer in Ponceau-Rot-Lösung gelegt und die Rotfärbung der Banden abgewartet. Nach 5 min wurde die Membran gründlich mit Wasser abgespült und sofort mit einer 5%igen Magermilch-Lösung 3 h bei RT blockiert. Danach wurde die Membran kurz mit TBST gewaschen und für 1,5 h in mit 5 ml TBST verdünnter erster Antikörperlösung (Anti-pan-RAS, s.u.) gelegt. Nach mehrmaligem Waschen mit TBST, wurde die verdünnte zweite Antikörperlösung (s.u.) für 1 h auf die Membran gegeben. Anschließend folgten wieder mehrere Spülungen mit TBST.

Um die gleichmäßige Beladung mit Gesamtprotein zu überprüfen, wurde das Gel für 1 h in Coomassie-Lösung gefärbt und über Nacht in Coomassie-Entfärber-Lösung gelagert.

Die Detektion der antigengebundenen Antikörper erfolgte mit dem „ECL Western Blotting Analysis System“ der Firma Amersham®. Für die Entwicklung der Western-Blot-Membran wurde auf eine Plastikfolie 500 µl der ECL-Detektionslösung 1 und 500 µl der ECL-Detektionslösung 2 aufgetragen und miteinander vermischt. Die trockengewischte Oberfläche der Membran wurde luftblasenfrei auf dieses Entwicklergemisch gelegt. Nach 1 min Reaktionszeit wurde die Western-Blot-Membran entnommen und, in einer neuen Folie trockengewischt, mit der Proteinseite auf den Film (Hyperfilm™ ECL™, Amersham) gelegt. Der exponierte Film wurde nach 15 sec, je nach Bedarf nach längerer Expositionszeit, entwickelt.

<u>TBST</u>	<u>1 l:</u>	<u>Coomassie-Lösung</u>	<u>500 ml:</u>
1 M Tris-HCl	10 ml	50% Methanol	250 ml
5 M NaCl	30 ml	0,05% Coomassie	0,25 g
100% Tween 20	500 µl	10% Essigsäure	50 ml
		40% H ₂ O	200 ml

Ponceau-Lösung:

2% Ponceau
 30% Trichloressigsäure
 30% Schwefelsalizylsäure
 mit H₂O auf 100 ml auffüllen

Coomassie-Entfärber-Lösung:

40% Methanol
 10% Essigsäure

Blockierungslösung:

5% Magermilch in TBST vollständig auflösen

1. Antikörper:

Anti-pan-Ras (polyklonales Mouse-IgG) der Firma Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.[®]; dieser Antikörper erkennt alle drei Isoformen der RAS-Proteine

2. Antikörper:

Peroxidase-conjugated AffinPure Rabbit Anti-Mouse IgG der Firma Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.[®]

4.2.2. Gesamt-RNA Isolation

Die RNA wurde mittels der Guanidinthiocyanat-Methode nach Chomcynski und Sacchi isoliert. Alle Schritte wurden hierbei auf Eis durchgeführt (Chomcynski, P. et al., 1987).

4.2.2.1. Zelllysis

Nach Entfernen des Mediums wurden die bis auf 70% Konfluenz gezüchteten Zellen einmal mit eisgekühltem PBS gespült. Auf die 10 x 10 cm großen Petrischalen wurden 2,5 ml Lyse-Puffer gegeben (Lösung D), das Lysat nach 2 min mit einem Plastikschaaber abgeschabt und in ein 10 ml Polypropylenröhrchen (Sarstedt) überführt.

Zu dem Lysat von je 5 ml wurden 500 µl 2 M NaAcetat (pH 4,0), 5 ml wassergesättigtes Phenol und 600 µl Chloroform/Isoamylalkohol (25/1) pipettiert und gut vermischt. Die Suspension wurde 15 min auf Eis inkubiert und zur Phasentrennung zentrifugiert (Beckmann Avanti J-25, Rotor JS-13.1, 9000 rpm, 20 min, 4°C). Aus der wässrigen Phase wurde die RNA mit einem gleichen Volumenanteil Isopropanol mindestens 1 h bei -20°C gefällt und anschließend zentrifugiert (Beckmann Avanti J-25, Rotor JS-13.1, 11000 rpm, 20 min, 4°C). Das Pellet wurde mit 3 ml 80%igem Ethanol gewaschen, in 700 µl Lösung D gelöst und nochmals mit 1 Volumenanteil Isopropanol präzipitiert. Nach 1 h Inkubation bei -20°C wurde die gefällte RNA zentrifugiert (Eppendorf 5415C, 14000 rpm, 20 min, 4°C), das Pellet mit 0,5 ml 80%igem Ethanol gespült und danach in 150 µl H₂O gelöst. Um eine vollständige Lösung der RNA zu gewährleisten, wurde sie einige Minuten bei 65°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl 3 M NaAcetat (pH 5,2) und 2,5-fachem Volumen absoluten Ethanols wurde die RNA ein weiteres Mal gefällt. Im gefällten Zustand wurde die RNA bei -20°C in Ethanol oder bei -70°C in H₂O gelöst und aufbewahrt.

Lysis-Puffer/Lösung D:

4 M	Guanidiniumthiocyanat
25 mM	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
0,5%	N-Laurylsarcosine
0,7%	β-Mercaptoethanol (nach dem Autoklavieren zugeben)

20x SSC:

3 M NaCl	175,3 g
0,3 M NaCitrat	88,2 g
in H ₂ O	800 ml lösen
pH 7,0	
	autoklavieren

Der Lysis-Puffer wurde mit H₂O_{DEPC} angesetzt und für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert.

Dann wurde 0,7% β-Mercaptoethanol zugesetzt.

Die Bestimmung der Konzentration und Überprüfung der Reinheit der RNA erfolgte fotometrisch bei 260 bzw. 280 nm (RNA/DNA Calculator der Firma Pharmacia Biotech, Gene Quant II; Präzisionsküvetten der Firma SUPRASIC[®], HELLMMA[®]). Die RNA-Konzentration wurde bei 260 nm bestimmt. Die Extinktion von 1,0 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml. Die Reinheit der RNA wurde anhand des Quotienten aus den Konzentrationen bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt, wobei dieser den Wert 1,8 nicht unterschreiten durfte.

4.2.2.2. RNA-Gelelektrophorese

Es wurde ein 0,8%iges Agarosegel vorbereitet (Elektrophoresekammersystem und Zubehör: Firma Bio-Rad, sub-cell[®] GT). Für 100 ml Gel wurden 0,8 g Agagose in 73 ml H₂O_{DEPC} gelöst. Nachdem das Gel auf 60-70°C abgekühlt war, wurden 10 ml 10x MOPS-Puffer und 5,4 ml 37% Formaldehyd hinzu gegeben. Bei großen RNA-Mengen wurde zusätzlich 1 µl Ethidiumbromid zum Gel hinzugefügt, bei kleineren RNA-Mengen wurde Ethidiumbromid nur zum Lade-Puffer dazugegeben. Vor der Beladung wurde die RNA-Probe und der Lade-Puffer im Verhältnis 1:3 gemischt, die Mischung 2 min bei 90°C denaturiert und sofort danach auf Eis gestellt, um die Renaturierung zu verhindern. Sodann wurde pro Probe je 10 µg RNA nebeneinander auf das Gel aufgetragen.

Die Gelelektrophorese wurde in 1x MOPS-Puffer für ca. zwei Stunden bei 50 V durchgeführt. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert.

<u>Lade-Puffer</u>	<u>2 ml:</u>
H ₂ O _{DEPC}	0,35 ml
10x MOPS	0,21 ml
Formaldehyd	0,35 ml
deionisiertes Formamid	0,96 ml
80%iges Glycerol	0,13 ml
Bromphenol-Blau	wenige Kristalle
Ethidiumbromid	2 µl

4.2.3. Poly(A)+-RNA Anreicherung

Polyadenylierte RNA wurde mittels Oligo-dT-Säulen aus Gesamt-RNA nach Sambrook, J. (1989) hergestellt. Die Qualität und Menge wurde mittels Gelelektrophorese und fotometrischer Bestimmung überprüft.

Zunächst wurden Glaspipetten mit Silanisation-Lösung II (Merck) silikonisiert, um eine Anhaftung der RNA zu vermeiden. Die Pipetten wurden am breiteren Ende mit Glaswolle gefüllt und bei 180°C trocken sterilisiert. Sodann wurde eine Glaspipette senkrecht an einer Halterung befestigt und die Spitze der Pipette mit einem sterilen Gummischlauch versehen. Die so konstruierte „Säule“ wurde mit 3 ml Elutionspuffer durchgespült. Daraufhin wurde die in 3 ml Elutionspuffer gelöste Oligo-dT-Cellulose (1,5-2 cm pro Säule) eingefüllt und mit 3 ml 1x Bindungspuffer gespült. Nach den Erfahrungen unseres Labors war eine Konzentration von 1 µg/µl Gesamt-RNA für diese Methode ideal. Die RNA wurde mit H₂O_{DEPC} sorgfältig gemischt, in 70 °C für 6 min denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Ein gleiches Volumen 2x Bindungspuffer wurde zugeben und gemischt. Die gelöste RNA wurde auf die Säule aufgetragen und der Gummischlauch am Ende der Pipette für 1 min verschlossen. Nach Öffnung des Schlauches wurde die gelöste RNA aufgefangen (ca. 1 Tropfen/sec) und erneut auf die Säule gegeben. Die Säule wurde dann mit einem insgesamt 10-fachen Säulenvolumen (3 ml) an 1x Bindungspuffer gewaschen. Die Waschlösung wurde in einem Volumen von je 1 ml und 0,5 ml in separaten Eppendorfgläsern aufgefangen. In der Regel enthielt das letzte Eppendorfglas nur noch minimale RNA-Reste. Falls noch mehr RNA in der Waschlösung enthalten war, wurde der gesamte Vorgang wiederholt. Zur Elution der Poly(A)+-RNA wurde 1 ml des erwärmten Elutionspuffers (65°C) auf die Säule gegeben und 1 min gewartet. Das Eluat wurde in sterilen Eppendorfgläsern aufgefangen und sofort auf Eis gelegt.

Abschließend erfolgte die fotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung des Eluats. Die Gesamtmenge der eluierten Poly(A)⁺-RNA lag bei 1-2% der Gesamt-RNA.

Die Poly(A)⁺-RNA wurde mit 5 M NaCl-Lösung auf eine Salzendkonzentration von 0,1 M eingestellt und nach Zugabe von 2 Volumenteilen Ethanol absolut (kalt) bei -20 °C für 12 h ausgefällt. Die RNA wurde bei 14000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit einer Beckmann Avanti J-25 Zentrifuge (Rotor JS-13.1) durchgeführt. Das Präzipitat wurde mit 200 µl 80% Ethanol zweimal gewaschen, anschließend in 10 µl H₂O_{DEPC} gelöst und bei -80 °C eingefroren.

<u>Elutionspuffer</u>	<u>60 ml:</u>	<u>2x Bindungspuffer</u>	<u>60 ml:</u>
1 M Tris HCl (pH 7,5)	0,6 ml	5 M NaCl	12 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	120 µl	1 M Tris HCl (pH 7,5)	1,2 ml
20% SDS	0,6 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)	240 µl
mit H ₂ O _{DEPC} auffüllen		20 % SDS	3 ml
		mit H ₂ O _{DEPC} auffüllen	
<u>1x Bindungspuffer</u>	<u>60 ml:</u>		
5 M NaCl	6 ml		
1 M Tris HCl (pH 7,5)	0,6 ml		
0,5 M EDTA (pH 8,0)	120 µl		
20% SDS	1,5 ml		
mit H ₂ O _{DEPC} auffüllen			

4.2.4. Northern-Blot

Für die Analyse differentieller Genexpression zahlreicher Gene hat sich der reverse Northern-Blot bewährt. Die Kandidatensequenzen aus subtraktiven cDNA-Bibliotheken werden mittels Gelelektrophorese und Blotting auf Membranen aufgebracht und mit komplexen cDNA-Sonden hybridisiert. Um die Genexpressionsmuster der drei RAS-Isoformen zu vergleichen, wurde ein initiales Screening mit der reversen Northern-Blot-Methode nach Von Stein, O.D. et al. (1997) durchgeführt. Zur Verifizierung und Quantifizierung der differentiellen Genexpression wurde in einzelnen Fällen die konventionelle Northern-Blot-Methode verwendet. Beim Northern-Blot

wird die Gesamt-RNA nach ihrer Größe in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Membran transferiert und hybridisiert.

4.2.4.1. Konventioneller Northern-Blot

4.2.4.1.1. Membranherstellung

Für den konventionellen Northern-Blot wurden insgesamt 60 Membranen hergestellt.

Vor Durchführung der Gelelektrophorese wurde die Konzentration der RNA der verschiedenen Zelllinien (H-, K- und NRAS-transformierte Zellen, Src-transformierte Zellen und 208F-Zellen) berechnet. In der Regel wurde die fotometrisch bestimmte Konzentration mit Hilfe eines Testgels bestätigt und im Falle von Abweichungen angeglichen. Sodann wurde die Gelelektrophorese mit einem 0,8%igem Agarosegel mit 10-15 µg der jeweiligen RNA pro Geltasche durchgeführt.

Das Gel wurde fotografiert und dreimal 10 min in 5x SSC und einmal 10 min in 10x SSC unter leichter Bewegung gespült. Die Gesamt-RNA wurde über 16 h in Transfer-Puffer auf eine gleich große 3 x 4 cm RNA-Membran (Schleicher&Schuell, Protan R Nitrocellulose-Membran) transferiert. Zur Kontrolle des RNA-Transfers wurde die Membran unter UV-Licht analysiert und die RNA auf der Nitrocellulosemembran fixiert.

Transfer-Puffer: 48 mM Tris-HCl (pH 8,3), 39 mM Glycin, 20% Methanol

4.2.4.1.2. Sondenherstellung

Zur Sondenherstellung wurden die mittels PCR reamplifizierten cDNA-Fragmente (siehe Zuber, J. et al., 2000) mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Herstellerprotokoll) gereinigt und ihre Konzentration fotometrisch bestimmt.

Zur Markierung wurden je 30 ng amplifiziertes DNA-Fragment unter Benutzung des Rediprime II DNA Labelling Systems (Amersham Pharmacia Biotech) mit 50 µCi α -[³²P]-dCTP (3000Ci/mmol; ICN) nach dem Protokoll des Herstellers radioaktiv markiert. Die markierte Sonde wurde mittels QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Herstellerprotokoll) gereinigt. Die durchschnittliche Aktivität der markierten Sonden lag bei $5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ cpm/µg.

4.2.4.1.3. Hybridisierung

Die Hybridisierung der Membranen wurde mit der Formamid-Methode durchgeführt. Die Northern-Blot-Membranen wurden kurz in 2x SSC angefeuchtet und anschließend in 3 ml Hybridisierungspuffer in 10 ml Röhrchen (Thermo Hybaid HB-OV-BS) im Hybridisierungsinkubator (Hybaid Shake`n`Stack oder Biometra Compact Line OV4) unter ständiger Rotation für mindestens 3 h bei 42°C vorhybridisiert. Nach Entfernung des Hybridisierungspuffers wurden die Membranen mit neuer Hybridisierungslösung (3 ml) und 20-50 ng der mit ³²P-dCTP-markierten cDNA-Sonde (ca.100 µl) für mindestens 16 Stunden bei 42°C hybridisiert. Durch anschließendes Waschen der Membranen mit warmem SSC in absteigender Konzentration (Waschlösung I und II) bei 42°C (Lösung I) und 60°C (Lösung II) wurden nicht gebundene cDNA-Sondenreste entfernt.

Anschließend wurden die Membranen in Folie eingeschweißt, mit einem Röntgenfilm (Kodak) belegt und bei -80°C je nach Grad der radioaktiven Markierung einige Stunden bis mehrere Tage exponiert. Die Filme wurden mit dem Hyperprocessor der Firma Amersham Life Science entwickelt.

Zur Ladekontrolle wurde nach Abklingen der radioaktiven Sonde jede Membran mit einer ³²P-markierten 28S RNA-Sonde noch einmal hybridisiert.

Hybridisierungspuffer für Northern-Blot:

50% deionisiertes Formamid

5x SSC

5x DENHARDT`s-Lösung

0,1% SDS

100 ng/ml tRNA

H₂O_{bidest.}

Waschlösung I:

2x SSC

0,1% SDS

Waschlösung II:

0,1x SSC

0,1% SDS

1x MOPS-Puffer

4.2.4.2. Reverser Northern-Blot

4.2.4.2.1. Membranherstellung

Für den reversen Northern-Blot wurden Hybridisierungsmembranen (DO1, DO2, DO3, DT2 und DT3) mit je 96 cDNA-Fragmenten hergestellt. Die Gele für die Membranen DO1, DO2 und DO3 wurden mit Genen (cDNA) bestückt, die in HRAS-transformierten Rattenfibroblastenzellen (FE8) im Vergleich zu den nicht-transformierten 208F-Zellen und/oder die in KRAS-transformierten Ovarialepithelzellen (ROSE A2/5) im Vergleich zu den nicht-transformierten ROSE-199-Zellen erhöhte mRNA-Spiegel aufwiesen (hochregulierte Gene). Die Gele für die Membranen DT2 und DT3 wurden mit Genen bestückt, die in den transformierten Zellen erniedrigte mRNA-Spiegel aufwiesen (reprimierte Gene). Zur Kontrolle und zur späteren Normierung der Hybridisierungsintensitäten wurden die "House-keeping"-Gene beta-Actin und GAPDH, sowie das reprimierte Kontrollgen Thrombospondin mehrfach auf die Hybridisierungsmembranen aufgebracht.

Jeweils in Position H12 eines jeden Gels ist die GAPDH-Positiv-Kontrolle mitgeführt (s. Koordinatenraster über jeder Membran, Anhang, 9.1.). Die Gennamen mit ihren Koordinaten finden sich in den Tabellen 3 und 4 unter Resultate. Für die Hybridisierung mit Sonden aus HRAS-, KRAS- und NRAS-transformierten Zellen wurden von jeder reversen Northern-Blot Membran drei Exemplare hergestellt.

Die cDNA-Fragmente (20-30 ng/μl) wurden mit je 1/5 Volumen Ladepuffer versehen und auf 1%igen Agarose-TAE-Gelen mit 3 μl EtBr/100 ml aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei 100 V in 15 min durchgeführt. Das Gel wurde zweimal 30 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und zweimal 30 min in Neutralisationslösung (1,5 M NaCl, 1 M Tris pH = 7,4) gelegt. Anschließend wurde die cDNA mindestens 12 h auf eine Hybond-N⁺-Membran (Amersham Pharmacia Biotech) transferiert. Danach wurde die cDNA durch zweiminütige UV-Bestrahlung an die Membran gebunden. Die Membran wurde, in Folie eingeschweißt, bei -20°C bis zu Hybridisierung aufbewahrt.

1x TAE:

0,04 M Tris-acetat

1 mM EDTA

1,0% DNA-Gel:

1 g Standard-Agarose auf 100 ml 1x TAE

4.2.4.2.2. Sondenherstellung

1 µg Poly(A)⁺-RNA (s.o.) und 1 µl Oligo-dT-Primer (200 ng) wurden mit H₂O auf 8,75 µl Volumen gebracht, 10 min bei 70°C inkubiert und auf Eis gelagert. Sodann wurden 5 µl Erststrang-Synthese-Puffer (Firma Roche Mega prime), 2,5 µl DTT und 1,25 µl d(ATP+GTP+TTP, je 0,5 mmol) dazugegeben. Danach wurden 5 µl [³²P]-dCTP (10 mCi/ml) hinzugefügt und die Lösung 2 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Nach Zugabe von 1,25 µl RT-Superscript (GIBCO-Life Technologies) und erneuter Inkubation für 20 min bei 37°C im Thermomixer wurde 1,25 µl dCTP (0,3 mmol) zur Lösung gegeben und diese nochmals bei 37°C 40 min inkubiert. Nach der Markierung wurden 25 µl 1x TE-Puffer hinzugegeben und nicht eingebaute Nukleotide mittels Passage durch eine G50-Sephadex-Säule (Stratagene) entfernt. Dazu wurde die unbeladene Säule 1 min bei 3000 rpm durch Zentrifugation (Zentrifuge: Eppendorf, s.o.) äquilibriert. Anschließend wurde 50 µl der Probe auf die Oberfläche der Sephadex-Masse gegeben und wieder bei 3000 rpm 1 min (s.o.) zentrifugiert. Das Eluat wurde nach Zugabe von 1/10 Volumen Denaturierungspuffer (Stratagene) für 20 min bei 68°C denaturiert. Dieser Schritt wurde nach Zugabe von 3 µl COT1-DNA und 1 Volumen 1 M PB nochmals wiederholt. Zweck der Zugabe von COT1-DNA ist die Absättigung der repetitiven Sequenzen während der folgenden Hybridisierung und das Erreichen einer höheren Spezifität der Hybridisierung. Die markierte Probe wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)

1 mM EDTA (pH 6,8)

4.2.4.2.3. Hybridisierung

Die reversen Northern-Blot-Membranen wurden mit H₂O_{bidest.} gewaschen und mit 30 ml Prähybridisierungspuffer bei 66°C für 3 h in Glasgefäßen im Rotationsinkubator (Thermo Hybaid) inkubiert. Nach Entfernung der Prähybridisierungslösung wurden die Membranen in 30 ml Hybridisierungspuffer, versehen mit den markierten Poly(A)⁺-RNA-Sonden (ca. 1 x 10⁸ cpm/ml), unter ständiger Rotation für mindestens 16 h bei 66°C hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit radioaktiv markierten Gensonden aus RNA von H-, K- und NRAS-transformierten Zellen. Anschließend wurden die Membranen unter Rotation im Hybridisierungsofen mit Waschlösung I bei 42°C für zweimal 15 min gewaschen. Schließlich wurden die Membranen mit

Waschlösung II bei 42°C für 15 min, bei 66°C für 30 min und bei 68°C für 60 min gewaschen. Die feuchten Membranen wurden dann in Folie eingeschweißt.

Prähybridisierungspuffer:

5x DENHARDT's Lösung
5x SSC
50 mM Phosphatbuffer (pH 7,2)
0,5% SDS
100 ng/ml tRNA
H₂O

Hybridisierungspuffer:

5x SSC
0,5% SDS
0,05% Triton X-100
100 ng/ml tRNA
H₂O

4.2.4.3. Semi-quantitative Auswertung der Daten aus den konventionellen und reversen Northern-Blots

Für die densitometrische Auswertung der Signale wurden die belichteten Röntgenfilme mit einem Scanner (PhosphoImager, Bio-Rad) eingelesen und die Signalstärke der Banden densitometrisch gemessen (Molecular Analyst Programm, Biorad).

Anschließend wurden die Absolutwerte der Signale ins Verhältnis mit den Ergebnissen der jeweiligen Ladekontrolle gesetzt, um unterschiedliche Ladungsmengen auf den jeweiligen Membranen auszugleichen. Als Ladekontrolle wurde beim konventionellen Northern-Blot ribosomale 28S-DNA verwendet, mit der die Filter nach Abklingen der gebundenen radioaktivmarkierten Sonde von der ersten Hybridisierung ein weiteres Mal hybridisiert wurden. Beim reversen Northern-Blot diente GAPDH als Ladekontrolle. Die Signale der zu untersuchenden Gene und der von GAPDH wurden dabei manuell umfahren und densitometrisch ausgewertet, um die Hybridisierungsintensität der cDNA aus den verschiedenen RAS-transformierten Zelllinien vergleichen zu können. Zunächst wurden die Absolutwerte der GAPDH-Signale (in counts x mm²) der zu vergleichenden Filter (z.B. DO1-Filter) zueinander ins Verhältnis gesetzt. Der Absolutwert jedes Gensignals auf einer Membran wurde sodann ins Verhältnis zum GAPDH-Faktor derselben Membran gesetzt. Um nun die Gene auf den mit H-, K- und NRAS hybridisierten Membranen vergleichen zu können, wurden die normalisierten Werte der Gensignale untereinander ins Verhältnis gesetzt, so dass das schwächste Signal den Wert eins erhielt. Ein nicht erfassbares Signal erhielt den Wert Null.

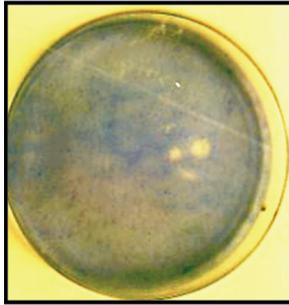
5. Resultate

5.1. Phänotypische Charakterisierung von Fibroblasten, welche durch onkogene RAS-Isoformen und das Src-Onkogen transformiert wurden

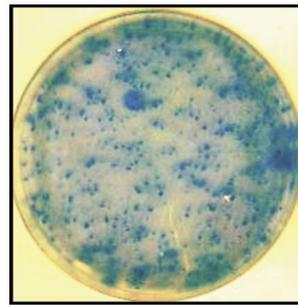
Mit dem Klon FE-8 und dem Klon Src 3 standen für den Vergleich der Genexpression bereits HRAS- bzw. Src-transformierte 208F-Fibroblasten zur Verfügung (Griegel, S. et al., 1986; Iten, E. et al., 1989). Die FE-8 Zellen wachsen ankerunabhängig, d.h. sie sind in der Lage, in halbfestem Agarmedium Kolonien zu bilden. Diese Eigenschaft korreliert sehr gut mit der Tumorgenität. Tatsächlich bilden FE-8 Zellen nach subkutaner Infektion in thymus-aplastischen Nacktmäusen rasch wachsende, stark vaskularisierte Tumoren (Griegel, S. et al., 1986). Die präneoplastischen Vorläuferzellen 208F zeigen auch nach langer Kultivierung keine spontane Transformation. Die KRAS- und NRAS-transformierten Zellen wurden gemäß der Beschreibung in Material und Methoden hergestellt. Für die Analyse der Genexpression wurden die Klone KRAS 3 und NRAS 3 ausgewählt, da ihre Morphologie gegenüber den anderen Klonen homogener und die Tendenz zur malignen Entartung ausgeprägter war.

Das typische Wachstumsverhalten transformierter Zellen wurde anhand eines Fokusbildungsassays (Abb. 5) und des ankerunabhängigen Wachstums in Weichagar (Abb. 6) und auf PolyHEMA-beschichteter Oberfläche (Abb. 7) gezeigt.

Im Fokusbildungsassay wuchsen nach zwei Wochen Wachstumszeit die Kontrollzellen in Form eines gleichmäßigen, konfluenten Zellrasens. Die KRAS-transformierten Zellen bildeten typische Zellnester (Foci) auf dem Rasen nicht transformierter Zellen aus, welche sich besonders ausgeprägt mit Methyleneblau anfärben ließen. Die Foci repräsentieren Zellklone, welche die dichteabhängige Wachstumskontrolle verloren haben.



208F-Zellen



KRAS-transformierte Zellen

Abb. 5: Vergleich des dichteabhängigen Wachstums normaler und KRAS-transformierter 208F-Fibroblastenzellen (Methyleneblaufärbung). Das Bild entspricht einer 10cm Ø Petrischale.

In halbfestem Agarmedium bildeten KRAS-transformierte Zellen im Vergleich zu den normalen 208F-Vorläuferzellen Kolonien aus. Hier werden exemplarisch zwei der multiplen Kolonien gezeigt.

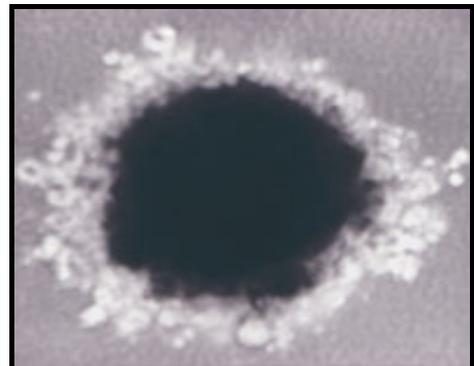
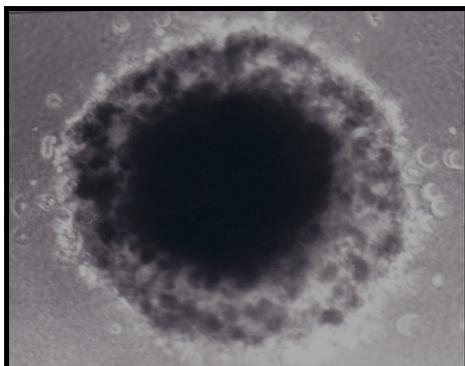


Abb. 6: KRAS-transformierte Fibroblastenzellen im Weichagarmedium nach einer Proliferationsdauer von 3 Wochen (Dunkelfeldmikroskop, 40-fache Vergrößerung).

Alternativ zur Kultivierung in Weichagarmedium wurden die transfizierten Zellen auf Zellkulturgefäßen gezüchtet, welche mit dem Methacrylat Poly-HEMA beschichtet waren. Poly-HEMA verhindert eine Anhaftung von Zellen und erzeugt Zelltod in ankerabhängigen Normalzellen, während transformierte Zellen unter diesen Bedingungen proliferieren. Die Proliferation der Zellen wurde mittels XTT-Test erfasst (Abb. 7).

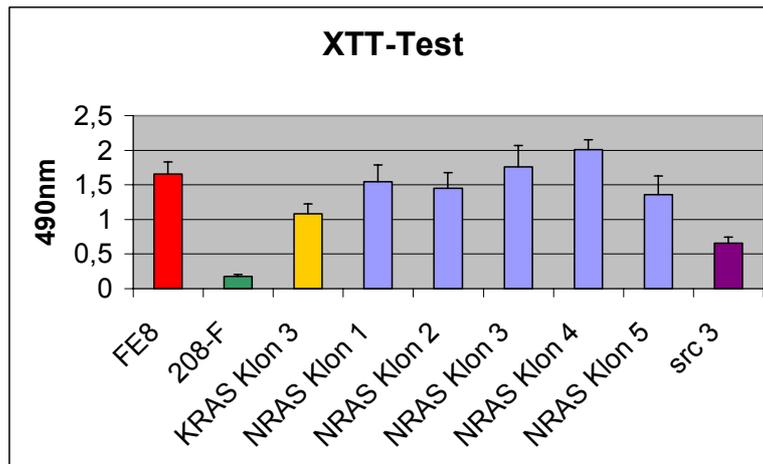
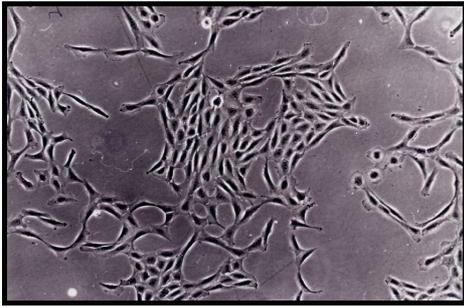
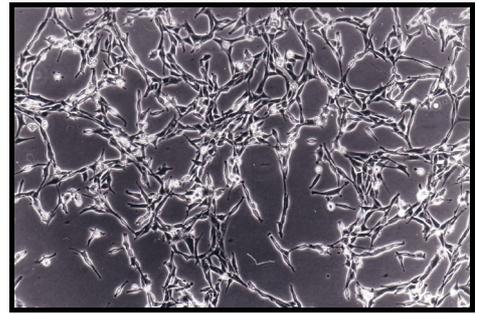


Abb. 7: Vergleich der Proliferationsraten HRAS- (FE8), KRAS-, NRAS- und Src-transformierter Rattenfibroblastenzellen und nicht-transformierter (208F) Zellen auf Poly-HEMA-beschichteter Oberfläche (Proliferationsdauer 5 Tage, Mittelwerte aus 6 Messungen).

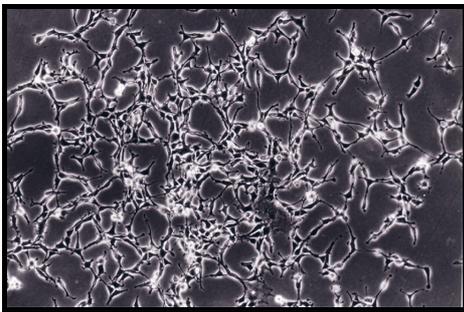
Um die Morphologien der Vorläuferzellen und der transformierten Zelllinien charakterisieren zu können, wurde ihr Wachstum auf unbeschichteten Oberflächen verglichen. KRAS- und NRAS-transformierte Zellen weisen eine typische transformierte Zellgestalt auf, wie sie auch in FE8-Zellen und Src-Zellen gefunden wird (Abb. 8).



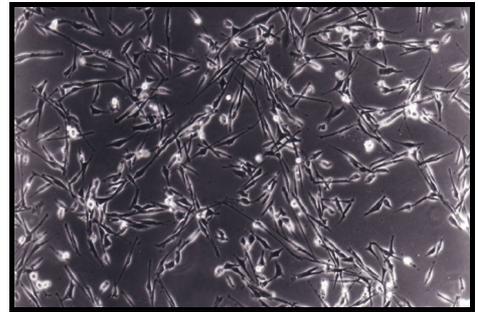
Population von 208F-Zellen



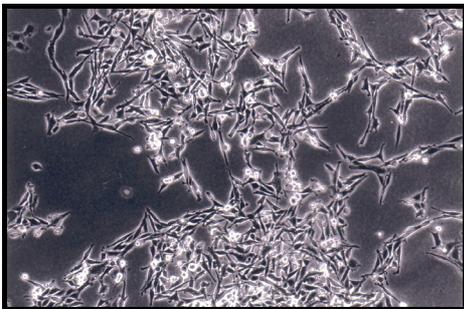
Population Src 3-transformierter
Zellen



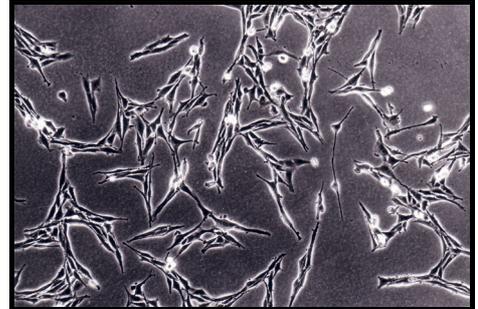
Population von FE8-Zellen
(HRAS-transformierte Zellen)



Klon 3 KRAS-transformierter
Zellen



Klon 3 NRAS-transformierter
Zellen



Klon 4 NRAS-transformierter
Zellen

Abb. 8: Zellgestalt 208F-, FE-8-, NRAS-, KRAS- und Src-transformierter Fibroblastenzellen auf der unbeschichteten Oberfläche einer Zellkulturschale nach einer Proliferationsdauer von 3 Tagen (Phasenkontrastmikroskop, 100-fache Vergrößerung).

Zur Bestimmung der Expression der onkogenen RAS-Proteine in den verschiedenen Zelllinien wurde die Western-Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 9). Die Zelllysate wurden nach Erreichen von 80%iger Wachstumskonfluenz der jeweiligen Zelllinien gewonnen.

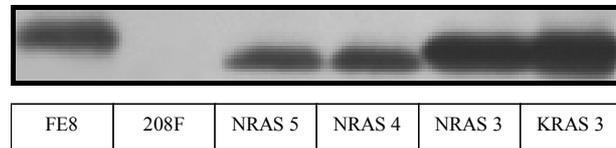


Abb. 9: Nachweis der p21-RAS Expression in Lysaten transformierter Zellen und normaler 208F-Fibroblasten

5.2. Vergleich der Genexpressionsprofile RAS-transformierter Zellen

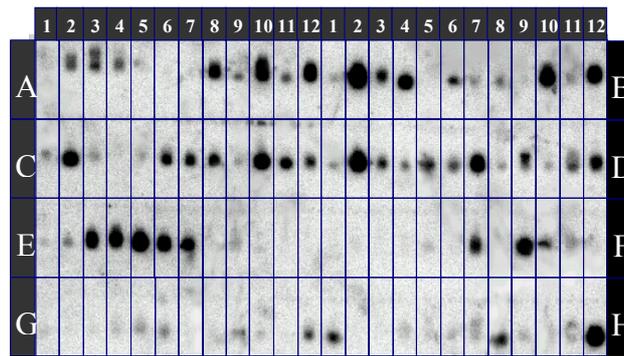
5.2.1. Konsistente Deregulation von Zielgenen in Zellen, die durch H-, K- und NRAS-Isoformen transformiert wurden

Insgesamt habe ich die Expression von 430 verschiedenen Genen und noch nicht charakterisierten Sequenzen, „expressed sequence tags“ (EST), oder noch unbekanntem Gensequenzen (no id), untersucht. Diese Sequenzen sind in HRAS-transformierten Zellen relativ zu 208F-Zellen, sowie in KRAS-transformierten Ovarial-Oberflächenepithelzellen (ROSE) relativ zu den normalen Vorläufern transkriptionell stimuliert oder reprimiert (Zuber, J. et al., 2000; Tchernitsa, O. et al., 2004).

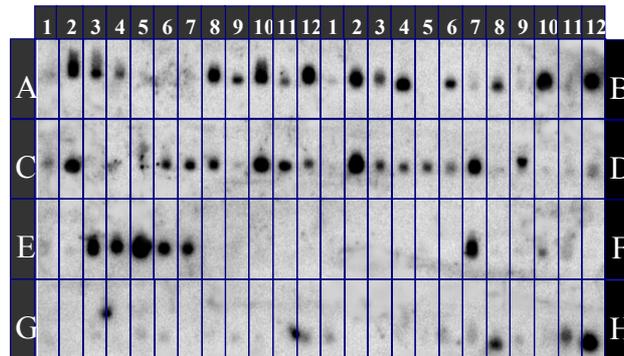
5.2.2. Spezifische Effekte der Expression der RAS-Isoformen auf die Transkription in transformierten Zellen

5.2.2.1. Analysen mit reversem Northern-Blot

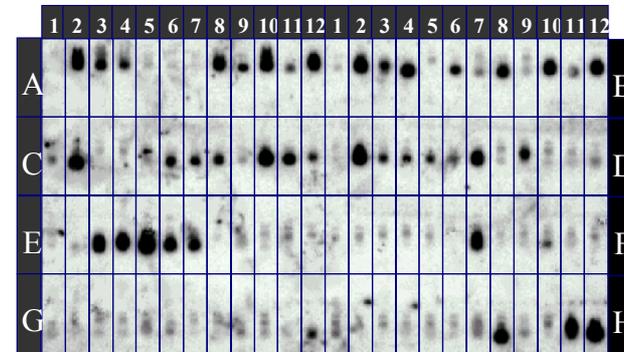
Mittels **reversem Northern-Blot** wurden 417 Gene in drei Zelllinien analysiert, die zuvor mit dem HRAS-, KRAS- oder NRAS-Onkogen transformiert worden waren. Das Ergebnis einer typischen Hybridisierung ist in Abb. 10 dargestellt. Alle Autoradiogramme der Originalblots sind - der besseren Übersichtlichkeit halber - im Anhang (Kap. 9.1.) dargestellt.



DO2, Sonde: ^{32}P -markierte cDNA aus HRAS-transformierten Zellen



DO2, Sonde: ^{32}P -markierte cDNA aus KRAS-transformierten Zellen



DO2, Sonde: ^{32}P -markierte cDNA aus NRAS-transformierten Zellen

Abb. 10: Die 3 Membranen sind jeweils mit denselben Genen bestückt, deren Namen mit der entsprechenden Position in Tabelle 3 und 4 aufgelistet sind. In Position H12 wurde jeweils eine GAPDH-Kontrolle zur Normalisierung der Hybridisierungsintensitäten mit durchgeführt.

In Tabelle 3 sind diejenigen Gene aufgelistet, deren Expression unter den RAS-Zelllinien differentiell ist. In den Zelllinien, die mit HRAS-, KRAS- oder NRAS-Onkogenen transformiert wurden, zeigen die reversen Northern-Blots zum Teil erhebliche Unterschiede in der mRNA-Expression der Zielgene. Dabei ist ein 10-faches mRNA-Niveau, relativ zu den anderen transformierten Zellen, ausschlaggebend für einen verwertbaren Expressionsunterschied. Wenn das Expressionsniveau in nur einer der verglichenen Zelllinien zusätzlich einen 5-fachen mRNA-Niveau Unterschied im Vergleich zu den anderen transformierten Zelllinien erreichte, wird dies als RAS-„isoformspezifische“ Zielgenexpression gewertet (Tbl. 3, rot und blau markierte Zahlen). Die untersuchten Gene wurden nach den Funktionsklassen ihrer Produkte eingeteilt.

In Tabelle 4 sind die Gene aufgelistet, die als isoformneutral angesehen werden, d.h. keinen 10-fachen mRNA-Niveau Unterschied untereinander zeigen. Sie sind nicht nach Funktionsklassen unterteilt.

In den folgenden Tabellen sind weitere Symbole zu erläutern:

* = Signal der Genexpression laut konventionellem Northern-Blot im reversen Northern-Blot zu niedrig/nicht exprimiert;

n.d. = nicht durchgeführt

Die untersuchten Gene werden entsprechend der Membranen (DO1-3 und DT2, 3) in hochregulierte Gene in RAS-Zelllinien versus 208F-Normalzellen (DO-Membrane) und in reprimierte Gene in RAS-Zelllinien versus 208F-Normalzellen (DT-Membrane) unterteilt.

Insgesamt werden im reversen Northern-Blot 107 (26%) der 417 untersuchten Gene unter den HRAS-, KRAS- und NRAS-transformierten Zellen differentiell exprimiert. Dabei finden sich 62 Gene unter den hochregulierten und 45 Gene unter den reprimierten Genen. Es gibt 50 isoformspezifische Gene einer der drei RAS-Zelllinien (12%), davon jeweils 33 unter den hochregulierten Genen und 17 unter den reprimierten Genen.

Die restlichen 310 Gene (74%) werden nicht differentiell exprimiert.

Die Auswertung der Expressionslevel erfolgte densitometrisch. Schwache Expressionsunterschiede sind daher in den jeweiligen Abbildungen der Blots unter Umständen nicht zu erkennen.

Tabelle 3

Reverse Northern-Blots
Relative Niveaus der Genexpression in HRAS-, KRAS- und NRAS-transformierten 208F-Fibroblasten
-isoformspezifische Unterschiede-

In transformierten Zellen relativ zu normalen Vorläuferzellen hochregulierte Gene

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
------------------------	---------------	---	---	---	---

Signal-moleküle

BEM-3	D45414	16	1	1,1	DO2 C3
PKC-zeta-interacting protein	Y08355	1	3,5	22,7	DO1 B3
PP-1 (protein phosphatase type 1 alpha) (PPP1CA)	D00859	20,2	26,6	1	DO1 F11

Kernproteine (Transkriptionsfaktoren, DNA-prozessierende Enzyme)

DDB1	U18299	1	25,5	7	DO1 B6
HMG1-C (HMGIC)	X92518	1	19	2,7	DO1 A8
SF3a120 (SFRS8)	X85237	1	21	5	DO1 A7
Stromal antigene SA-1	Z75332	7,4	1	33,4	DO2 E1

Proteinprozess-, Proteintransport-, Proteinfaltungsmoleküle

Proteasome subunit p42	D78275	2	1	12	DO1 A9
GRP78 (HSPA5)	M14050	10	1	1	DO1 D11
Glucocerebrosidase (Gba)	M24119	1	0	10	DO1 E3
Quinone reductase (CRYZ)	J02640	1	5	11,5	DO1 E10
Glutaminyl-tRNA synthetase	X54326	15,8	1	9,4	DO1 F7

Metabolische Enzyme, Transporter, Ionenkanäle

Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (SOAT1)	S81092	1	6,2	12,6	DO1 G1
Aldehyde oxidase (hAOX1)	L11005	1	46	28	DO1 F9
Bleomycin hydrolase (Blmh)	D87336	3	1	11,8	DO2 B9
CIC-6a	X99473	15,6	1	6,1	DO2 D1
CYP2A2	M33313	1	3,5	21,3	DO1 D8
Glucose-6-phosphatase dehydrogenase (G6pdx)	X07467	1	10	0	DO1 C8
Mitochondrial trifunctional protein	D16478	1,8	1	20,3	DO2 B5
Phosphoglycerate kinase 1 pseudogene1 (Pgk1-ps1)	M23961	0	10	1	DO1 H2
Tap1 (peptide transporter) (TAP1)	Y10233	1	46,2	27,2	DO1 A4
Transcript ass. with monocyte differentiation (MMD)	X85750	1	20,5	9	DO1 B7

Tabelle 3

Genname (GenBank/EMBL) Akzessionsnr. H K N Position auf RN-Membranen
im Anhang unter 9.1.

Zytoskelettkomponenten, Adhäsions- und Zell-Zell-Interaktionsmoleküle

Dynamamin	L24562	1	36	0	DO1 D3
LAP1(lamin-associated protein 1c)	U19614	2	1	10,8	DO1 G6
Thymosin-b 4 (Ptmb4)	M34043	1	14	3,3	DT2 A6

Andere

AF-9	L13744	1	8	122	DO3 H7
Calmodulin (Calm)	AF178845	1,8	12,3	1	DT2 A12
HMG-box containing protein 1	U09551	2,7	1	137	DO3 G12
Homo sapiens cDNA FLJ12528fis, clone NT	AK022590	1	1,1	16,2	DO2 G10
Homo sapiens chromosome 17, clone hRPK...	AC005921	1,6	1	25	DO2 F3
Homo sapiens clone 24667 mRNA sequence	AF052154	1	68,5	98	DO3 B5
Homo sapiens hypothetical protein FLJ11105	NM_018323	24,5	1	34,1	DO2 H4
Homo sapiens hypothetical protein FLJ20445	NM_017824	11,1	1	9,4	DO2 G4
Homo sapiens PHD finger protein 2 (PHF2)	NM_005392	6,2	1	11,6	DO3 E4
Mem3 (maternal-embryonic 3) (Mem3)	U47024	1	3,6	53,1	DO1 A10
Mus musc. arsenite inducible RNA	AF224494	1	2	19,3	DO2 H3
Mus musc. Coronin, actin binding protein 1C (Coro1c)	NM_011779	16,9	1	24,7	DO3 D2
Mus musc. Scmh1 mRNA for sex comb on...	AB030906	147	1	8	DO2 F9
Psme3 gene	AB007139	1	6,8	42,6	DO1 C11
SET	S68589	1,3	1	70,8	DO3 H6
Stromal cell protein mRNA	U47323	1	2,5	20	DO1 E11

Tabelle 3

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
Andere					
EST AA 033299	AA033299	1	2,1	147	DO3 C4
EST AA 445434	AA445434	4,3	1	37,2	DO2 F4
EST AA 516783	AA516783	1	3,2	17,2	DO2 H5
EST AA 544605	AA544605	1,6	1	25,4	DO2 H2
EST AA 560946	AA560946	1,9	1	20,3	DO2 G2
EST AA 734750	AA734750	2,7	1	41,1	DO3 A8
EST AA 794809	AA794809	1	99,3	62,8	DO3 C5
EST AA 896712	AA896712	1	4,1	14,8	DO3 C2
EST AI 013714	AI013714	6,4	1	43,7	DO2 F12
EST AI 115302	AI115302	7,2	1	25,7	DO2 E12
EST CO 6929	CO6929	3,7	1	16,1	DO2 F2
KI AA 0287	AB006625	1	1,6	10,6	DO2 F8
KI AA 0595	AB011167	1	18,5	8,1	DO3 C6
no id 1		1,8	1	285	DO3 B8
no id 10		1	3,7	12,5	DO3 A12
no id 14		1	8,5	241	DO3 B12
no id 17		3,9	1	11,4	DO2 G1
no id 21		34,9	1	56,6	DO3 B6
no id 27		13	1	4	DO3 F4
no id 28		1	41,3	14,8	DO3 E2
no id Y		23,9	1	17,3	DO3 E7

Tabelle 3

In transformierten Zellen relativ zu normalen Vorläuferzellen reprimierte Gene

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
Signalmoleküle					
cAMP-dependent protein kinase type II	M12492	19	23	1	DT3 D4
MMAC1/PTEN	AF017185	1	36,7	4,5	DT2 G8
MST2 kinase (Stk3)	AJ001529	1,8	14	1	DT3 D7
Kernproteine (Transkriptionsfaktoren, DNA-prozessierende Enzyme)					
Cdc21 (Mcnd4)	D26089	1	14	4,2	DT3 C1
DNA repair protein RAD50 (Rad50)	U66887	3,6	10,4	1	DT3 C8
ETF TEA domain transcription factor	D83596	1	14,8	4,3*	DT2 C4
Helicase p68 (DDX5)	AF015812	3	22	1	DT3 D1
TFII-I (TFII-I)	AF043220	1	31,3	5	DT2 E8
WHN	Y08910	1	49,5	1,8	DT2 D7
Proteinprozess-, Proteintransport-, Proteinfaltungsmoleküle					
MG-160 golgi sialoglycoprotein	U08136	1	14,5	4,5	DT2 H1
Na, K-ATPase (ATP1B1)	J02701	1	10,2	1	DT2 B9
Zytoskelettkomponenten, Adhäsions- und Zell-Zell-Interaktionsmoleküle					
Ryudocan (Sdc4)	M81786	1	38,6	2,8	DT2 B2
Extrazelluläre Proteine					
Entactin/nidogen (nid)	X14194	1	12,6	2,9	DT2 G7
Fibulin-2 (FBLN2)	X75285	1	11,3	90	DT2 E11
Laminin B1 (Lamb1-1)	M15525	14	7,5	1	DT3 C7
Lysyl oxidase-related protein (LOXL2)	U89942	1	19,4	2,4	DT2 H2
MMP-2, gelatinase A (Mmp2)	U65656	1	15	2	DT2 H6
Plasminogen activator (t-PA) (Plat)	M23697	1	10,2	1,2	DT2 A5

Tabelle 3

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
		Andere			
1,3 galNAc alpha2,3-sialyltransferase	X76988	1	27,5	4	DT2 E5
Ania-6	AF030091	3,8	10,8	1	DT3 D8
Antiquitin (ATQ1)	S74728	1	17	4,2	DT2 G12
Calcium-dependent serine proteinase (CASP)	D88250	1	17,7	4,7	DT2 F2
CBP20	X84157	2,2	14,3	1	DT3 F11
Connexin 43 (GJA1)	X06656	1	43,2	16	DT2 E1
Homo sapiens cDNA FLJ10400fis, clone NT	AK001262	1	27,3	5	DT2 E6
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434O086	AL137303	4	1	31	DT2 C10
Inositol hexakisphosphate kinase	AB049151	1	15	3,8	DT2 E2
Liprin-beta 1 (PPFIBB1)	AF034802	1	32,5	9,5	DT3 E3
Mitogen responsive 96 kDa phosphoprotein p96	U95177	62	74	1	DT3 D9
Mss4		1	314	20	DT2 H4
Mus m. X-chromosome myotubularin	AF125314	2	1	40	DT2 D4
p53 binding protein Bbp/53BP2	U58881	1	74	7	DT3 D12
EST AA 014478	AA014478	1	32	7	DT2 C1
EST AA 028510	AA028510	1	70,5	20	DT3 F12
EST AA 517260	AA517260	15	1	34	DT3 H3
EST AA 530598	AA 530598	1	3,5	16	DT2 F9
EST AA 833123	AA833123	1	307	11	DT2 F10
EST AA 859885	AA 859885	1	13,8	4,2	DT2 D1
EST AA 874786	AA874786	1	27,3	73	DT2 F1
EST AA 900577	AA900577	1,5	10,3	1	DT3 E12
EST AA616118	AA616118	1	9,3	102	DT2 F4
EST AI 030422	AI030422	3	32	1	DT2 A8
EST AI 047865	AI047865	8,7	15,1	1	DT2 C12
KI AA 0128 sim. to SEPTIN2 AK001711	D50918	4,1	12,9	1	DT3 C12
no id 8		1	55,2	1,5	DT2 B4

Tabelle 4

Reverse Northern-Blots
Relative Niveaus der Genexpression in HRAS-, KRAS- und NRAS-transformierten 208F-Fibroblasten
-isoformneutrale Unterschiede-

In transformierten Zellen relativ zu den normalen Vorläuferzellen hochregulierte Gene

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
ubiquinol-cytochrome-c reductase	X59693	1,1	1,9	1	DO1 A1
chloride channel RCL1	D13985	2,2	2,6	1	DO1 A2
ABC transporter Moat-B (ABCC4)	AF071202	0*	0*	0*	DO1 A3
Lipocortin I	Y00446	2,2	7,5	1	DO1 A5
rpt-1r	J03776	1	5,3	2,7	DO1 A6
Peg3 (paternally expressed gene 3) (PEG3)	AF038939	1	3,1	6,3	DO1 A11
proteoglycan	M13518	1	6	8	DO1 A12
Nexin	M17784	1	5,5	1,5	DO1 B1
ribonuclease inhibitor	X62528	1	1	1,6	DO1 B2
GRP75	S78556	9,4	2,6	1	DO1 B4
NPRAP	U90331	1	4,4	1,1	DO1 B5
p21-Arc (ARPC3)	AF004561	1	2,8	0*	DO1 B8
aminopeptidase N	M25073	1	2,8	2,3	DO1 B9
ferritin-H	U58829	1	1	1,3	DO1 B10
glypican-5 (GPC5)	U66033	1	2,7	3,1	DO1 B11
ras-related protein p23	X12535	1	3,2	1,4	DO1 B12
MAP kinase kinase	L04485	1,2	1	1,2	DO1 C1
T-plastin	AB014875	1	5,5	4,8	DO1 C2
B94	L24118	1	1,2	2,2	DO1 C3
4F2	AB015433	1,1	1	1,8	DO1 C4
ASCT2	D85044	1	1,1	1,9	DO1 C5
ribonuclease 4	AF041066	1	3,4	0	DO1 C6
RING zinc finger (RING1)	AF037205	0*	0*	0*	DO1 C7
VL30	M91235	1,7	1	1,5	DO1 C10
GADD 135	U36994	4,1	1	3,4	DO1 C12
BALB/c aldose reductase	U04204	1	2,4	4,8	DO1 D01
Rap74	X64002	0*	0*	0*	DO1 D4
putative transmembrane proteine E3-16	AF017985	1,7	1	3,2	DO1 D5
Transcription factor S-II (Tcea1)	M18209	1	0*	0*	DO1 D6
laminin receptor	J02870	1	0	0	DO1 D7
UDP-galactose transporter related isozyme 1	D87991	0	0	0	DO1 D9
Lamin A	X66870	1,1	1	1,4	DO1 D10
dynein	U39046	1	4,2	1,7	DO1 D12

Tabelle 4

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
amphiphysin	Y13380	1,8	2,8	1	DO1 E1
laminin alpha		2,4	1	1,7	DO1 E2
MMP3, ras-induced 53 kD (Transin-1)	X02601	0*	0*	0*	DO1 E4
S-100 related protein	J03628	1,7	1	1,2	DO1 E5
VCP	Z14044	2,5	1	1	DO1 E6
RhoC (Arhc)	X80638	0	1	0*	DO1 E7
endoplasmic reticulum ATPase	U11760	1	2,1	2,4	DO1 E8
neuritin	U88958	1,1	1	1,5	DO1 E9
K-ras	M54968	0	1	0	DO1 E12
ORP-150 (oxigen regulated protein)	U41853	1	2	8,8	DO1 F1
immunoglobulin heavy chain binding protein	M14050	2,7	2,3	1	DO1 F2
SPI 3	U25844	1	1,7	2,2	DO1 F3
rab20	X80332	1	6,3	5,4	DO1 F4
Nucleoside diphosphatase kinase/puf (NM23)	M55331	1	1,2	2,7	DO1 F5
PS-PLA 1	D88666	1	2,1	1	DO1 F6
erythrocyte band 7 integral membrane protein	X91043	0	1	3,6	DO1 F8
ferritin	L01122	1	1	1,8	DO1 F10
downregulated in adenovirus 5-infected	U82616	1	1,2	1,2	DO1 F12
CaM-like protein kinase I (CAMK1)	L26288	1,4	1	0*	DO1 G2
MAP-kinase phosphatase cpg21 sim to (DUSP5)	AF013144	1	3,6	1,1*	DO1 G3
Collagenase	M60616	1	1,2	2,2	DO1 G4
cytoplasmic aminopeptidase P (APP)	AF038591	1,4	1	2,6	DO1 G7
calponin	U06755	2,4	1	2,1	DO1 G8
CCT (chaperonin containing TCP-1)	Z31555	2	1	1,6	DO1 G9
MMP-10, Transin-2	X05083	1	4,7	2,3*	DO1 G10
ATP citrate-lyase	J05210	3	1	2,4	DO1 G11
calmodulin-dependent protein kinase II-delta	J05072	1	2,7	8,4	DO1 G12
Lectin	M19036	2	1	1,2	DO1 H1
myb-binding protein (P160)	U63648	0	0	0	DO1 H3
myosin regulatory light chain	D14688	1,2	1	1,2	DO1 H4
HLA-B-associated transcript 3 (BAT3)	M33519	1	1,9	1	DO1 H5
alpha-prothymosin	M60664	1,5	1	1,2	DO1 H6
Mob-1, interferon activated gene 10 (Ifi10)	U17035	1	0*	0*	DO1 H7

Tabelle 4

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
BC-2 protein	AF042384	1,1	2,1	1	DO2 A1
Tumour susceptibility gene 101 (tsg101)	U52945	1*	2,9	2	DO2 A2
Synexin	L13129	1	3,1	2,9	DO2 A3
Transporter protein (g17)	U49082	1	1,1	1,5	DO2 A4
SBF1 phosphatase (SBF1)	U93181	6,8	2,3	1	DO2 A5
Importin alpha	AF020771	1	9,4	2,2	DO2 A6
BCSC-1, breast cancer suppressor candidate 1	AF002672	0*	0*	0*	DO2 A7
Arp3	AF006083	1,1	1,1	1	DO2 A8
p67	M80367	1	2,3	2,3	DO2 A9
phosphoglycerate mutase type B	S63233	1,5	1,4	1	DO2 A10
Leucocyte adhesion glycoprotein p150,95	Y00093	1	1,4	1,1	DO2 A11
rsca3	Y12319	1,6	1,8	1	DO2 A12
MPPB	L12965	2,9	2,2	1	DO2 B1
cytochrome oxidase	S79304	2,9	1,5	1	DO2 B2
FHL2	AF055889	1,1	1	1	DO2 B3
MCT1	X86216	1,6	1,4	1	DO2 B4
Glykoprotein Cd44	M61875	1	1,4	1,4	DO2 B6
proliferating cell nucleolar antigen P40	U72206	2,3	1	5,3	DO2 B7
Flap endonuclease-1 (Fen-1)	L26320	1*	1,3	1	DO2 B8
Glv-1		2,3	1,7	1	DO2 B10
c-Ha-ras-1 (HRAS)	V00574	2,3*	1*	3,2	DO2 B11
Asparagine synthetase	U07201	2	2,1	1	DO2 B12
Sec61	M96630	1,8	1	2	DO2 C1
rig insulinoma gene	M19393	1,2	1	1,2	DO2 C2
SET(AB)	AB015345	2,3	1	6,2	DO2 C4
Exportin	AF039022	1	2,8	4,6	DO2 C5
aminopeptidase P (APP)	AF038591	1,1	1	1,1	DO2 C6
HAUSP	Z72499	1,2	1,3	1	DO2 C7
AKAP-KL	AF033276	1,3	1,5	1	DO2 C8
acyl-CoA sythetase I	D30666	2,7	1	3,8	DO2 C9
non-neuronal enolase (NNE)	X02610	1,3	1	1,2	DO2 C10
stearoyl-CoA desaturase 2	AF036761	1,1	1,1	1	DO2 C11
seryl tRNA sythetase	M88136	1,3	1	1,1	DO2 C12

Tabelle 4

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
thymosin beta-4	M34043	1,8	1,6	1	DO2 D2
mu-calpain	RNU53858	1,2	1,6	1	DO2 D3
Tyrosine phosphatase IA-2a (Ptpn)	D38222	1*	1,4*	1,8	DO2 D4
intestinal DANN replication protein	RNU17565	2,6	1	1,2	DO2 D5
Ras-GTPase-activating protein (G3bp2)	AB001927	1,2*	1	1	DO2 D6
protein phosphatase 2A-beta		1,5	1,4	1	DO2 D7
p105 coactivator	U83883	2	1	2	DO2 D8
Cyclooxygenase 1 (Ptgs1)	U03388	1,2*	1	1,5	DO2 D9
JAK 1 protein tyrosine kinase (Jak1)	AJ000556	2,1*	1*	2,1	DO2 D10
Rap1B	U07795	6,4	1	2	DO2 D11
Farnesyl diphosphate synth. (Fdps)	M34477	1,8	1	1	DO2 D12
bap37	X78683	1,4	1	1,4	DO2 E2
NPC1	AF003348	1	1,7	1	DO2 E3
Sprouty 2 (SPRY2)	AF039843	1,2	1,5	1	DO2 E4
TDAG51, couples T cell receptor signaling to Fas expression in activation-induced cell death	U44088	1	1,4	1,1	DO2 E5
GTP-binding protein/ran GTPase	S83456	1,4	1	1,1	DO2 E6
Thy-1	X03152	1,1	1,1	1	DO2 E7
phosphatase 2A B56	L42373	1,4	1,2	1	DO2 E8
Fra-1 fos-related antigen 1 (Fosl1)	M19651	1	0	1,3	DO2 E9
NICE-5 protein (HSA243666)	NM_017582.1	1,5	1	9,4	DO2 F1
DNasequence from clone RP3-324O	AL110115.38	3,4	1	3,8	DO2 F5
Sui1 homolog mRNA	AF129888.1	1	1	3,6	DO2 F6
ESTAA955634		1	1,5	1,1	DO2 F7
ESTAA942775		1	1,1	1,1	DO2 F10
FLJ22802 fis	AK026455	2,4	2,2	1	DO2 F11
FLJ21316 fis	AK024969	2,3	1	9,2	DO2 G3
tescalcin	NM_021344	1	1	1,6	DO2 G5
ESTAA893982		1,8	1,1	1	DO2 G6
no id 3		1	1,4	3,5	DO2 G8
PTD010 protein	NM_014394	2,6	1	1,9	DO2 G9
annexin VIII	NM_013473	1	1,7	9	DO2 G11
hypothetical transmembrane protein	AF242523	1,6	1,1	1	DO2 G12

Tabelle 4

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	9,5	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
ERO1-like	NM_015774	4,3	1	2,6	DO2 H1
ESTAI548840 sim to ets	W48383	1	2,6	2,6	DO2 H6
ESTAA408725		1	1,2	1,2	DO3 A2
ESTAA791601 sim to MAP1B protein		2	1	2,2	DO3 A3
ESTAA819316		2,7	1	2	DO3 A4
FLJ22077 fis	AK025730	1,9	1	3,6	DO3 A5
ESTAA438124 sim to ets		1,7	1	3,7	DO3 A7
no id 8		1	1,1	1,3	DO3 A9
no id 9		1	1	6,5	DO3 A11
ESTAA276378		1	1,8	1	DO3 B2
FLJ21016	AK024669	3,6	1,4	1	DO3 B4
Arp2/3 complex subunit p21-Arc	NM_019824	1	0	1,3	DO3 B7
ESTAI007801		1,2	1,3	1	DO3 B9
ESTAA819921		1	1,8	1,8	DO3 B10
ESTAA981941		1,6	1,7	1	DO3 B11
ESTAA801434		1	7,3	1,9	DO3 C1
no id 16		1	2,8	1,8	DO3 C3
KIAA0310	AB002308	1	2,3	1,5	DO3 C7
KIAA0597	AB011169	1	3,3	4,9	DO3 C8
KIAA0431	AB007891	1	1,1	1,4	DO3 C9
KIAA0544	AB011116	2,2	1,2	1	DO3 C10
KIAA0013	D87717	1,3	1,6	1	DO3 C11
aminopeptidase PILS	AF148324	1,9	1	1,2	DO3 C12
HSPC025	XM_001069	1	1,5	1,6	DO3 D3
no id 41		1	1,4	1,6	DO3 D4
ESTAA800034		1	1,1	1,3	DO3 D5
ESTAI031015		1	1,3	1,5	DO3 D6
ESTAA417685		1	1,7	1,9	DO3 D7
HCYP2	AF036537	1	1	6,2	DO3 D8
mRNA for RNA binding protein	AB016092	2,3	2,5	1	DO3 D9
chromosome 20 open reading frame 1	NM_012112	1	1,4	1,2	DO3 D10
ESTAA801415		1	1,7	1,3	DO3 D11

Tabelle 4

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
ESTAI044161		1,1	1	1,3	DO3 E1
EST AA 924000	AA924000	8,2	1	2,3	DO3 E5
no id 9		2	1,9	1	DO3 E6
ESTAA891266		1	1,1	1,3	DO3 E8
clone Y79AA1001402, sim to paraneoplastic cancer-testis-brain antigen	AK024029	3,1	1	1,3	DO3 E9
no id 20		1,1	1	1,5	DO3 E10
immunophilin FKBP51	U16959	1,1	1	1,1	DO3 E12
ESTAI007739		1	1,9	1,5	DO3 F11
acyl-CoA dehydrogenase family	NM_014384	1	2,2	3,1	DO3 F12
ESTAA850123 sim to WSB-2 gene		1	2,1	1,9	DO3 G1
ESTAA079499		1	1,8	1,9	DO3 G2
ESTAA571144		1	2,1	2	DO3 G3
ESTAA182063		1	2,9	3,6	DO3 G4
ESTAA792426		1	1,1	1,3	DO3 G5
ESTW65969		3,1	1	4,9	DO3 G7
no id 35		4,7	1,8	1	DO3 G8
ESTAA853333		1	1,8	1	DO3 G9
no id 37		1	1,3	1,6	DO3 G10
hypoxia-inducible factor 1	Y09507	1	1,4	1,2	DO3 H1
HMG-17	X12944	1	1	1,4	DO3 H3
TIAR	U55861	1	1,7	1,4	DO3 H5
Mitsugumin 23	AB013721	3	1	1,8*	DT2 A1
FLJ23579	AK027232	1	5,7	1,2	DT2 C2
no id 23		1	6	1,8	DT3 E4
pleckstrin homology	NM_011182	1,2	3	1	DT3 F1
ESTAA276806 sim to family of LIM-kinases		1,3	3,7	1	DT3 G6
KI AA 0332	AB002330	1*	5,1	2,8*	DT3 B4

Tabelle 4

In transformierten Zellen relativ zu normalen Vorläuferzellen reprimierte Gene

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
EI24	U41751	0	0	0	DO1 C9
Lot1	U72620	1	1,8	3,1	DO1 D2
Keratin 10	AB013607	1	1,1	1,9	DO1 G5
Evi-1 locus zinc finger protein	M21829	1,2	1	1,9	DO3 H2
aldehyde dehydrogenase	M73714	2,9	4	1	DO3 H4
interferon induced gene	X61381	1	2,5	1,2	DT2 A2
basonuclin	U88064	1	6,3	2,2	DT2 A3
ESTAA960059		1	6,7	2,7	DT2 A4
developmental kinase 2	Z49085	1	0	1,8	DT2 A9
megakaryocyte potentiating factor	D86370	1,2	1	1,4	DT2 A10
ESTAA000799		1,3	1,8	1	DT2 A11
no id 7		1	7,2	1,2	DT2 B1
lysyl oxidase	S77494	1	1,8	4,4	DT2 B3
collagene alpha 1 type 1	Z78279	1	3,8	2,8	DT2 B5
N-G,N-G-dimethylarginine dimethylaminohydrolase	D86041	1	3,8	2	DT2 B6
Cloning vector pSP65	X65329	2	6	1	DT2 B7
transforming growth factor-b type II receptor	L0653	1,3	2,7	1	DT2 B8
amyloid precursor-like protein 2	X77934	1	1,5	2,5	DT2 B10
ESTAA852038		1	6,3	2,5	DT2 B11
antioxidant enzyme AOE372	U96746	1	5,6	3,3	DT2 B12
fibrillin-1	U22493	1	7,5	6	DT2 C3
P-cadherin (Cdh3)	X06340	1	5,6	2,7*	DT2 C5
OCI-5	M22400	1,6	2,3	1	DT2 C6
Tissue inhibitor of metalloprotease 2	S82718	1	5,1	2,8*	DT2 C7
Tropoelastin	M86376	1,3	2,5	1	DT2 C8
glucocorticoid receptor	M14053	1	7,2	2,8	DT2 C9
calcium/calmodulin-dependent rec. peripherin	AF045469	1	2,4	8,8	DT2 C11
integral membrane protein 2A	AF031878	1,4	1,9	1	DT2 D2
ESTAA499428	L38971	1	2,8	2,3	DT2 D3
TRPM-2	M64723	1	3	2,7	DT2 D5
		1	5,3	5,3	DT2 D6

Tabelle 4

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
aryl hydrocarbon receptor	AF082124	1	8,9	3,1	DT2 D8
sorting nexin 16	AF305780	1	3	5,3	DT2 D9
ESTAA964182		1	2,8	1,2	DT2 D10
no id 12		1	2,1	1,2	DT2 D11
HTS1-HeLa tumor suppressor gene	S45936	1,2	1	1,8	DT2 D12
NO3 tumor suppressor	X66872	5,4	3,4	1	DT2 E7
biglycan	U17834	1	8	2,8	DT2 E9
follistatin-related protein	U06864	1	6,5	2,2	DT2 E10
methionine synthetase reductase	AF025794	1	5,9	2,9	DT2 E12
ESTAA956476		1	8,8	2,2	DT2 F3
Keratin (epidermal) type1	M13806	1	9,4	2,3	DT2 F5
ESTH35800		1	3,2	2,2	DT2 F6
Podoplanin	U96449	3,1	1	2,4	DT2 F7
no id 16		1	7,7	3,9	DT2 F8
mRNA for XLCL2 protein	Z14122	1	8,3	7	DT2 F11
cca1	AB000215	1	4,3	4,3	DT2 F12
Topoisomerase 2	Z46372	2,8	1	1,2	DT2 G1
FLJ22697 fis	AK026350	2,6	2,5	1	DT2 G2
ESTAA833164		1	1,9	1,8	DT2 G4
heat shock protein 86	J04633	4,5	1	1,8	DT2 G6
CadL Cadherin-11	X77557	1	4,3	3,8	DT2 G9
MCL-2	S77900	1	5,8	2,7	DT2 G10
Topoisomerase 1	D10061	1	9,3	3,5	DT2 H3
myo-inositol monophosphatase (IMP)	U84038	2,4	9,2	1	DT2 H5
Histone H3.3	Z48950	2,7	1	2,5	DT2 H7
Rnf4	U95141	1	1,4	6,2	DT3 A1
phosphatidate phosphohydrolase 2	U90556	1	1,5	1,8	DT3 A2
eIF-4All	X56953	1,5	3,1	1	DT3 A4
Topoisomerase 2 binding protein	XM_003014	1	3,9	4,4	DT3 A5
vimentin	X62952	2,5	1,8	1	DT3 A6
HSPG	M81687	1,1	1	5,5	DT3 A7
Pumilio 2 (PUMH2)	AF315591	1	1,2	2,1	DT3 A8
ERp99	J03297	8,2	9	1	DT3 A9

Tabelle 4

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
DNA polymerase epsilon	AF036899	1,6	1	1,6	DT3 A10
Tfe3 X-linked transcriptional activator	S76673	1	4,4	1*	DT3 A12
long interspersed repetitive DANN	X53581	1	2,4	3,1	DT3 B1
thyroid hormone receptor interactor 12	NM_004238	1	3,6	2,6	DT3 B2
3-hydroxy 3-methylglutaryl CoA synth.	X52625	1,5	4,1	1	DT3 B3
zinc-finger domain-containing protein	U90654	1	6,6	2,8	DT3 B5
replacement variant histone H3.3	Z48950	1	7,4	3,1	DT3 B6
Centromeric protein CENPC (Cenpc)	U03113	1	4,2	1,7	DT3 B7
NADH dehydrogenase	X14848	1	5,2	1	DT3 B8
Serum inducible kinase (Snk)	M96163	4,2	7,5	1*	DT3 B9
poly (ADP-ribose) glycohydrolase	AF079557	2,3	1	1,2	DT3 B11
phosphoinositide 3-kinase p170	U55772	4,5	3,4	1	DT3 B12
P5 protein	X62678	4,3	9,1	1	DT3 C2
ABP-280	X53416	1	3,3	2,4	DT3 C3
3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase	S63167	1	6,2	3,4	DT3 C4
alpha-actin	X06801	2,4	1	1,1	DT3 C5
SFRS7	L41887	1	3,7	2,3	DT3 C6
nuclear autoantigene GS2NA	U17989	1	1,4	1,9	DT3 C9
acetaminophen-binding protein/AP56	S56599	4,5	1	0	DT3 C10
Osteoglycin	D31951	2,8	5,5	1	DT3 C11
Cyr61	M32490	1	1,6	0	DT3 D2
Phosducin-like protein	L15354	1	2,4	0	DT3 D3
LAP2	U18314	2,3	4,4	1	DT3 D5
LxRN3	M60824	1	3,4	2,6	DT3 D6
Ki-67	X82786	1	7,9	0	DT3 D10
mRNA for carbonic anhydrase 3 gene	AB030829	1,4	1,8	1	DT3 D11
cysteine-rich repeat-containing protein	NM_016441	1,9	1,8	1	DT3 E2
ESTAA667811		1,8	1,7	1	DT3 E3
ESTAA266966		1	2,3	2,5	DT3 E5
ESTAA819247		1	1,9	1,9	DT3 E6
FLJ13138 fis	AK023200	1	4,1	8,5	DT3 E7
ESTAA286358		1	2,7	2,1	DT3 E9

Tabelle 4

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	Position auf RN-Membranen im Anhang unter 9.1.
EST AA 743557		1*	2,7	1,5*	DT3 E10
no id 20		1	2,8	1,2	DT3 E11
no id 18		8	3,7	1	DT3 F2
no id 16		1,1	2,5	1	DT3 F4
p97 ATPase gene	AF122047	2	2	1	DT3 F5
Eya3 homolog MRNA	U61112	1	4	1,4	DT3 F6
ESTH35777		3	6,8	1	DT3 F7
ESTAA891207		1	3,2	1,5	DT3 F8
ESTAA722531		2,8	6,8	1	DT3 F9
FLJ22318 fis	AK025971	2,5	1	4,1	DT3 G1
ESTAA161894		1,7	5,4	1	DT3 G2
ESTAA289129		1,6	1	1,8	DT3 G3
ESTAA170629		1,6	1,4	1	DT3 G4
ESTAA799790		1	5,7	2,7	DT3 G5
ESTAA734740		1	8,4	1,8	DT3 G7
ESTAA607513		1	1,3	4,9	DT3 G8
ESTAA764153		1	1,6	2,3	DT3 G9
no id 9		1	1	2,7	DT3 G11
RNA-binding protein HuA	AF176673	1	1,1	4	DT3 G12
clone 187_J_17	AC008160	1,6	1	2	DT3 H1
no id 5		1	4,9	3,5*	DT3 H4
no id 4		1	2,2	3	DT3 H5
ESTAA882328		2,6	1	1,6	DT3 H6
protein kinase Myak-L	AF071070	1	3,3	3	DT3 H7

5.2.2.2. Analysen mit konventionellem Northern-Blot

Im konventionellen Northern-Blot wurde die Expression von 60 Zielgenen in den drei durch die verschiedenen mutierten RAS-Isoformen transformierten 208F-Zelllinien untersucht. Auswahlkriterium für diese Gene war die starke Überexpression bzw. die Repression der Expression im Vergleich zu den normalen 208F-Vorläuferzellen. 47 dieser Gene wurden auch mittels reverser Northern-Blot-Hybridisierung untersucht.

Ein Beispiel für einen konventionellen Northern-Blot zeigt Abb. 11. Der besseren Übersicht halber sind alle Bilder der konventionellen Northern-Blots zusammenhängend im Anhang unter 9.2. aufgelistet.

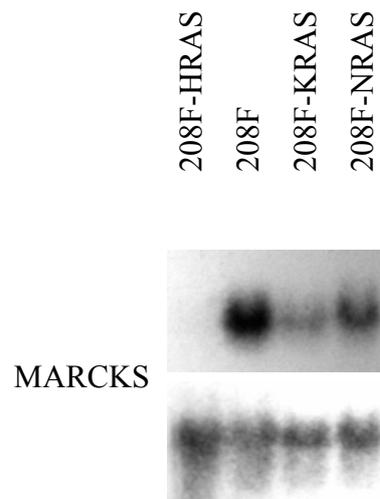


Abb. 11: Während 208F-Zellen das MARCKS-Gen exprimieren, zeigen alle RAS-transformierten Zellen eine signifikant erniedrigte Expression. In HRAS-transformierten Zellen ist sogar eine isoformspezifische Repression vorhanden. Das untere Bild zeigt die Hybridisierungskontrolle mit der ³²P-markierter 28S RNA-Sonde.

Die Ergebnisse der konventionellen Northern-Blot-Analyse sind in Tabelle 5 zusammengefasst, ebenfalls unterteilt in die Funktionsklassen ihrer Produkte.

Gene gelten als differentiell unter den drei RAS-transformierten Zelllinien, wenn ihre relativen Genexpressionsniveaus sich um ein 2-faches unterscheiden; dies ist in der Tabelle 5 als **fett** markierte Zahl wiedergegeben. Für die isoformspezifische Expression einer der drei RAS-Zelllinien wird ein 5-facher mRNA-Unterschied zugrundegelegt; dabei werden **rote** Zahlen für isoformspezifisch hochregulierte Gene und **blaue** Zahlen für isoformspezifisch reprimierte Gene verwendet. Von den 60 Genen werden 52 Gene (87%) durch die H-, K- oder NRAS-transformierte Zelllinie unterschiedlich reguliert. Von den 41 hochregulierten Genen der RAS-transformierten Zelllinien versus der 208F-Normalzelllinie sind 36 Gene differentiell unter den drei RAS-Isoformen, von den 19 reprimierten Genen der RAS-transformierten Zelllinien versus der 208F-Normalzelllinie sind 16 Gene differentiell unter den drei RAS-Isoformen. Unter den 60 untersuchten Genen finden sich 12 ausschließlich HRAS-isoformspezifisch regulierte Gene (20%). Davon sind jeweils 6 hochregulierte und 6 reprimierte Gene von RAS-Zellen versus 208F-Zellen.

Tabelle 5

Konventionelle Northern-Blots

Relative Niveaus der Genexpression in HRAS-, KRAS- und NRAS-transformierten 208F-Fibroblasten

In transformierten Zellen im Vergleich zu normalen Vorläuferzellen hochregulierte Gene

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	208F	Position im Anhang unter 9.2.
Signalmoleküle						
APC protein	D38629	89	325	700	1	9.2.1.
BEM-3	D45414	23	1	1	1	9.2.1.
CaM-like protein kinase I (CAMK1)	L26288	5	4	10	1	9.2.1.
c-Ha-ras-1 (HRAS)	V00574	5	3	3	1	9.2.1.
Cyclooxygenase 1 (Ptgs1)	U03388	3	1	1	2	9.2.1.
Flice-like inhibitory protein (CASH)	U97076	8	11	28	1	9.2.1.
JAK 1 protein tyrosine kinase (Jak1)	AJ000556	9	4	4	4	9.2.1.
MAP-kinase phosphatase cpg21 sim to (DUSP5)	AF013144	4	14	22	1	9.2.1.
PKC-zeta-interacting protein	Y08355	2	10	12	1	9.2.1.
Ras-GTPase-activating protein (G3bp2)	AB001927	10	1	n.d.	2	9.2.1.
RhoC (Arhc)	X80638	1	4	3	1	9.2.1.
SBF1 phosphatase (SBF1)	U93181	5	4	3	2	9.2.1.
Tyrosine phosphatase IA-2a (Ptprn)	D38222	6	3	1	1	9.2.1.
Kernproteine (Transkriptionsfaktoren, DNA-prozessierende Enzyme)						
Flap endonuclease-1 (Fen1)	L26320	19	4	1	2	9.2.1.
Fra-1 fos-related antigen 1 (Fosl1)	M19651	5	3	5	1	9.2.1.
Myb-binding protein p160 (Mybbp1a)	U63648	4	4	4	1	9.2.1.
Nucleoside diphosphatase kinase/puf (NM23)	M55331	2	3	4	1	9.2.1.
Peg3 (paternally expressed gene 3) (PEG3)	AF038939	4	9	15	1	9.2.1.
RING zinc finger (RING1)	AF037205	7	7	3	1	9.2.1.
Transcription factor S-II (Tcea1)	M18209	2	7	4	1	9.2.1.
Metabolische Enzyme, Transporter, Ionenkanäle						
ABC transporter Moat-B (ABCC4)	AF071202	6	1	1	2	9.2.1.
Farnesyl diphosphate synth. (Fdps)	M34477	7	1	1	2	9.2.1.

Tabelle 5

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	208F	Position im Anhang unter 9.2.
Zytoskelettkomponenten, Adhäsions- und Zell-Zell-Interaktionsmoleküle						
p21-Arc (ARPC3)	AF004561	1	13	15	1	9.2.1.
Extrazelluläre Proteine						
Melanoma antigene family B3 (MAGEB3)	U93163	18	1	1	1	9.2.1.
Mob-1, interferon activated gene 10 (Ifi10)	U17035	150	125	41	1	9.2.1.
MMP-3, ras-induced 53 kD (Transin-1)	X02601	233	161	145	1	9.2.1.
MMP-10, Transin-2	X05083	223	829	1039	1	9.2.1.
Andere						
BCSC-1, breast cancer suppressor candidate 1	AF002672	3	1	n.d.	3	9.2.1.
E1B 19k/Bcl-2-binding protein homologue (Bnip3)	AF041054	3	50	32	1	9.2.1.
Homo sapiens cDNA: FLJ23579fis	AK027232	1	2	2	1	9.2.1.
Mitsugumin 23	AB013721	41	1	53	6	9.2.1.
Mus m. pleckstrin homology	NM_011182	4	1	2	2	9.2.1.
Mus musc. Scmh1 mRNA for sex comb on...	AB030906	4	1	2	4	9.2.1.
Rap74	X64002	1	4	2	1	9.2.1.
Tumour susceptibility gene 101 (tsg101)	U52945	4	2	2	1	9.2.1.
EST AA 924000	AA924000	39	13	24	8	9.2.1.
EST AA276806 sim. to family of LIM-kinases	AA276806	3	1	11	1	9.2.1.
EST AI 044161	AI044161	2	1	1	1	9.2.1.
no id 13		1	1	3	1	9.2.1.
no id 23		2	1	1	1	9.2.1.
KI AA 0332	AB002330	87	1	10	2	9.2.1.

Tabelle 5

In transformierten Zellen relativ zu normalen Vorläuferzellen reprimierte Gene

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	H	K	N	208F	Position im Anhang unter 9.2.
Signalmoleküle						
EI24 p53 responsive gene (Ei24)	U41751	1	2	1	11	9.2.2.
MARCKS (Macs)	M60474	1	38	71	79	9.2.2.
MUK2	U49953	1	5	16	6	9.2.2.
Phosphatidylinositol 3-kinase p170 (Pik3c2a)	U55772	1	2	2	2	9.2.2.
Serum inducible kinase (Snk)	M96163	1	4	4	3	9.2.2.
Kernproteine (Transkriptionsfaktoren, DNA-prozessierende Enzyme)						
Basonuclin (BNC)	U88064	1	1	1	2	9.2.2.
Centromeric protein CENPC (Cenpc)	U03113	1	6	4	79	9.2.2.
ETF TEA domain transcription factor	D83596	1	13	16	19	9.2.2.
Gu binding, inhibitor of activated Stat1 (DDXBP1)	U78524	4	1	1	7	9.2.2.
N-myc (MYCN)	X63281	1	5	40	38	9.2.2.
Tfe3 X-linked transcriptional activator	S76673	1	9	6	18	9.2.2.
Zytoskelettkomponenten, Adhäsions- und Zell-Zell-Interaktionsmoleküle						
E-cadherin (CDH1)	X06115	1	2	2	1	9.2.2.
P-cadherin (Cdh3)	X06340	1	2	5	11	9.2.2.
Extrazelluläre Proteine						
Tissue inhibitor of metalloprotease 2	S82718	5	6	7	7	9.2.2.
Andere						
LIM-protein FHL 3	U60116	1	2	3	2	9.2.2.
Pebp2a1, Core binding factor a1 (Cbfa1)	D14636	5	4	3	6	9.2.2.
Tsx	X99946	1	5	5	1	9.2.2.
EST AA 743557	AA743557	2	1	3	13	9.2.2.
no id 5		1	2	3	3	9.2.2.

5.2.3. Tabellarische Zusammenfassung der Resultate aus den reversen und konventionellen Northern-Blots

Tab. 6.:

Anzahl der Gene	Reverser Northern-Blot	Konventioneller Northern-Blot
identisch erhöhte Expression in RAS-Isoform transformierten Zelllinien 162	190 Gene, davon 28 im KN unterschiedlich reguliert, d.h. tatsächlich identisch zu werten 162	5 Gene, die im RN auch überprüft worden waren und identisch sind, d.h. keine zusätzlichen identischen Gene
differenziell erhöhte Expression in RAS-Isoform transformierten Zelllinien 95	62 Gene (davon 33 isoformspezifisch, ein Gen jedoch auch im KN isoformspezifisch) 62	36 Gene (davon 6 isoformspezifisch), wovon 31 im RN überprüft wurden, davon fallen 3 gemeinsam in diese Kategorie. 28 Gene zählen somit zusätzlich zu den unterschiedlichen Genen und da 5 Gene allein im KN überprüft wurden, sind tatsächlich zu werten 33
identisch reprimierte Expression in RAS-Isoform transformierten Zelllinien 113	120 Gene, davon 8 im KN unterschiedlich reguliert d.h. tatsächlich identisch zu werten nur 112	3 Gene, wovon 2 im RN auch überprüft wurden und identisch sind. 1 Gen allein im KN überprüft, d.h. zusätzlich identische Gene 1
differenziell reprimierte Expression in RAS-Isoform transformierten Zelllinien 60	45 Gene (davon 17 isoformspezifisch) 45	16 Gene (davon 6 isoformspezifisch), wovon 9 im RN überprüft wurden, davon fällt 1 Gen gemeinsam in diese Kategorie. 8 Gene zählen somit zusätzlich zu den unterschiedlichen Genen und da 7 Gene allein im KN überprüft wurden, sind tatsächlich zu werten 15

N = 430; KN = konventioneller Northern-Blot, RN = reverser Northern-Blot

5.3. Vergleich der Deregulation von Zielgenen in Zellen, die durch RAS- oder Src-Onkogene transformiert wurden

Mittels konventioneller Northern-Blot-Analyse wurden auch 32 Gene in Src-transformierten Zellen gegenüber der 208F-Zelllinie und den RAS-transformierten Zelllinien untersucht. Die diesbezüglichen Blotbilder sind in Abb. 12 abgebildet und die Ergebnisse der Northern-Blot-Analyse in Tabelle 7 festgehalten.

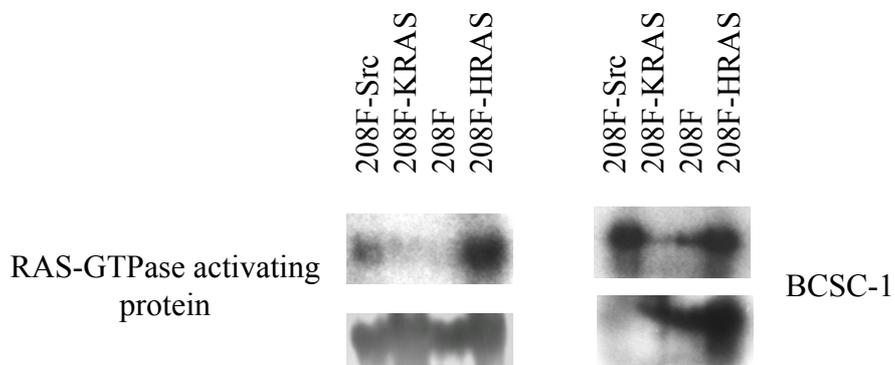


Abb. 12 (Teil 1): Die Bezeichnung des jeweiligen Gens ist neben dem Blot angegeben. Die Herkunft der RNA aus den verschiedenen Zelllinien ist direkt über jeder Spur angegeben. Das untere Bild zeigt jeweils die Hybridisierungskontrolle mit der ³²P-markierter 28S RNA-Sonde.

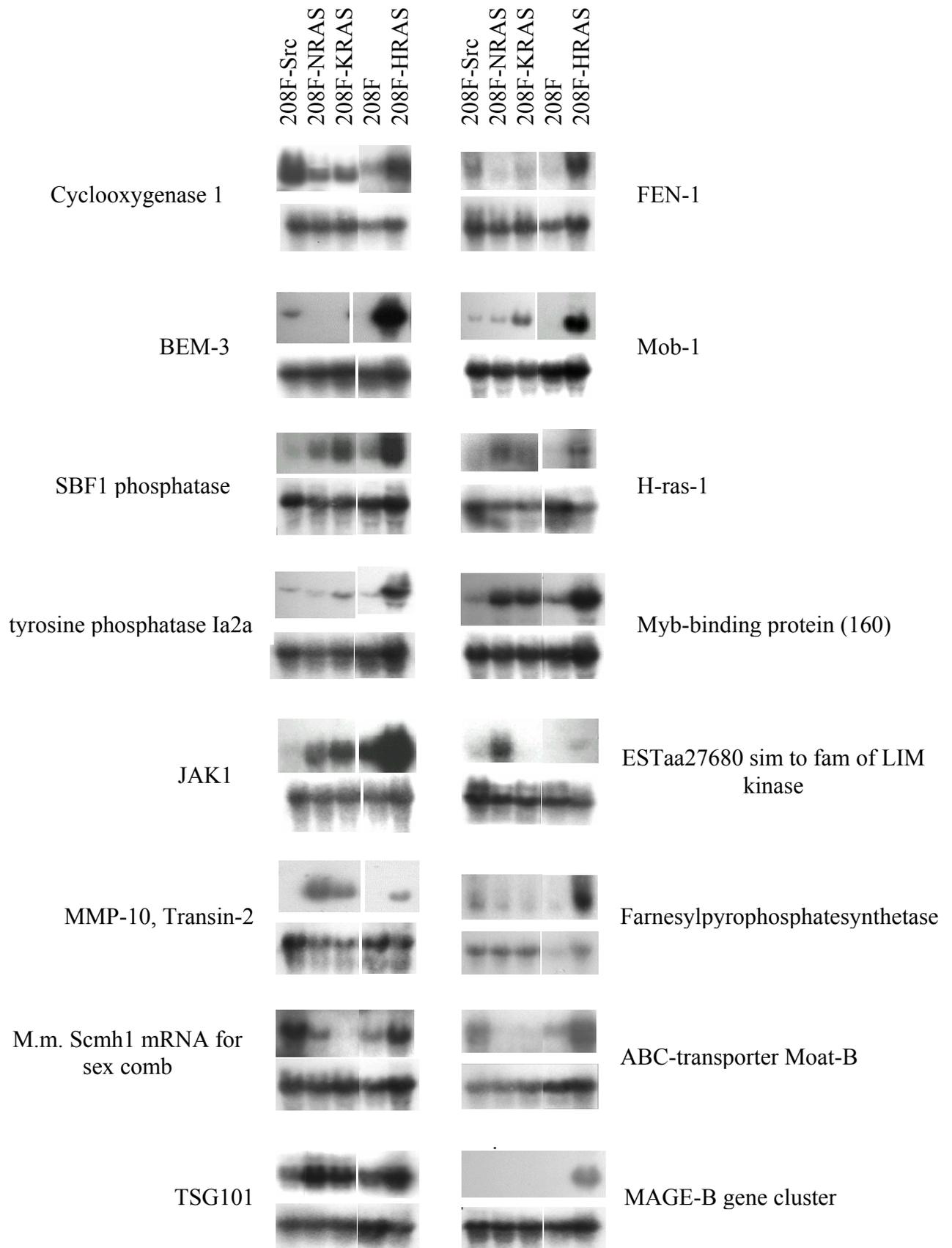


Abb. 12 (Teil 2): Die Bezeichnung des jeweiligen Gens ist neben dem Blot angegeben. Die Herkunft der RNA aus den verschiedenen Zelllinien ist direkt über jeder Spur angegeben. Das untere Bild zeigt jeweils die Hybridisierungskontrolle mit der ^{32}P -markierter 28S RNA-Sonde.

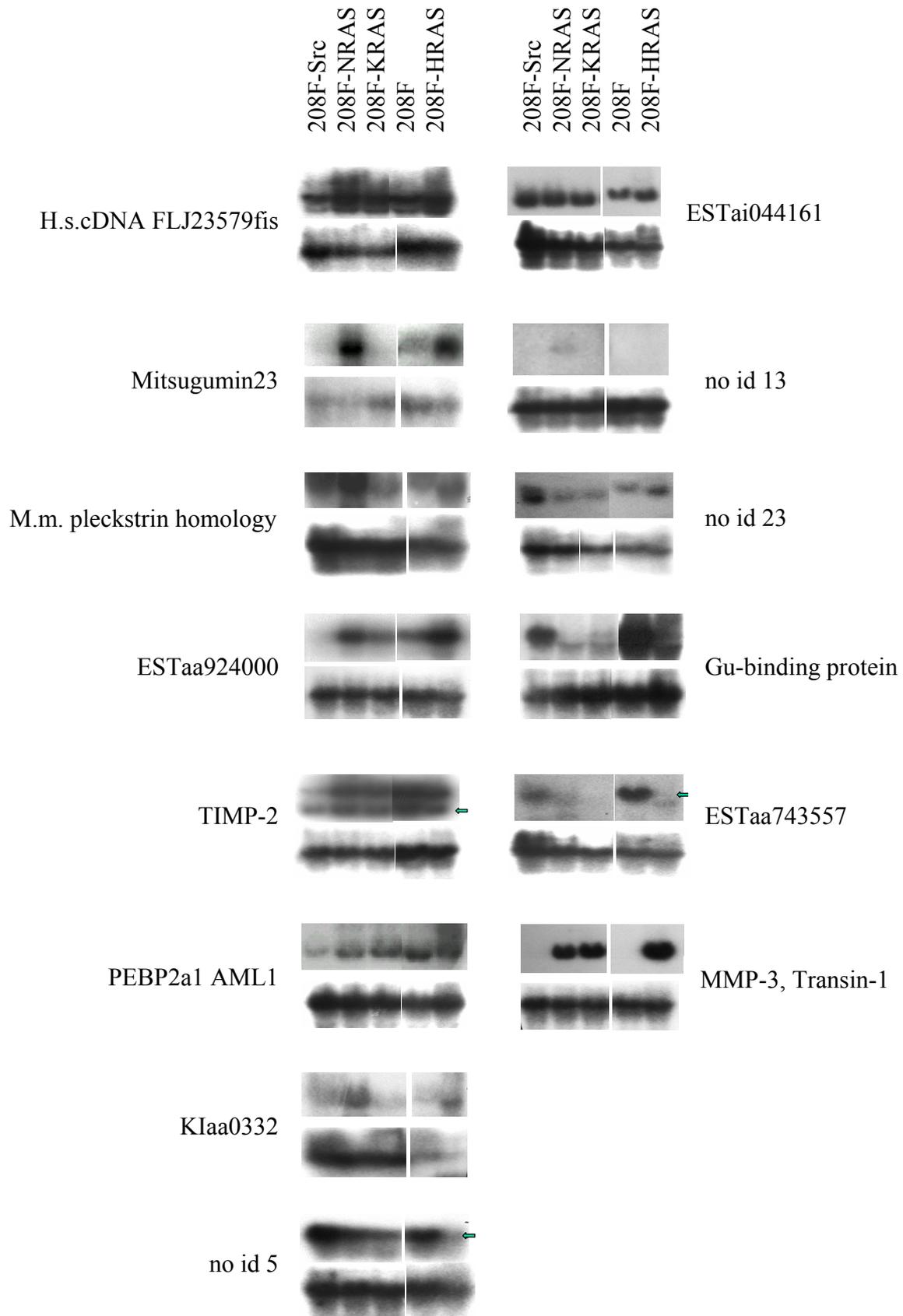


Abb. 12 (Teil 3): s.o., blaue Pfeile bei einigen Membranen weisen auf das untersuchte Genfragment hin, welches mit Hilfe der jeweiligen Sequenz in den Gendatenbanken bestimmt werden konnte.

Bei den Src-transformierten Zellen gilt ein 2-faches mRNA-Niveau als differentiell zu 208-F-Zellen; dabei werden die Werte hochregulierter Gene **rot** und die Werte reprimierter Gene **blau** dargestellt. Es gibt ko-regulierte Gene wie in RAS-transformierten Zellen und Gene, die unabhängig von RAS reguliert werden.

Von insgesamt 32 mittels konventionellem Northern-Blot untersuchten Genen werden 20 Gene, d.h. 62,5%, RAS-abhängig reguliert. Unter diesen 20 Genen sind 9 Gene, die in RAS- **und** in Src-transformierten Zellen hochreguliert werden und 4 Gene, die in RAS- **und** in Src-transformierten Zellen reprimiert werden. 7 Gene werden weder durch die RAS-, noch durch die Src-Transformation beeinflusst.

Die 20 RAS-abhängig regulierten Gene werden zumeist nur von einem oder zwei RAS-Onkogenen (besonders häufig von HRAS) ko-reguliert (s. unter Diskussion). Die übrigen 12 Gene werden in Src-transformierten Zellen RAS-unabhängig reguliert (37,5%). Darunter sind ein hochreguliertes und 4 reprimierte Gene; 7 Gene werden nicht durch die Src-Transformation beeinflusst.

Tabelle 7

Konventionelle Northern-Blots**Relative Niveaus der Genexpression in Src-transformierten Zellen zu 208F-Vorläuferzellen**

Genname (GenBank/EMBL)	Akzessionsnr.	208F	Src
In transformierten Zellen relativ zu normalen Vorläuferzellen hochregulierte Gene			
BEM-3	D45414	1	5
c-Ha-ras-1 (HRAS)	V00574	1	1
Cyclooxygenase 1 (Ptgs1)	U03388	2	3
JAK 1 protein tyrosine kinase (Jak1)	AJ000556	4	1
Ras-GTPase-activating protein (G3bp2)	AB001927	2	5
SBF1 phosphatase (SBF1)	U93181	2	1
Tyrosine phosphatase IA-2a (Ptpn)	D38222	1	1
Flap endonuclease-1 (Fen1)	L26320	2	11
Myb-binding protein p160 (Mybbp1a)	U63648	1	1
ABC transporter Moat-B (ABCC4)	AF071202	2	5
Farnesyl diphosphate synth. (Fdps)	M34477	2	3
Melanoma antigene family B3 (MAGEB3)	U93163	1	1
Mob-1, interferon activated gene 10 (Ifi10)	U17035	1	32
MMP-3, ras-induced 53 kD (Transin-1)	X02601	1	1
MMP-10, Transin-2	X05083	1	1
BCSC-1, breast cancer suppressor candidate 1	AF002672	3	17
Homo sapiens cDNA: FLJ23579fis	AK027232	1	2
Mitsugumin 23	AB013721	6	1
Mus m. pleckstrin homology	NM_011182	2	1
Mus musc. Scmh1 mRNA for sex comb on...	AB030906	4	6
Tumour susceptibility gene 101 (tsg101)	U52945	1	1
EST AA 924000	AA924000	8	1
EST AA276806 sim. to family of LIM-kinases	AA276806	1	2
EST AI 044161	AI044161	1	1
no id 13		1	1
no id 23		1	3
KI AA 0332	AB002330	2	4
In transformierten Zellen relativ zu normalen Vorläuferzellen reprimierte Gene			
Gu binding, inhibitor of activated Stat1 (DDXBP1)	U78524	7	8
Tissue inhibitor of metalloprotease 2	S82718	7	1
Pebp2a1, Core binding factor a1 (Cbfa1)	D14636	6	1
EST AA 743557	AA743557	13	6
no id 5		3	4

6. Diskussion

6.1. Zellbiologische Grundlage der vergleichenden Expressionsanalyse in HRAS-, KRAS- und NRAS-transformierten Zellen

Die durch das HRAS-, das KRAS- und das NRAS-Gen transformierten 208F-Fibroblasten besitzen gleiche neoplastische Eigenschaften wie an der Zellgestalt, der Eigenschaft zur Zellfokusbildung und der ankerunabhängigen Proliferation ersichtlich ist. Die Zellen sind daher hervorragend geeignet, den Einfluss der verschiedenen RAS-Isoformen auf die Genexpression zu untersuchen.

Insgesamt weisen die Genexpressionsprofile der 430 untersuchten Gene in 64% der Fälle (N=275) Gemeinsamkeiten und in 36% der Fälle (N=155) Unterschiede auf (s. Resultate, Tab. 6). Bei diesen 155 differentiellen Genen zeigten sich quantitative Unterschiede in der mRNA-Expression. Darunter fand ich 61 isoformspezifisch regulierte Zielgene (14%), d.h. Zielgene, die ausschließlich in Zellen dereguliert wurden, die entweder nur mutiertes H-, K- oder NRAS exprimieren. Dies bestätigt die Annahme, wonach alle RAS-Isoformen zwar auf gemeinsamen Signalwegen die Genexpression beeinflussen, jedoch einzelne Zielgene in der Signalkaskade durch HRAS, KRAS oder NRAS unterschiedlich stark aktiviert werden (Yan, J. et al., 1998; Olson, M. F. and Marais, R., 2000).

Einschränkend muss darauf hingewiesen werden, dass im Rahmen dieser Arbeit nur solche Gene untersucht wurden, die in HRAS-transformierten Zellen (FE8) im Vergleich zu ihren normalen Vorläufern (208F-Zellen) und die in KRAS-transformierten Zellen (KRAS-ROSE A2/5-Zellen) relativ zu ihren normalen Vorläufern (ROSE-199-Zellen) differentiell exprimiert wurden. Deshalb konnten eventuell weitere „isoformspezifische“ Gene, die in NRAS-transformierten Zellen exprimiert oder supprimiert werden, nicht erfasst werden. Dasselbe gilt für exprimierte Gene in anderen Zelltypen. Es ist daher damit zu rechnen, dass noch weitere Gene existieren, die, abhängig vom Zelltyp, insbesondere in Epithelzellen, dereguliert werden können.

6.2. Gemeinsame Effekte der RAS-Isoformen auf das Expressionsprogramm

HRAS-transformierte FE8-Zellen und KRAS-transformierte ROSE A2/5-Zellen weisen ein erhöhtes Expressionsniveau von Genen auf, die die Tumordinvasion und Metastasenbildung be-

günstigen (Zuber, J. et al., 2000; Tchernitsa, O. et al., 2004). Dazu zählen Gene, die den Laminin-Rezeptor und das Glykoprotein Cd44 kodieren.

Ebenso werden Gene mit anti-proliferativen, anti-invasiven und anti-angiogenen Eigenschaften identisch reguliert, z.B. der Tissue inhibitor of metalloproteases-2 (Timp-2), Lysyloxidase, das HTS1-HeLa- und das NO3-Tumorsuppressorgen.

Das Basonuclin-Gen wird ebenfalls durch alle der drei onkogenen RAS-Isoformen abhängigen Signalwege supprimiert. Das Genprodukt ist ein nukleäres Protein, das als Keratinozyten-spezifischer Transkriptionsfaktor ribosomale RNA-Gene kontrolliert und eine Rolle bei der Zellproliferation spielt (Tseng, H., 1998; Tseng, H. et al., 1999). Seine Funktion im Tumor ist bis heute noch unbekannt.

Die Gene für das Myb-bindende Protein p160 und das Myosin-regulierende-Leichtketten Protein werden durch den Einfluss aller drei RAS-Isoformen hochreguliert. Das Myb-Protein wirkt anti-apoptotisch und ist für die maligne Transformation mitverantwortlich.

Einige Gene, die Proteine für die Bildung von Rezeptoren kodieren (TGF- β TypII-Rezeptor, Glukokortikoid- und Aryl Hydrokarbon Rezeptor), werden auf ähnliche Weise von den unterschiedlichen RAS-Genen beeinflusst. Folglich weisen die Tumorzellen ähnliche Erkennungsmerkmale für die Umgebung des Tumors auf und reagiert das körpereigene Immunsystem in gleicher Weise (Frank, D. A., 2006).

Das Gen für die kleine GTPase RhoC wird in K- und NRAS-transformierten Zellen hochreguliert. RhoC ist an der Kontrolle der Zellpolarität und -motilität beteiligt. Bei der Transformation einer Zelle durch onkogenes RAS, insbesondere bei der Initiierung und dem Erhalt der Transformation, spielt RhoC eine noch nicht klar definierte Rolle (Khosravi-Far, R., 1998). Außerdem wurde in Brustkrebszellen ein Zusammenhang zwischen RhoC und der Entwicklung von Metastasen festgestellt (Kleer, C. G. et al., 2002).

Die Gene für das epitheliale Cadherin (Cadherin E) und das plazentare Cadherin (Cadherin P) werden von den unterschiedlichen RAS-Genen in ähnlicher Weise beeinflusst. Die Cadherine E und P sind Zelloberflächenproteine, die für Kalzium-abhängige interzelluläre Adhäsionen zwischen Zellen verantwortlich sind (Nagafuchi, A. et al., 1987). In metastasierenden Tumorzellen sind diese für den Erhalt des epithelialen Phänotyps verantwortlichen transmembranen Glykoproteine supprimiert (Karube, H. et al., 2002; Joo, Y. E. et al., 2002; Janda, E., 2002).

6.3. RAS-isoformspezifische Unterschiede in der Regulation von Zielgenen der Signalkette

In den folgenden Unterabschnitten werden die Gene aufgeführt, die vorzugsweise in HRAS-, KRAS- und NRAS-transformierten Zellen exprimiert wurden. Die im nachstehenden Text detailliert diskutierten Gene sind durch Fettdruck hervorgehoben. Diese wurden ausgewählt, weil der Einfluss ihrer Produkte auf die neoplastische Transformation schon gut bekannt ist. Die weiteren Gene stellen außerdem wichtige Kandidaten für eine spezifische Rolle in dem durch die jeweilige RAS-Isoform induzierten Transformationsprozess dar.

6.3.1. HRAS-spezifische Genregulation

Vorzugsweise in HRAS-transformierten Zellen hochregulierte Gene:

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1. BEM-3 | (s. Anhang 9.1., DO2 C3 und 9.2.1.) |
| 2. Ras-GTPase-activating protein (G3bp2) | (s. Anhang 9.2.1.) |
| 3. ABC-transporter Moat-B | (s. Anhang 9.2.1.) |
| 4. Farnesyl diphosphate synthetase | (s. Anhang 9.2.1.) |
| 5. Melanoma antigene family B3, MAGE-B | (s. Anhang 9.2.1.) |
| 6. KI AA 0332 | (s. Anhang 9.2.2.) |
| 7. GRP78 (HSPA5) | (s. Anhang 9.1., DO1 D11) |
| 8. Mus musc. Scmh1 mRNA for sex comb. | (s. Anhang 9.1., DO2 F9) |
- (fett markiert = im Folgenden diskutiert)

Vorzugsweise in HRAS-transformierten Zellen reprimierte Gene:

- | | |
|-------------------------|---------------------------|
| 1. MARCKS | (s. Anhang 9.2.2.) |
| 2. MUK2 | (s. Anhang 9.2.2.) |
| 3. ETF TEA | (s. Anhang 9.2.2.) |
| 4. N-myc | (s. Anhang 9.2.2.) |
| 5. Tfe3 | (s. Anhang 9.2.2.) |
| 6. Tsx | (s. Anhang 9.2.2.) |
| 7. TFII-I | (s. Anhang 9.1., DT2 E8) |
| 8. Fibulin-2 | (s. Anhang 9.1., DT2 E11) |
| 9. Connexin-43 | (s. Anhang 9.1., DT2 E1) |
| 10. H.s. cDNAFLJ10400 | (s. Anhang 9.1., DT2 E6) |
| 11. Liprin-beta 1 | (s. Anhang 9.1., DT3 E3) |
| 12. Mss4 | (s. Anhang 9.1., DT2 H4) |
| 13. p53 binding protein | (s. Anhang 9.1., DT3 D12) |
| 14. ESTAA014478 | (s. Anhang 9.1., DT2 C1) |
| 15. ESTAA028510 | (s. Anhang 9.1., DT3 F12) |

- | | |
|-----------------|---------------------------|
| 16. ESTAA833123 | (s. Anhang 9.1., DT2 F10) |
| 17. ESTAA874786 | (s. Anhang 9.1., DT2 F1) |
| 18. ESTAA616118 | (s. Anhang 9.1., DT2 F4) |
- (fett markiert = im Folgenden diskutiert)

BEM-3

Das BEM-3-Gen, eine Mutation des „Bud Emergence“-Gen BEM-2, kodiert ein membran-assoziiertes Tyrosin-Phosphatase-ähnliches Protein (Itho, S. et al., 1995). Bem-2- und Bem-3-Proteine wirken ähnlich wie GAP auf die Proteine der Rho-Familie, Rho, Rac und Cdc42. Das Bem-3-Protein stimuliert besonders die GTPase Aktivität von Cdc42, welches eine Rolle bei der Regulation der Knospenbildung bei Pilzen spielt (Zheng, Y. et al., 1993 und 1994) und mitverantwortlich für die Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges ist. Über diesen Signalweg kann via c-Jun die Proliferation, die Differenzierung und die zelluläre Transformation einer Zelle ausgelöst werden (de Rooter, N. D. et al., 2000).

Die erhöhte BEM-3 Expression, speziell in HRAS-transformierten Zellen, legt nahe, dass aktives HRAS, im Gegensatz zu KRAS oder NRAS, über BEM-3 und Cdc42 den JNK/SAPK-Weg stimuliert. Der Schluss, dass HRAS als einzige RAS-Isoform den JNK/SAPK-Weg stimuliert, wäre jedoch verfehlt, denn es besteht mindestens eine Signalquerverbindung vom MAPK-Weg zu JNK und MAPK wird von allen RAS-Isoformen aktiviert. Dennoch ist es möglich, dass speziell in Zellen, in denen das HRAS-Gen aktiviert ist, die maligne Transformation durch die übermäßige Stimulation des JNK/SAPK-Weges verstärkt wird.

ABC-transporter Moat-B

Hierbei handelt es sich um ein Transporterprotein, das ubiquitär vorkommt und sehr wahrscheinlich ebenso wie cMOAT (Transporter für multispezifische organische Anionenkanäle) und MRP (Medikamentenresistenz-assoziiertes Protein) organische Anionen aus der Zelle transportiert. Der Transport der organischen Anionen aus der Zelle ist für die zelluläre Detoxikation notwendig. Durch die Aktivierung dieses Transporterproteins wird in Tumorzellen die Sensibilität auf Chemotherapeutika reduziert (Lee, K. et al. 1998). Tatsächlich reagieren Leberkrebszellen nach Transfektion mit einem cMOAT-antisense-Konstrukt sensibler auf Cisplatin, Daunorubicin und andere zytotoxische Substanzen (Koike, K. et al., 1997).

Die verstärkte Expression des ABC-Transporters MOAT-B in HRAS-transformierten Zellen könnte darauf hindeuten, dass HRAS-induzierte Tumore eine höhere Chemoresistenz als KRAS-

oder NRAS-induzierte Tumore aufweisen. Diese These müsste jedoch durch funktionelle Studien überprüft werden.

Farnesyl diphosphate synthetase (FPPS)

Das FPPS-Protein ist in den Mevalonat/Squalene-Signaltransduktionsweg involviert und synthetisiert das Farnesylpyrophosphat. Farnesylpyrophosphat wird für die Farnesylierung und Membranverankerung der RAS-Proteine gebraucht (Lefebvre, L. et al., 2002). Die Überexpression von FPPS fördert die Farnesylierung von RAS in Fibroblasten und verlängert die Aktivierung der RAS/ERK-Kaskade (Reilly, J. F. et al., 2002).

Dies lässt den Schluss zu, dass speziell in HRAS-transformierten Zellen ein positiver Rückkopplungsmechanismus existiert, der die maligne Entartung verstärkt.

Melanoma antigene family B3 (MAGE-B)

In normalem Gewebe sind MAGE-Gene, abgesehen von Hoden- und Plazentagewebe, nicht aktiv. Dagegen ist ihre Expression in Tumoren unterschiedlicher histologischer Herkunft signifikant erhöht (Lurquin, C. et al., 1997). Da die Transkription der Gene durch Demethylierung induziert wird, kann die Expression in Krebszellen mit der genom-umfassenden Demethylierung in Tumorzellen erklärt werden (Counts, J. L. et al., 1995; Soejima, K. et al., 2003; Kisseljova, N. P. et al., 1998). Antigene der MAGE B-Familie werden auf der Oberfläche von Tumorzellen (insbesondere Melanomen) exprimiert. Diese werden von autologen zytolytischen T-Lymphozyten erkannt und durch das körpereigene Immunsystem eliminiert. Aufgrund ihrer strikten Tumorspezifität werden MAGE-Antigene als nützliche Angriffspunkte für die spezielle Antitumorimmunsierung genutzt (Boon, T. et al., 1994; Van Pel, A. et al., 1995).

Entsprechend der speziellen Hochregulierung von MAGE kann der Therapieansatz im Falle von durch RAS-Mutationen entstandenen Tumoren theoretisch besonders dann verfolgt werden, wenn es sich um HRAS-Mutationen handelt. Dies bleibt jedoch zu überprüfen.

MARCKS

Dieses zytoskelettale Protein steht im Zusammenhang mit der Regulation von Zellwachstum, Haftvermögen von Zellen und Strukturänderungen bei Einwirkung von Stress auf die Zelle (Heidkamp, M. C. et al., 2007). MARCKS gilt als ein Tumorsuppressorgen, das die Zellproliferation negativ beeinflusst und sogar die phänotypische Transformation in Zellexperimenten rückgängig machen kann (Brooks, G. et al., 1996; Manenti S. et al., 1998). Die Genexpression

von MARCKS wird in Leberkrebszellen im Vergleich zu nicht-tumorösen Leberzellen reprimiert (Masaki, T. et al., 2005).

In dieser Arbeit ist das MARCKS-Gen isoformspezifisch in HRAS-transformierten Zellen herabreguliert. MARCKS verhindert hier in keiner Weise das durch HRAS stimulierte Zellwachstum. Dies spricht für eine aggressivere Zellvariante im Vergleich zu KRAS- oder NRAS-transformierten Zellen.

N-myc

Das Produkt des N-Myc-Gens ist ein Transkriptionsfaktor und ein Proto-Onkoprotein. Es spielt eine Rolle in der Zellproliferation, der Apoptose und der Bildung von menschlichen Tumoren. Es kooperiert mit RAS bei der Aktivierung der Cyclin-E-abhängigen Kinase, um die S-Phase einer Zelle zu induzieren (Leone, G. et al., 1997). Gentransferexperimente zeigten, dass die konstitutive Expression des Myc-Gens ausreicht, um Melanome zu induzieren (Schlagbauer-Wadl, H. et al., 1999). Dies wurde in Tumoren der Lunge unterschiedlicher histologischer Subtypen bestätigt (Zajac-Kaye, M., 2001).

N-myc ist ein Gen, das in der FE8-Zellreihe (HRAS-transformierte Zellreihe) herabreguliert, dagegen in NRAS-Zellen, wie in den normalen Vorläuferzellen, exprimiert wird. Dies legt den Schluss nahe, dass die weiterhin bestehende Aktivierung von N-myc in NRAS-transformierten Zellen das onkogene Potential von NRAS verstärkt. In HRAS-transformierten Zellen wird somit ein anderer Signalweg in der Zelle eingeschlagen als in NRAS-transformierten Zellen, der die Expression des N-myc-Gens verhindert. Dies könnte auf einen Sicherheitsmechanismus der Zelle hinweisen, um die maligne Transformation durch das HRAS-Onkogen zu relativieren.

Connexin 43

Die Dysregulation oder der Verlust der Genexpression von Connexin 43 geht einher mit einem Kontrollverlust des Zellwachstums *in vitro* und *in vivo* und erhöht die Tumorgenität von Krebszelllinien (King, T. J. et al., 2002). In Genexperimenten wurde die Connexin 43 Expression in neoplastischen Fibrosarkomzellen wiederhergestellt und auf diese Weise das Fokuswachstum und die ankerunabhängige Koloniebildung der Krebszellen verringert. Bei immundefizienten Mäusen führt die Injektion dieser Zellen zu einer Reduktion des Tumorwachstums. Somit fungiert Connexin 43 als typisches Tumorsuppressorgen.

Connexin 43 ist in dieser Arbeit als isoformspezifisches Gen in HRAS-transformierten Zellen herabreguliert. Daher fehlt ein weiterer Tumorsuppressor, der einer Tumorbildung entgegenwirken könnte. Dies bedeutet jedoch auch, dass gerade in Tumoren mit HRAS-Überexpression/-

Mutation bzw. HRAS-Signaltransduktionsstimulation die Connexin 43 Reexpression die Tumorausbreitung verhindern oder verlangsamen und zusätzlich die Sensitivität für eine Adriamycinchemotherapie erhöhen kann (Fernstrom, M. J. et al., 2002).

6.3.2. KRAS-spezifische Genregulation

Vorzugsweise in KRAS-transformierten Zellen hochregulierte Gene:

- | | |
|--|---------------------------|
| 1. HMGI-C | (s. Anhang 9.1., DO1 A8) |
| 2. Glucose-6-phosphatase dehydrogenase | (s. Anhang 9.1., DO1 C8) |
| 3. Phosphoglycerate kinase 1 pseudogene1 | (s. Anhang 9.1., DO1 H2) |
| 4. Dynamin | (s. Anhang 9.1., DO1 D3) |
| 5. Calmodulin | (s. Anhang 9.1., DT2 A12) |
- (**fett** markiert = im Folgenden diskutiert)

Vorzugsweise in KRAS-transformierten Zellen reprimierte Gene:

- | | |
|----------------|--------------------------|
| 1. ESTAA517260 | (s. Anhang 9.1., DT3 H3) |
|----------------|--------------------------|
- (**fett** markiert = im Folgenden diskutiert)

Calmodulin

Calmodulin ist ein Kalzium-bindendes Protein, das als second messenger in der Signaltransduktion dient und die Zellproliferation reguliert.

Calmodulin reguliert die RAS-Signaltransduktion in der Fibroblastenzelle über Rezeptoren, indem es die Aktivierung von RAS über die Protein Kinase C (PKC) verhindert. Unter den drei RAS-Isoformen kann Calmodulin allein KRAS binden, so dass dieses inhibiert wird. Eine Calmodulininhibition aktiviert folgerichtig nur die KRAS-Signaltransduktion. Alle anderen RAS-Isoformen werden trotz einer Calmodulininhibition nicht aktiviert (Villalonga, P. et al., 2002). Dies spricht für einen KRAS-spezifischen Signalweg, über den das onkogene Potential in der Zelle entfaltet wird.

Diese Spezifität bestätigt sich auch in der KRAS-isoformspezifischen Hochregulation der Genexpression von Calmodulin in dieser Arbeit.

Dynamin

Das Protein Dynamin ist für den Vorgang der Endozytose einer Zelle entscheidend. Daher spielt es eine Hauptrolle in der Signaltransduktion (Scaife, R. et al., 1994). Dynamin ist mit dem Adaptermolekül Grb2, einem wichtigen Element der RAS-Signalkaskade, assoziiert (Yoon, S. Y. et

al., 1997 und 2001). Es wird vermutet, dass Dynamin als ein Vermittler der RAS-Signaltransduktion agiert und die Transformation, die Tumorprogression und die Zellmigration begünstigt (Jeong, S. J. et al., 2006).

Speziell in KRAS-transformierten Zellen, wie in dieser Arbeit gezeigt, ist das Dynamin-Gen hochreguliert und verstärkt wahrscheinlich die Aggressivität der KRAS-transformierten Zellen. Dadurch wird erneut bestätigt, dass die drei RAS-Gene funktionelle Unterschiede aufweisen.

6.3.3. NRAS-spezifische Genregulation

Vorzugsweise in NRAS-transformierten Zellen hochregulierte Gene:

- | | |
|--|---------------------------|
| 1. PKC-zeta-interacting protein | (s. Anhang 9.1., DO1 B3) |
| 2. Proteasome subunit p42 | (s. Anhang 9.1., DO1 A9) |
| 3. Glucocerebrosidase (Gba) | (s. Anhang 9.1., DO1 E3) |
| 4. CYP2A2 | (s. Anhang 9.1., DO1 D8) |
| 5. Mitochondrial trifunctional protein | (s. Anhang 9.1., DO2 B5) |
| 6. LAP1 (lamin-associated protein 1c) | (s. Anhang 9.1., DO1 G6) |
| 7. AF-9 | (s. Anhang 9.1., DO3 H7) |
| 8. HMG-box containing protein 1 | (s. Anhang 9.1., DO3 G12) |
| 9. Homo sapiens cDNA FLJ12528fis | (s. Anhang 9.1., DO2 G10) |
| 10. Homo sapiens chromosome 17 | (s. Anhang 9.1., DO2 F3) |
| 11. Mem3 (maternal-embryonic 3) | (s. Anhang 9.1., DO1 A10) |
| 12. Mus musc. arsenite inducible RNA | (s. Anhang 9.1., DO2 H3) |
| 13. Psme3 gene | (s. Anhang 9.1., DO1 C11) |
| 14. SET | (s. Anhang 9.1., DO3 H6) |
| 15. Stromal cell protein mRNA | (s. Anhang 9.1., DO1 E11) |
| 16. EST AA 033299 | (s. Anhang 9.1., DO3 C4) |
| 17. EST AA 445434 | (s. Anhang 9.1., DO2 F4) |
| 18. EST AA 516783 | (s. Anhang 9.1., DO2 H5) |
| 19. EST AA 544605 | (s. Anhang 9.1., DO2 H2) |
| 20. EST AA 560946 | (s. Anhang 9.1., DO2 G2) |
| 21. EST AA 734750 | (s. Anhang 9.1., DO3 A8) |
| 22. EST AI 013714 | (s. Anhang 9.1., DO2 F12) |
| 23. KI AA 0287 | (s. Anhang 9.1., DO2 F8) |
| 24. no id 1 | (s. Anhang 9.1., DO3 B8) |
| 25. no id 14 | (s. Anhang 9.1., DO3 B12) |

(**fett** markiert = im Folgenden diskutiert)

Vorzugsweise in NRAS-transformierten Zellen reprimierte Gene:

- | | |
|--|---------------------------|
| 1. cAMP-dependent protein kinase type II | (s. Anhang 9.1., DT3 D4) |
| 2. Laminin B1 | (s. Anhang 9.1., DT3 C7) |
| 3. Mitogen responsive 96kDa | (s. Anhang 9.1., DT3 D9) |
| 4. ESTAI047865 | (s. Anhang 9.1., DT2 C12) |

(**fett** markiert = im Folgenden diskutiert)

HMG-Box containing protein 1 (HBP1)

Das HMG-Box Protein 1 reprimiert die Transkription des Retinoblastomproteins und kontrolliert normalerweise den Zellzyklus. Außerdem supprimiert es die Aktivität des p21(WAF/CIP1)-Gens, eines negativen Regulators des Zellzyklus. Dies bedeutet, dass HBP1-Expression positiv auf die Proliferation der Zelle wirkt (Gartel, A. L. et al., 1998). HBP1 wirkt jedoch auch als Transkriptionsrepressor für das N-myc-Gen, welches für den Zellzyklus und die Zellentwicklung eine entscheidende Rolle spielt (Tevosian, S. G. et al., 1997). HBP1 bewirkt in NIH3T3-Zellen eine morphologische Transformation (Lavender, P. et al., 1997).

Das HBP1-Gen ist in allen RAS-transformierten Zellen hochreguliert, besonders aber in NRAS-transformierten Zellen. Die durch HBP1-Überexpression stimulierte Proliferation könnte die maligne Transformation NRAS-exprimierender Zellen begünstigen. Interessanterweise wurden hohe HBP1-Spiegel in myeloischen und lymphatischen Zelltypen identifiziert (Lin, K. M. et al., 2001). NRAS ist gerade in Tumoren dieses Zelltyps sehr häufig mutiert. Durch diesen Zusammenhang lässt sich die Gewebespezifität von RAS-Mutationen in Tumoren erklären: RAS-Mutationen der jeweiligen Isoformen lösen nur dann eine Tumorbildung aus, wenn das regulierte Gen in der Zielzelle eine besonders hohe Grundexpression aufweist.

SET

Das menschliche SET Gen wurde zuerst als eine Komponente des SET/CAN-Fusionsonkogens in einer akuten undifferenzierten Leukämie identifiziert. SET wird sowohl während der Entwicklung der Niere als auch in transformierten Zelllinien stark exprimiert. Das SET-Protein ist ein potenter und spezifischer Inhibitor der Protein Phosphatase 2A, Mitglied einer Familie von Serin/Threoninphosphatasen, die die Regulation der Zellproliferation negativ beeinflussen (Carlson, S. G. et al., 1998). Somit stimuliert SET die Proliferation. Seine Rolle als Onkogen in der Hepatokarzinogenese und der myeloischen Leukämie wird dadurch erklärbar (Fukukawa, C. et al., 2000). Speziell NRAS-Mutationen treten besonders häufig in Karzinomen der Leber und myeloischen Tumoren auf (Bos, J. L., 1989; Macaluso, M. et al., 2002).

SET wird in NRAS-transformierten Zellen spezifisch höher exprimiert als in HRAS- oder KRAS-transformierten Zellen. Daher könnte es sein, dass eine Tumorentstehung stets eine Koinzidenz eines Onkogens mit spezifischen Zelleigenschaften voraussetzt.

6.4. Funktioneller Zusammenhang zwischen Src-induzierter Transformation und Deregulation von RAS-Zielgenen

Bis heute gibt es Unstimmigkeiten über die Lokalisation von Src innerhalb der Signalkaskaden einer Zelle. Von besonderem Interesse ist die Interaktion von Src mit RAS, da hierdurch Rückschlüsse auf die Ursache der Onkogenese ermöglicht werden. Für die Bestimmung der Lage von Src kann der in dieser Arbeit vorgenommene Vergleich der Genexpression von Src-transformierten mit RAS-transformierten Zellen herangezogen werden.

Das Expressionsmuster der RAS regulierten Gene in Src-transformierten Zellen weist auf eine RAS-abhängige Komponente der Signaltransduktion hin, da 62,5% der untersuchten Gene RAS-abhängig reguliert werden. Größtenteils werden diese Gene auch isoliert von einem oder zwei RAS-Onkogenen (besonders häufig HRAS) und dem Src-Onkogen beeinflusst (s. Auflistung weiter unten).

Von den untersuchten Genen werden 12 Gene in Src-transformierten Zellen RAS-unabhängig reguliert (37,5%). Davon gibt es ein hochreguliertes Gen und 4 reprimierte Gene. Die im nachstehenden Text detailliert diskutierten Gene sind wieder durch Fettdruck hervorgehoben.

Zielgen-Koregulation in Src- und RAS-transformierten Zellen:

hochreguliert in Src-transformierten Zellen versus 208F-Zellen:

1. BEM-3 (wie HRAS)
2. Ras-GTPase (wie HRAS)
3. FEN1(Flap) (wie HRAS)
4. ABC-Moat-B (wie HRAS)
5. no id 23 (wie HRAS)
6. ESTAA276806 (wie H- und NRAS)
7. KIaa0332 (wie H- und NRAS)
8. FLJ 23579 (wie K- und NRAS)
9. Mob-1 (wie alle RAS-Zellen)

reprimiert in Src-transformierten Zellen versus 208F-Zellen:

1. Mitsugumin23 (wie KRAS)
 2. Pleckstrin (wie KRAS)
 3. **PEBP2a1/AML1** (wie NRAS)
 4. ESTAA743557 (wie alle RAS-Zellen)
- (**fett** markiert = im Folgenden diskutiert)

nicht beeinflusste Genregulation in Src-transformierten Zellen versus 208F-Zellen:

1. Cyclooxygenase (wie HRAS)
 2. Scmh1 (wie HRAS)
 3. no id 13 (wie H- und KRAS)
 4. Tyrosinephosphatase (wie NRAS)
 5. Melanoma antigene, MAGE (wie K- und NRAS)
 6. ESTAI044161 (wie K- und NRAS)
 7. no id 5 (wie K- und NRAS)
- (**fett** markiert = im Folgenden diskutiert)

unabhängig von RAS regulierte Gene:hochreguliert in Src-transformierten Zellen versus 208F-Zellen:

1. **BCSC-1**
- (**fett** markiert = im Folgenden diskutiert)

reprimiert in Src-transformierten Zellen versus 208F-Zellen:

1. JAK1 protein tyrosine kinase
 2. **SBF1 phosphatase**
 3. ESTAA924000
 4. **TIMP-2**
- (**fett** markiert = im Folgenden diskutiert)

nicht beeinflusste Genregulation in Src-transformierten Zellen versus 208F-Zellen:

1. cHa-ras1
 2. **Myb-binding protein p160**
 3. Farnesyldiphosphatase
 4. **MMP-3, Transin-1, ras-induced 53kD**
 5. **MMP-10, Transin-2**
 6. Tumour susceptibility gene Tsg 101
 7. Gu-binding protein
- (**fett** markiert = im Folgenden diskutiert)

Pebp2a1 (Core binding factor a1)

Pebp2a1, auch „Polyomavirus enhancer core protein“ oder PEA2 genannt, wurde zunächst als Faktor identifiziert, der in embryonalen F9 Karzinomzellen nicht nachweisbar war. Nach Induktion der Zelldifferenzierung wurde Pebp2a jedoch aktiviert (Bae, S. C. et al., 1993), was den Schluss zulässt, dass es für die Differenzierung der Zelle mitverantwortlich ist. Außerdem besitzen viele T-Zell-spezifische Gene Pebp2 Bindungsstellen, so dass Pebp2 auch in Zusammenhang mit der T-Zell-spezifischen Genexpression gebracht wird (Satake, M. et al., 1992). Ogawa, E. et al. (1993) konnten zeigen, dass die für die DNA-Bindung verantwortliche Subkomponente von Pebp2 in RAS-transformierten NIH3T3-Zellen häufig exprimiert ist.

In unseren Experimenten ist das Pebp2a1-Gen in RAS-transformierten Zellen vergleichsweise zu den Normalzellen (208F) ähnlich exprimiert, jedoch in Src-transformierten Zellen herabreguliert. Die verminderte Expression von Pebp2 spricht daher eher für eine verstärkte Dedifferenzierung und verminderte Angriffsmöglichkeit Src-transformierter Zellen.

BCSC-1

Das menschliche „breast cancer suppressor candidate 1“-Gen ist ein Tumorsuppressor, der sich auf Chromosom 11q23 befindet (Monaco, C. et al., 1997). Deletionen auf dem Chromosom 11q23 sind in Tumoren der Mamma, der Lunge und ovariellen Karzinomen häufig (Koreth, J. et al., 1999; Xu, X. L. et al., 2001; Monaco, C. et al., 1997).

Das BCSC-1 Gen wird in Src-transformierten Zellen im Vergleich zu RAS-transformierten und 208F-Zellen stark exprimiert. Speziell in Src-transformierten Zellen könnte deshalb BCSC-1 im Sinne einer Selbstschutzreaktion der Zelle agieren.

SBF1 Phosphatase

In Src-Zellen ist das SBF1 Phosphatase Gen im Gegensatz zu RAS-transfizierten Zellen und 208F-Zellen herabreguliert.

SBF1 Phosphatase (SET binding factor 1) ist ein Signalmolekül, das als Mitglied des Myotubularins das Zellwachstum kontrolliert. In Normalzellen verhindert es die Proliferation, fördert jedoch die Differenzierung von Myoblasten, B-Zellen und Stammzellen (De Vivo, I. et al., 1998; Firestein, R. et al., 2002). Nach Überexpression oder Mutation dieses Gens ist die onkogene Transformation von NIH 3T3-Fibroblasten beschrieben worden (Cui, X. et al., 1998; Firestein, R. et al., 2001). Daraus lässt sich folgern, dass Src-transformierte Zellen durch die reprimierte SBF1-Expression einen Proliferationsvorteil gegenüber RAS-transformierten Zellen besitzen

können. Im Unterschied zu RAS-transformierten Zellen profitieren diese wahrscheinlich nicht vom onkogenen Potential der Phosphatase.

MMP-3 (Transin1) und MMP-10 (Transin2)

Die Transkription der MMPs wird unter anderem durch Onkogene induziert. Erhöhte Expression der MMPs wurde in malignen und metastatischen Tumoren des Menschen, insbesondere Mammatumoren und menschlichen Adenokarzinomen der Lunge, nachgewiesen (Bodey, B. et al., 2001, a und b; Kerr, L. D. et al., 1988). MMP-10 wird in vielen transformierten Ratten Embryofibroblasten-Zelllinien exprimiert. Auch *in vivo* konnten Ostrowski, L. E. et al. (1988) experimentell zeigen, dass die MMP-Expression während der Invasion und Metastasierung von chemisch induzierten squamöszelligen Karzinomen besonders erhöht ist. Daher ist davon auszugehen, dass MMP-3 und MMP-10 in der Tumorentstehung und -progression eine große Rolle spielen. Strukturelle Veränderungen in der extrazellulären Matrix sind für die Migration während normaler und pathogener Gewebemodulierung und neoplastischer Zellinvasion notwendig. MMPs degradieren Kollagen, Elastin und andere Komponenten der extrazellulären Matrix und deaktivieren Zelloberflächenmoleküle, so dass die Zelle auf einige Stimuli aus ihrer Umgebung nicht mehr reagieren kann (Nagase, H. et al., 1999). Die durch ein Onkogen veränderte Zelle wird dadurch von Umgebungssignalen unabhängig, welche die Tumorbildung negativ beeinflussen könnten. Die Zelle kann daher ungehindert überleben und proliferieren.

Während MMP-3 und MMP-10 in RAS-transformierten Zellen stark exprimiert sind, zeigen sie keine Induktion in Src-transformierten Zellen. Sehr wahrscheinlich sind daher in Src-transformierten Zellen andere MMPs als in RAS-transformierten Zellen für die Tumorentstehung und Invasion verantwortlich. In Tumoren aber, die ein RAS-Gen beinhalten, könnten MMP-3 und MMP-10 ein prognostischer Faktor sein, da das Grading und Staging eines Tumors proportional dem MMP-Niveau zu sein scheint (Xu, K. et al., 2002).

Tissue inhibitor of metalloprotease 2 (TIMP-2)

Wie die MMPs werden auch die Inhibitoren der Metalloproteinasen als kritische Modulatoren der extrazellulären Matrix beschrieben. Sie sind deshalb mitentscheidend für die Invasivität und Metastasierung (Bodey, B. et al., 2001, b). In vielen Tumoren ist TIMP-2 erniedrigt (Kolontumore; Ornstein, D. L. et al., 2002) oder MMPs erhöht, wodurch die durch Metalloproteinasen veränderte Matrix nicht mehr restrukturiert werden kann.

Der MMP/TIMP-2-Quotient könnte daher eine signifikante Rolle bei der Einschätzung der Aggressivität und der Prognose von Tumoren spielen (Xu, K. et al., 2002). Zusätzlich haben TIMP-1 und -2 eine wachstumsstimulierende Aktivität (Wang, T. et al., 2002). Beide erhöhen - dosisabhängig und auf unterschiedlichen Wegen - die RAS-GTP-Menge. Außerdem unterstützt TIMP-2 die Komplexbildung von RAS-GTP und PI3K. Daraus lässt sich schließen, dass TIMP-2 einen positiven Rückkopplungsmechanismus für onkogenes RAS schafft.

In Src-transformierten Zellen ist das TIMP-2-Gen im Vergleich zu Normalzellen herabreguliert. Obwohl die MMP-3- und MMP-10-Expression in Src-transformierten Zellen nicht beeinflusst wird, ist der MMP/TIMP-2-Quotient auch in Src-transformierten Zellen so verändert, dass ein aggressiveres Tumorverhalten daraus resultiert.

Myb-binding protein p160

Das Myb-binding protein wird durch ein Gen kodiert, das weder in Src-Zellen, noch in 208F-Zellen exprimiert ist. In allen RAS-transformierten Zellen findet sich jedoch eine gleich starke mRNA-Mehrexpression.

Die Myb-Proteine sind Transkriptionsaktivatoren, die die Proliferation und Differenzierung einer Zelle beeinflussen. Sie interagieren mit zellulären Proteinen, von denen einige als Transkriptionsfaktoren wirken, andere die Aktivität von Myb selbst regulieren (Ness, S. A., 1999). Das p160-Protein bindet an die Leucin-Zipper-Region des Myb-Proteins. Die Aktivierung dieser Region ist für die zelluläre Transformation bedeutsam (Favier, D. et al., 1994). Außerdem bindet das p160-Protein auch an die Leuzin-Zipper-Region von c-Jun. Das aktivierte Myb verhindert in diesem Fall die Apoptose einer Zelle durch eine Induktion des bcl-2- (Grassilli, E. et al., 1999). In Src-transformierten Zellen wird die Apoptose durch die STAT3-Aktivierung auch via bcl-2 unterdrückt (Webb, B. L. et al., 2000).

Im Ergebnis wird daher sowohl durch RAS-, als auch durch Src-Onkogene das gleiche Ziel, nämlich das zelluläre Überleben, erreicht.

6.5. Transformationsassoziierte transkriptionelle Deregulation in Src- und RAS- exprimierenden Zellen

Die Mehrzahl der in Src-transformierten Zellen untersuchten, deregulierten Gene sind RAS-Signalketten-abhängig. Dies bildet die transkriptionelle Grundlage für den Befund, dass die effiziente Src-induzierte Transformation durch RAS-Proteine vermittelt wird (Stacey, D. W. et al., 1991). Später wurde dieser funktionelle Zusammenhang auch *in vivo* bestätigt (Tokumitsu, Y. et

al., 2000). Die Src-vermittelte Transformation wird auch durch Modulatoren der RAS-Aktivität verhindert (DeClue, J.E. et al., 1991; Nori, M. et al., 1991). Ein beträchtlicher Teil der durch RAS deregulierten Zielgene wird offenbar durch den MAP-Kinase Signalweg kontrolliert (Zuber, J. et al., 2000; Tchernitsa, O. et al., 2004). Sehr wahrscheinlich folgen jedoch nicht alle in Src-transformierten Zellen deregulierte Gene diesem Regulationsmechanismus. Das aktive mutierte Src-Protein phosphoryliert Cadherine durch den Ras-FAK-Signalweg und zerstört Cadherine/Catenin-Komplexe. Die trägt erheblich zum Metastasierungspotential Src-transformierter Zellen bei (Irby, R. B. et al., 2002). Ein möglicher Effektor der Signalkette von Src zu RAS ist das Adapterprotein Shp-2. In Abwesenheit dieses Proteins sind weder Transformation noch die Aktivierung der Apoptose-hemmenden Kinase PkB/Akt möglich (Hakak, Y. et al., 2000).

Ob die Src-vermittelte Transformation von der RAS-Signalkette abhängt, wurde auch durch Interferenzversuche mit Effektoren unterhalb von RAS untersucht. Die Hemmung der MAPK- und p70S6K-Signalwege unterdrückt die Src-Transformation nicht vollständig (Fukazawa, H. et al., 2000). In Rat-2-Zellen, die den in dieser Studie 208F-Fibroblasten sehr ähnlich sind, wurde der MAPK/ERK-Signalweg durch dominant negative Mutanten vollständig gehemmt, blieb die Src-Transformation erhalten (Aftab, D. T. et al., 1997). Auch in Intestinepithelzellen der Ratte (RIE-1) erfolgte die Src-Transformation unabhängig von RAS (Oldham, S. M. et al., 1998). Als RAS-unabhängiger Signaleffektor unterhalb von Src kommt STAT3 in Frage (Tokumitsu, Y. et al., 2000; Turkson, J. et al., 1998; Bromberg, J.F. et al., 1998). Interessanterweise wurde eine Signalkette von RAS über die kleine GTPase Ral zu Src und STAT3 beschrieben (Goi, T. et al., 2000). Somit wäre die Src-Kinase ein Signaleffektor unterhalb und nicht oberhalb von RAS. Da RAS zahlreiche Zielgene über die MAPK-Signalkette reguliert (Zuber, J. et al., 2000; Tchernitsa, O. et al., 2004), wäre im obigen Fall eine unabhängige Gruppe von Zielgenen zu erwarten. Eine Anzahl solcher Zielgene, die potentiell über Ral und nachgeschalteten Signalketten reguliert werden, sind in KRAS-transformierten Ovarialepithelzellen beschrieben worden (Tchernitsa, O. et al., 2004).

Die RAS-Signalketten-unabhängige Regulation von Zielgenen in Src-transformierten Zellen war zu erwarten, da Src direkt die Aktivität der PI3K regulieren kann (Penuel, E. et al., 1999). Ein für die Src-induzierte Transformation essentieller Faktor, der Transkriptionsaktivator Myc, wird über den STAT3-Signalweg induziert (Courtneidge, S.A. et al., 2002; Furstoss, O. et al., 2002; Bowman, T. et al., 2001).

6.6. Genexpressionsunterschiede - Ursache oder Folge der Transformation durch RAS- oder Src-Onkogene?

Die durch H-, K-, NRAS- oder Src-Onkogene stimulierten Signalketten einer Fibroblastenzelle beeinflussen zum Teil die Regulation gemeinsamer Zielgene, zum Teil distinkter Zielgene. In der vorliegenden Arbeit wurden die transkriptionellen Auswirkungen der konstitutiven Onkogenexpression untersucht. Daher erlauben die Resultate keine Aussage über die zeitliche Abfolge der Deregulation nach Expression der Onkogene. Die Frage, ob es sich um primäre (d.h. für die Transformation essentielle) oder sekundäre Expressionsveränderungen handelt, kann daher nicht direkt beantwortet werden. Um diese Problematik zu ergründen, bedient man sich üblicherweise konditionaler Expressionssysteme. Ein solches System wurde auf der Basis von phänotypisch normalen Fibroblasten etabliert. Die neoplastische Transformation wird durch ein mittels IPTG-induziertes RAS Onkogen erzielt. Im Rahmen der primären Beschreibung RAS-abhängiger Genexpressionsveränderungen wurde bereits eine Reihe von Zielgenen in diesem System untersucht (Zuber, J. et al., 2000). Veränderungen der Genexpression traten auf bevor der voll transformierte Phänotyp erkennbar war. Die Expression von „immediate early“ Genen wurde auch in kurzzeitig mit dem HRAS-Onkogen transfizierten Schilddrüsenzellen beschrieben (Cobellis, G. et al., 2001). Zusätzliche Expressionsveränderungen traten erst nach Tagen auf – zu einem Zeitpunkt also, an dem sich auch der Phänotyp der Zellen verändert hatte (Cobellis, G. et al., 2001). Man bezeichnet diese als sekundäre Expressionsveränderungen, welche aber möglicherweise für die Stabilität und Aufrechterhaltung des neoplastischen Phänotyps wichtig sind.

Wichtige Effekte auf die Genexpression werden auch nicht direkt durch intrazelluläre Signaltransduktion vermittelt, sondern durch autokrine Mechanismen, wie für einen EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor beschrieben (Schulze, A. et al., 2001). Experimente mit aus RAS-transformierten Zellen abgeleiteten phänotypischen Revertanten belegen die enge Koppelung neoplastischer Phänotypen mit Genexpressionsveränderung. In diesen Zellen ist die Expression der Gene, die Komponenten der extrazellulären Matrix kodieren und in transformierten Zellen herabreguliert sind, teilweise oder vollständig wiederhergestellt (Raudies, O. et al., 2005).

6.7. Ausblick

Die im Rahmen des Genexpressionsvergleichs identifizierten Zielgene können dazu beitragen, die molekulare Basis der präferentiellen Aktivierung von RAS-Genen aufzuklären. Nach Kim, K. et al. (2002) und Thompson, T.A. et al. (1998) wirken unterschiedliche RAS-Proteine stärker

oder weniger stark auf die neoplastische Transformation des Zielgewebes ein. Nach Gentransfer des HRAS-Gens in Brustdrüsenzellen der Ratte entstanden häufiger Tumore als durch das KRAS-Gen. Das Niveau der HRAS Expression war höher als das der KRAS Expression. Zwischen der gewebespezifischen Expression und dem RAS-Mutationstyp besteht ein enger Zusammenhang. Die NRAS-spezifische Hochregulierung von HBP1 (HMG-Box containing protein 1) und SET ist beispielhaft für diese Korrelation. Die von diesen Genen kodierten Proteine sind vor allem in Geweben nachweisbar, in denen NRAS-Mutationen gehäuft auftreten. Dazu gehören das myeloische und lymphatische System sowie Leberzellen.

Studien, die funktionelle Zusammenhänge zwischen aktivierten HRAS-, KRAS- und NRAS-Genen und speziellen Gewebeeigenschaften untersuchen, sind jedoch erforderlich, um diese Mechanismen zu klären.

Den Einfluss gewebetypischer Faktoren zeigt die Studie von Kumar, R. et al. (1990). Während durch Karzinogene induzierte RAS-Mutationen zunächst keine phänotypischen Veränderungen in Brustdrüsenzellen der Ratte zeigten, wurde in diesen besonders hormonabhängigen Zellen nach Östrogeneinwirkung die Entstehung einer Neoplasie begünstigt.

Faktoren, die als Endpunkte von Signalketten mit onkogenem Potential wirken, können als Tumormarker von Interesse sein. Insbesondere in Tumoren mit präferentieller Mutation in einem der drei RAS-Gene könnten solche Marker klinische Relevanz haben. Wenn diese nicht nur in primärem Tumorgewebe und davon abgeleiteten Metastasen, sondern auch – ähnlich wie die RAS-Sequenzen selbst (Qin, L.X. et al., 2002) - in Körperflüssigkeiten nachweisbar wären, könnten sie für die Diagnose von Tumorfrühstadien sowie für die Verlaufskontrolle während der Therapie nützlich werden.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die mRNA-Genexpressionsprofile HRAS-, KRAS- und NRAS-transformierter Zellen verglichen. Zudem wurden Expressionsanalysen mit Src-transformierten Zellen durchgeführt, um zu beurteilen, inwieweit das genetische Programm mit dem von RAS-transformierten Zellen übereinstimmt. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Es wurden KRAS- und NRAS-transformierte Zellen hergestellt, die vergleichbare maligne Proliferationseigenschaften wie HRAS-transformierte (FE8) und Src-transformierte Zellen aufwiesen.
2. In HRAS-, KRAS- und NRAS-transformierten Zellen konnten insgesamt 430 Gene analysiert werden, welche relativ zu normalen Vorläuferzellen (208F-Fibroblasten) differentiell exprimiert sind. Die durch die drei RAS-Isoformen aktivierten Signalketten wirken auf die Mehrheit der Zielgene auf gleiche Weise ein (Hochregulation bzw. Repression).
3. Die Genexpressionsprofile der Zellen, die durch aktivierte HRAS-, KRAS- und NRAS-Gene neoplastisch transformiert waren, unterschieden sich untereinander in 155 Fällen. Durch eine RAS-Isoform „spezifisch“ reguliert werden 61 Zielgene.
4. In den durch die Src-Tyrosinkinase-transformierten Zellen werden von 32 untersuchten Genen 12 Gene RAS-unabhängig reguliert. Somit wird nur ein Teil des Src-Onkogen induzierten genetischen Programms über RAS-Signalkaskaden vermittelt.
5. Die RAS-„isoformspezifisch“ regulierten Gene kodieren Enzyme und Proteine, die für die Proliferation, die Transformation und das Überleben einer Krebszelle entscheidend sind. Sehr wahrscheinlich sind einzelne dieser Gene für die Transformation in bestimmten Zelltypen besonders wichtig.

Die erstellten Genexpressionsmuster erlauben es, die Mechanismen der malignen Transformation auf Ebene der transkriptionellen Zielgene zu untersuchen und geben Aufschluss über die unterschiedliche Rolle der drei RAS-Formen in der Deregulation des genetischen Programms. Sie liefern Untersuchungsmaterial für weitergehende Studien zum Verständnis der unterschiedlichen Rolle der RAS-Isoformen in der normalen Entwicklung und der selektiven Aktivierung in Tumoren. Beispielsweise könnten spezifische cDNA- oder Oligonukleotid-Arrays hergestellt werden, mit denen entsprechende Tumoren analysiert werden.

8. Literaturverzeichnis

Aftab, D. T., Kwan, J., Martin, G. S. (1997). Ras-independent transformation by v-Src. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3028-3033

Aktas, H., Cai, H. and Cooper, G. M. (1997). Ras links growth factor signaling to the cell cycle via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. Mol. Cell Biol. 17, 3850-3857

Aoyama, A. and Klemenz, R. (1993). Oncogene-mediated effects on cellular gene expression. Crit. Rev. Oncog. 4, 53-94

Apolloni, A., Prior, I. A., Lindsay, M., Parton, R. and Hancock J. F. (2000). H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. Mol. Cell. Biol. 20(7), 2475-2487

Bae, S. C. et al. (1993). Isolation of PEBP2 α B cDNA representing the mouse homolog of human acute leukemia gene, AML1. Oncogene 8, 809-814

Balmain, A., Ramsden, M., Bowden, G. T. and Smith, J. (1984). Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. Nature 307, 658-660

Barbacid, M. (1987). Ras genes. Ann. Rev. Biochem. 56, 779-827

Bar-Sagi, D. (2001). Minireview-A Ras by any other name. Mol. Cell. Biol. 21(5), 1441-1443

Biscardi, J. S., Tice, D. A. and Parsons, S. J. (1999). c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. Adv. Cancer Res. 76, 61-119

Bodey, B., Bodey, B. Jr., Siegel, S. E., Kaiser, H. E. (2001, a)). Matrix metalloproteinases in neoplasm-induced extracellular matrix remodeling in breast carcinomas. Anticancer Res. 21, 2021-2028

- Bodey, B., Bodey, B. Jr., Groger, A. M., Siegel, S. E., Kaiser, H. E. (2001, b)). Invasion and metastasis: the expression and significance of matrix metalloproteinases in carcinomas of the lung. *In Vivo* 15, 175-180
- Bollag, G. and McCormick, F. (1991). Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature* 351, 576-579
- Boon, T., Cerottini, J.-C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. and Van Pel, A. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 337-365
- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682-4689
- Bos, J. L. (1995). Regulation of Ras-mediated signalling, *TIBS* 20, 18-22
- Bowman, T. et al. (2001). STAT3-mediated Myc expression is required for src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7319-7324
- Bowtell, D. D. (1999). Options available - from start to finish - for obtaining expression data by microarray. *Nature genetics* 21, supplement, 25-32
- Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Besser, D., Lathem, W. W. and Darnell, J. E. Jr (1998). Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2553-2558
- Brooks, G. et al. (1996). MARCKS functions as a novel growth suppressor in cells of melanocyte origin. *Carcinogenesis* 17, 683-689
- Brown, M. T., Cooper, J. A. (1996). Regulation, substrates and function of src. *Biochim. Biophys. Acta* 1287, 121-149
- Campbell, G. S., Yu, C.-L., Jove, R. and Carter-Su, C. (1997). Constitutive activation of JAK1 in Src-transformed cells. *J. Biol. Chem.* 272, 2591-2594
- Carbone, A., Gusella, D., Radzioch, D. and Varesio, L. (1991). Human Harvey-ras is biochemically different from Kirsten- or N-ras. *Oncogene* 6, 731-737

- Carlson, S. G., Eng, E., Kim, E. G., Perlman, E. J., Copeland, T. D., Ballermann, B. J. (1998). Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 1873-1880
- Chomcynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium/thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159
- Cobellis, G., Missero, C., Simionati, B., Valle, G., Di Lauro, R. (2001). Immediate early genes induced by H-Ras in thyroid cells. *Oncogene* 20, 2281-2290
- Counts, J. L. and Goodman, J. I. (1995). Alteration in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell*, 83, 13-15
- Courtneidge, S. A. (2002). Role of Src in signal transduction pathways. The Jubilee Lecture. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2): 11-17
- Cui, X., De Vivo, I., Slany, R., Miyamoto, A., Firestein, R., Cleary, M. L. (1998). Association of SET domain myotubularin-related proteins modulates growth control. *Nat. Genet.* 18, 331-337
- DeClue, J. E., Zhang, K., Redford, P., Vass, W. C., Lowy, D. R. (1991). Suppression of src transformation by overexpression of full-length GTPase-activating protein (GAP) or of the GAP C terminus. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2819-2825
- DeLorbe, W. J., Luciw, P. A., Goodman, H. M., Varmus, H. E., Bishop, J. M. (1980). Molecular cloning and characterization of avian sarcoma virus circular DNA molecules. *J. Virol.* 36, 50-61
- Demunter, A., Stas, M., Degreef, H., De Wolf-Peeters C. and van den Oord, J. J. (2001). Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 117(6), 1483-1489
- DePinho, R. A., Jacks, T. (2001). Introduction. The laboratory mouse in cancer research. *Semin. Cancer Biol.* 11 (3), 175-176

de Ruiter, N. D., Wolthuis, R. M. F., van Dam, H., Burgering, B. M. T. and Bos, J. L. (2000). Ras-dependent regulation of c-Jun phosphorylation is mediated by the Ral guanine nucleotide exchange factor-Ral pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8480-8488

De Vivo, I., Cui, X., Domen, J., Cleary, M. L. (1998). Growth stimulation of primary B cell precursors by the antiphosphatase Sbf1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9471-9476

Diatchenko, L. et al. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6025-6030

Downward, J. (1998). Ras signalling and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 49-54

Ebert, A. D. et al. (2000). Cripto-1-induced increase in vimentin expression is associated with enhanced migration of human caski cervical carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 257, 223-229

Ebinu, J. O. et al. (1998). RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280, 1082-1086

Esteban, L., et al. (2001). Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol. Cell. Biol.* 21(5), 1444-1452

Fan, J. and Bertino, J. R. (1997). K-ras mediates the cell cycle via both positive and negative regulatory pathways. *Oncogene* 14, 2595-2607

Favier, D., Gonda, T. J. (1994). Detection of proteins that bind to the leucine zipper motif of c-Myb. *Oncogene* 9, 305-311

Feng, J., Hua, F., Shuo, R., Chongfeng, G., Huimian, X., Nakajima, T., Subao, W. and Tsuchida, N. (2001). Upregulation of non-mutated H-ras and its upstream and downstream signaling proteins in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 8(6), 1409-1413

Fernstrom, M. J. et al. (2002). Neoplastic reversal of human ovarian carcinoma cells transfected with connexin43. *Exp. Mol. Pathol.* 73, 54-60

- Fiorucci, G. and Hall, A. (1988). All three human ras genes are expressed in a wide range of tissues. *Biochem. Biophys. Acta* 950, 81-83
- Firestein, R., Cleary, M. L. (2001). Pseudo-phosphatase Sbf1 contains an N-terminal GEF homology domain that modulates its growth regulatory properties. *J. Cell Sci.* 114, 2921-2927
- Firestein, R. et al. (2002). Male infertility, impaired spermatogenesis, and azoospermia in mice deficient for the pseudophosphatase Sbf1. *J. Clin. Invest.* 109, 1165-1172
- Francis-Lang, H., Zannini, M., De Felice, M., Berlingieri, M. T., Fusco, A. and Di Lauro, R. (1992). Multiple mechanisms of interference between transformation and differentiation in thyroid cells. *Mol. Cell Biol.* 12, 5793-5800
- Frank, D. A. (2006). STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. *Cancer Lett.* Epub ahead of print
- Fukazawa, H., Uehara, Y. (2000). U0126 reverses Ki-ras-mediated transformation by blocking both mitogen-activated protein kinase and p70S6 kinase pathways. *Cancer Res.* 60, 2104-2107
- Fukazawa, H., Mizuno, S., Uehara, Y. (1995). A microplate assay for quantification of anchorage-independent growth for transformed cells. *Anal. Biochem.* 228, 83-90
- Fukukawa, C., Shima, H., Tanuma, N., Ogawa, K., Kikuchi, K. (2000). Up-regulation of I-2(PP2A)/SET gene expression in rat primary hepatomas and regenerating livers. *Cancer Lett.* 161, 89-95
- Furstoss, O. et al. (2002). c-ABL is an effector of Src for growth factor-induced c-myc expression and DNA synthesis. *EMBO J.* 21, 514-524
- Furth, M. E., Aldrich, T. H. and Cordon-Cerdo, C. (1987). Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissue. *Oncogene* 1, 47-58
- Garcia, R. et al. (1997). Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* 8, 1267-1276

- Gartel, A. L., Goufman, E., Tevosian, S. G., Shih, H., Yee, A. S., Tyner, A. L. (1998). Activation and repression of p21(WAF/CIP1) transcription by RB binding proteins. *Oncogene* 17, 3463-3469
- Geyer, M. and Wittinghofer, A. (1997). Taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 786-792
- Gille, H. and Downward, J. (1999). Multiple Ras effector pathways contribute to G1 cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* 274, 22033-22040
- Goi, T., Shipitsin, M., Lu, Z., Foster, D. A., Klinz, S. G. and Feig, L. A. (2000). An EGF receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-src activity and substrate specificity. *EMBO* 19(4), 623-630
- Grassilli, E., Salomoni, P., Perrotti, D., Franceschi, C., Calabretta, B. (1999). Resistance to apoptosis in CTLL-2 cells overexpressing B-Myb is associated with B-Myb-dependent bcl-2 induction. *Cancer Res.* 59, 2451-2456
- Griegel, S., Traub, O., Willecke, K. and Schäfer, R. (1986). Suppression and reexpression of transformed phenotype in hybrids of Ha-ras-1-transformed Rat-1 cells and early-passage rat embryonic fibroblasts. *Int. J. Canc.* 38, 697-705
- Groudine, M., Weintraub, H. (1980). Activation of cellular genes by avian RNA tumor viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5351-5354
- Guerrero, I. and Pellicer, A. (1987). Mutational activation of oncogenes in animal model systems of carcinogenesis. *Mutat. Res.* 185, 293-308
- Guerrero, I., Calzada, P., Mayer, A. and Pellicer, A. (1984, a)). A molecular approach to leukemogenesis: mouse lymphomas contain a activated c-ras oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 202-205

Guerrero, I., Villasante, A., D'Eustachio, P., Pellicer, A. (1984, b)). Isolation, characterization, and chromosome assignment of mouse N-ras gene from carcinogen-induced thymic lymphoma. *Science* 225, 1041-1043

Guerrero, S., Casanova, I., Farre, L., Mazo, A., Capella, G. and Mangués R. (2000). K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance of apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res.* 60, 6750-6756

Haas, K. et al. (1997). Malignant transformation by cyclin E and Ha-Ras correlates with lower sensitivity towards induction of cell death but requires functional Myc and CDK4. *Oncogene* 15, 2615-2623

Hahn, W. C., et al. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468

Hakak, Y., Hsu, Y. S., Martin, G. S. (2000). Shp-2 mediated v-Src-induced morphological changes and activation of the anti-apoptotic protein kinase Akt. *Oncogene* 19, 3164-3171

Hamilton, M. and Wolfman, A. (1998). Ha-ras and N-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo. *Oncogene* 16(11), 1417-1428

Harvey, J. J. (1964). An unidentified virus which causes rapid production of tumors in mice. *Nature* 204, 1104-1105

Heidkamp, M. C. et al. (2007). Protein kinase Cepsilon-dependent MARCKS phosphorylation in neonatal and adult rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 42, 422-431

Heinrich, J. et al. (2000). Induction of putative tumor-suppressing genes in Rat-1 fibroblasts by oncogenic Raf-1 as evidenced by robot-assisted complex hybridization. *J. Mol. Med.* 78, 380-388

Hill, C. S., Wynne, J. and Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81, 1159-1170

Hirai, H. and Varmus, H. E. (1990). Mutations in src homology regions 2 and 3 of activated chicken c-src that results in preferential transformation of mouse or chicken cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8592-8596

Hori, M., Inagawa, S., Shimazaki, J., Itabashi, M. and Hori, M. (2000). Overexpression of mitogen-activated protein kinase superfamily proteins unrelated to Ras and AF-1 of estrogen receptor alpha mutation in advanced stage human breast cancer. *Pathol. Res. Pract.* 196(12), 817-826

Hunter, T. (1997). Oncoprotein Networks. *Cell* 88, 333-346

Irby, R. B., Yeatman, T. J. (2002). Increased Src activity disrupts cadherin/catenin-mediated homotypic adhesion in human colon cancer and transformed rodent cells. *Cancer Res.* 62, 2669-2674

Iten, E., Ziemiecki, A., and Schäfer, R. (1989). The transformation-suppressive function is lost in tumorigenic cells and is restored upon transfer of a suppressor gene. *Rec. Results in Cancer Res.* 113, 78-89

Itho, S., Okada, M. and Nakagawa, H. (1995). Isolation and characterization of a novel membrane-associated protein tyrosine phosphatase-like protein expressed preferentially in the central nervous system. Unpublished reference. Database NCBI Sequence Viewer.

Janda, E., Lekmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H. and Grünert, S. (2002). Ras and TGF β cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J. Cell Biol.* 156(2), 299-314

Jeong, S. J. et al. (2006). Increased association of Dynamin II with myosin II in ras transformed NIH3T3 cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 38, 556-562

Johnson, D. G. and Schneider-Broussard, R. (1998). Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front. Biosci.* 3, d447-458

- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R. T., Umanoff, H., Edelman, W., Kucherlapati, R. and Jacks, T. (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev.* 11, 2468-2481
- Jones, M. K. and Jackson, J. H. (1998). Ras-GFR activates Ha-Ras but not N-Ras or K-Ras 4B, protein *In vivo*. *J. Biol. Chem.* 273, 1782-1787
- Joo, Y. E., Rew, J. S., Park, C. S., Kim, S. J. (2002). Expression of E-cadherin, alpha- and beta-catenins in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* 2, 129-137
- Karube, H., Masuda, H., Ishii, Y., Takayama, T. (2002). E-cadherin expression is inversely proportional to tumor size in experimental liver metastases. *J. Surg. Res.* 106, 173-178
- Kerr, L. D., Olashaw, N. E., Matrisian, L. M. (1988). Transforming growth factor beta 1 and cAMP inhibit transcription of epidermal growth factor- and oncogene-induced transin RNA. *J. Biol. Chem.* 263, 16999-17005
- Khosravi-Far, R., Campbell, S., Rossman, K. L. and Der, C. J. (1998). Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of the Rho family proteins. *Adv. Cancer Res.* 72, 57-107
- Kim, K., Lindstrom, M. J. and Gould, M. N. (2002). Regions of H- and K-ras that provide organ specificity/potency in mammary cancer induction. *Cancer Res.* 62, 1241-1245
- King, T. J. et al. (2002). Inducible expression of the gap junction protein connexin43 decreases the neoplastic potential of HT-1080 human fibrosarcoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Carcinog.* 35, 29-41
- Kirsten, W. H. and Mayer, L. A. (1967). Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 39, 311-335
- Kisseljova, N. P. et al. (1998). De novo methylation of selective CpG dinucleotide clusters in transformed cells mediated by an activated N-ras. *Int. J. Oncol.* 12, 203-209

- Kleer, C. G. et al. (2002). Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. *Am. J. Pathol.* 160, 579-584
- Koike, K., Kawabe, T., Tanaka, T., Toh, S., Uchiumi, T., Wada, M., Akiyama, S., Ono, M. and Kuwano, M. (1997). A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res.* 57, 5475-5479
- Koreth, J., Bakkenist, C. J., Larin, Z., Hunt, N. C., James, M. R., McGee, J. O. (1999). 11q23.1 and 11q25-qter YACs suppress tumour growth in vivo. *Oncogene* 18, 1157-1164
- Kumar, R., Sukumar, S., Barbacid, M. (1990). Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia. *Science* 248, 1101-1104
- Kyriakis, J. M. et al. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417-421
- Land, H., Parada, L. F., Weinberg, R. A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602
- Lavender, P., Vandel, L., Bannister, A. J., Kouzarides, T. (1997). The HMG-box transcription factor HBP1 is targeted by the pocket proteins and E1A. *Oncogene* 14, 2721-2728
- Lee, K., Belinsky, M. G., Bell, D. W., Testa, J. R. and Kruh, G. D. (1998). Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res.* 58, 2741-2747
- Lefebvre, L. et al. (2002). Oncoviral bovine leukemia virus G4 and human T-cell leukemia virus type 1 p13(II) accessory proteins interact with farnesyl pyrophosphate synthase. *J. Virol.* 76, 1400-1414
- León, J., Guerrero, I. and Pellicer, A. (1987). Different expression of the ras gene family in mice. *Mol. Cell Biol.* 7, 1535-1540

- Leone, G., De Gregori, J., Sears, R., Jakoi, L., Nevins, J. R. (1997). Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* 387, 422-426
- Lin, K. M. et al. (2001). Cloning and expressin of human HBP1, a high mobility group protein that enhances myeloperoxidase (MPO) promoter activity. *Leukemia* 15, 601-612
- Lloyd, A. C. (1998). Ras versus cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 43-48
- Lloyd, A. C. et al. (1997). Cooperating oncogenes converge to regulate cyclin/cdk complexes. *Genes Dev.* 11, 663-677
- Lowy, D. R. and Willumsen, B. M. (1993). Function and regulation of ras. *Ann. Rev. Biochem.* 62, 851-891
- Lurquin, C. et al. (1997). Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins. *Genomics* 46, 397-408
- Macaluso, M. et al. (2002). Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J. Cell. Physiol.* 192, 125-130
- Maher, J., Baker, D., Manning, M., Dibb, N. J. and Roberts, I. A. G. (1995). Evidence for cell-specific differences in transformation by N-, H- and K-ras. *Oncogene* 11, 1639-1647
- Malumbres, M. and Pellicer A. (1998). Ras pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front. Bioscience* 3, 887-912
- Manenti, S. et al. (1998). Overexpression of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate in human choroidal melanoma cells affects cell proliferation. *Cancer Res.* 58, 1429-1434
- Masaki, T. et al. (2005). Comparison study of the expressions of myristoylated alanine-rich C kinase substrate in hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis, chronic hepatitis, and normal liver. *Int. J. Oncol.* 26, 661-671

- Michieli, P. et al. (1996). Inhibition of oncogene-mediated transformation by ectopic expression of p21Waf1 in NIH 3T3 cells. *Oncogene* 12, 775-784
- Miller, M. J. et al. (1997). RalGDS functions in Ras- and cAMP-mediated growth stimulation. *J. Biol. Chem.* 272, 5600-5605
- Mitin, N., Rossmann, K. L., Der, C. J. (2005). Signalling interplay in Ras superfamily function. *Curr. Biol.* 15 (14), R 563-574. Review
- Mizuno, T., Kaibuchi, K., Yamamoto, T., Kawamura, M., Sakoda, T., Fujioka, H., Matsuura, Y. and Takai, Y. (1991). A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translationally processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6442-6446
- Monaco, C., Negrini, M., Sozzi, G., Veronese, M. L., Vorechovsky, I., Godwin, A. K. and Croce, C. M. (1997). Molecular cloning and characterization of BCSC-1, a candidate tumor suppressor gene at 11q23. Unpublished Reference. Database NCBI Sequence Viewer.
- Monaco, C., et al. (1997). Molecular cloning and characterization of LOH11CR2A, a new gene within a refined minimal region of LOH at 11q23. *Genomics* 46, 217-222
- Montagner, A. et al. (2005). A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation. *J. Biol. Chem.* 280 (7), 5350-5360
- Mulligan, R. C., Berg, P. (1981). Selection for animal cells that express the Escherichia coli gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 2072-2076
- Nagafuchi, A., Shirayoshi, Y., Okazaki, K., Takeichi, M. (1987). Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* 329, 341-343
- Nagase, H. and Woessner, J. F. Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491-21494

- Ness, S. A. (1999). Myb binding proteins: regulators and cohorts in transformation. *Oncogene* 18, 3039-3046
- Nori, M., Vogel, U. S., Gibbs, J. B., Weber, M. J. (1991). Inhibition of v-src-induced transformation by a GTPase-activating protein. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2812-2818
- Odajima, J., Matsumura, I. et al. (2000). Full oncogenic activities of v-src are mediated by multiple signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 275(31), 24096-24105
- Ogawa, E. et al. (1993). PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6859-6863
- Oldham, S.M., Cox, A. D., Reynolds, E.R., Sizemore, N. S., Coffey, R. J. Jr, Der, C. J. (1998). Ras, but not Src, transformation of RIE-1 epithelial cells is dependent on activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Oncogene* 16, 2565-2573
- Olson, M. F. and Marais, R. (2000). Ras protein signalling. *Sem. in Immun.* 12, 63-73
- Ornstein, D. L., Cohn, K. H. (2002). Balance between activation and inhibition of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is altered in colorectal tumours compared to normal colonic epithelium. *Dig. Dis. Sci.* 47, 1821-1830
- Ostrowski, L. E. et al. (1988). Expression pattern of a gene for a secreted metalloproteinase during late stages of tumour progression. *Mol. Carcinog.* 1, 13-19
- Penuel, E. and Martin, G. S. (1999). Transformation by v-Src: Ras-MAPK and PI3K-mTOR mediate parallel pathways. *Mol. Biol. of the Cell* 10, 1693-1703
- Plattner, R., Gupta, S., Khosravi-Far, R., Sato, K. Y., Perucho, M., Der, C. J., Stanbridge, E. J. (1999). Differential contribution of the ERK and JNK mitogen-activated protein kinase cascades to Ras transformation of HT1080 fibrosarcoma and DLD-1 colon carcinoma cells. *Oncogene* 18, 1807-1817

Prendergast, G. C. et al. (1995). Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 10, 2289-2296

Prior, I. A. and Hancock, J. F. (2000). Compartmentalization of Ras proteins. *J. Cell. Science* 114, 1603-1608

Qin, L. X., Tang, Z. Y. (2002). The prognostic molecular marker in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 8, 385-392

Qiu, R. G., Chen, J., Kim, D., McCormick, F. and Symons, M. (1995, a)). An essential role for Rho in Ras transformation. *Nature* 374, 457-459

Qiu, R. G., Chen, J., McCormick, F. and Symons, M. (1995, b)). A role for Rho in Ras transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6443-6453

Quade, K. (1979). Transformation of mammalian cells by avian myelocytomatosis virus and avian erythroblastosis virus. *Virology* 98 (2), 461-465

Raudies, O., et al. (2005). Functional analysis and secondary expression profiling of candidate genes deregulated in conjunction with oncogenic Ras signalling. *Adv. Enzyme Regul.* 45, 63-84

Reilly, J. F., Martinez, S. D., Mickey, G., Maher, P. A. (2002). A novel role for farnesyl pyrophosphate synthase in fibroblast growth factor-mediated signal transduction. *Biochem. J.* 366, 501-510

Rodenhuis, S. (1992). ras and human tumors. *Semin. Cancer Biol.* 3, 241-247

Rodriguez-Viciano, P. et al. (1997). Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89, 457-467

Roy, S., Wyse, B. and Hancock, J. F. (2002). H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis. *Mol. Cell. Biol.* 22(14), 5128-5140

Sager, R., Sheng, S., Pemberton, P. and Hendrix, M. J. (1997). Maspin. A tumor suppressing serpin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 425, 77-88

Sahai, E., Olson, M. F. and Marshall, C. J. (2001). Cross-talk between Ras and Rho signaling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO* 20, 755-766

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Satake, M., Inuzuka, M., Shigesada, K., Oikawa, T., Ito, Y. (1992). Differential expression of subspecies of polyomavirus and murine leukemia virus enhancer core binding protein, PEBP2, in various hematopoietic cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 83, 714-722

Scaife, R. et al. (1994). Growth factor-induced binding of dynamin to signal transduction proteins involves sorting to distinct and separate proline-rich dynamin sequences. *Embo J.* 13, 2574-2582

Schäfer, R., Tchernitsa, Ol. and Sers, C. (2006). Global effects of Ras signaling on the genetic program in mammalian cells. *Ras family GTPases, proteins and cell regulation*, Vol.4, Springer, 169-198

Schlagbauer-Wadl, H. et al. (1999). Influence of increased c-Myc expression on the growth characteristics of human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 112, 332-336

Schlessinger, J. (1993). How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem. Sci.* 18, 273-275

Schulze, A. et al. (2001). Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes and Dev.* 15, 981-994

Schwieger, A., Bauer, L., Hanusch, J., Sers, C. Schäfer, R. and Bauer, G. (2001). ras oncogene expression determines sensitivity for intercellular induction of apoptosis. *Carcinogenesis* 22(9), 1385-1392

Scita, G. et al. (2000). New EMBO members' Review: Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO* 19, 2393-2398

Serrano, M. et al. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602

Sers, C. et al. (1997). Growth-inhibitory activity and downregulation of the class II tumor-suppressor gene H-rev107 in tumor cell lines and experimental tumors. *J. Cell Biol.* 136, 935-944

Shimuzu, K. et al. (1983). Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2112-2116

Sinn, E. et al. (1987). Coexpression of MMTV/v-H-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* 49, 465-475

Soejima, K. Fang, W., Rollins, B. J. (2003). DNA methyltransferase 3b contributes to oncogenic transformation induced by SV40T antigen and activated Ras. *Oncogene* 22, 4723-4733

Southern, P. J., Berg, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327-341

Stacey, D. W., Roudebush, M., Day, R., Mosser, S. D., Gibbs, J. B., Feig, L. A. (1991). Dominant inhibitory Ras mutants demonstrate the requirement for Ras activity in the action of tyrosine kinase oncogenes. *Oncogene* 6, 2297-2304

Stokoe, D. et al. (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264, 1463-1467

Sukumar, S., Notario, V., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M. (1983). Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutation. *Nature* 306, 658-661

- Tchernitsa, OI. et al. (2004). Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells. *Oncogene* 23 (26), 4536-4555
- Tchernitsa, OI. et al. (2006). Effects of Ras signaling on gene expression analyzed by customized microarrays. *Methods in Enzymology* 407, Academic Press, 373-387
- Tevosian, S. G., Shih, H. H., Mendelson, K. G., Sheppard, K. A., Paulson, K. E., Yee, A. S. (1997). HBP1: a HMG box transcriptional repressor that is targeted by the retinoblastoma family. *Genes Dev.* 11, 383-396
- Thompson, T. A., Kim, K. and Gould, M. N. (1998). Harvey ras results in a higher frequency of mammary carcinomas than Kirsten ras after direct retroviral transfer into the rat mammary gland. *Cancer Res.* 58, 5097-5104
- Tokumitsu, Y., Nakano, S., Ueno and H., Niho, Y. (2000). Suppression of malignant growth potentials of v-Src-transformed human gallbladder epithelial cells by adenovirus-mediated dominant negative H-Ras. *J. Cell. Physiol.* 183(2), 221-227
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205-215
- Tseng, H. (1998). Basonuclin, a zinc finger protein associated with epithelial expansion and proliferation. *Front. Biosci.* 3, D985-988
- Tseng, H., Biegel, J. A., Brown, R. S. (1999). Basonuclin is associated with the ribosomal RNA genes on human keratinocyte mitotic chromosomes. *J. Cell. Sci.* 112, 3039-3047
- Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R. P. and Jove, R. (1998). Stat3 activation by Src induced specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2545-2552
- Umanoff, H., Edelmann, W., Pellicer, A. and Kucherlapati, R. (1995). The murine N-ras gene is not essential for development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1709-1713

- Van Pel, A. et al. (1995). Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T-lymphocytes. *Immunol. Rev.* 145, 229-250
- Vikis, H. G., Steward, S. and Guan, K. L. (2002). SmgGDS displays differential binding and exchange activity towards different Ras isoforms. *Oncogene* 21, 2425-2432
- Villalonga, P., Lopez-Alcala, C. et al. (2001). Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras, and modulates its downstream signaling. *Mol. Cell. Biol.* 21(21), 7345-7354
- Villalonga, P. et al. (2002). Calmodulin prevents activation of Ras by PKC in 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 277 (40), 37929-37935
- Voice, J. K., Klemke, R. L., Le, A. and Jackson, J. H. (1999). Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation and stimulate cell motility. *J. Biol. Chem.* 274, 17164-17170
- Von Lintig, F. C. et al. (2000). Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 62 (1), 51-62
- Von Stein, O. D., Thies, W. G., Hofman, M. (1997). A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 25, 2598-2602
- Walsh, A. B. and Bar-Sagi, D. (2001). Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras. *J. Biol. Chem.* 276(19), 15609-15615
- Wang, T., Yamashita, K., Iwata, K., Hayakawa, T. (2002). Both tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and TIMP-2 activate Ras but through different pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 201-205
- Webb, B. L., Jimenez, E. and Martin, G. S. (2000). v-Src generates a p53-independent apoptotic signal. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9272-9280
- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S. and Axel, R. (1978). Biochemical transfer of single-copy eukaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* 14, 725-731

- Winston, J. T., Coats, S. R., Wang, Y. Z. and Pledger, W. J. (1996). Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. *Oncogene* 12, 127-134
- Wittinghofer, A. and Nassar, N. (1996). How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem. Sci.* 21, 488-491
- Xu, K., Hou, S., Du, Z. (2002). Prognostic value of metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in bladder carcinoma. *Chin. Med. J. (Engl.)* 115, 743-745
- Xu, X. L. et al. (2001). Inactivation of human SRBC, located within the 11p15.5-p15.4 tumor suppressor region, in breast and lung cancer. *Cancer Res.* 61, 7943-7949
- Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A. and Hancock J. F. (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and Phosphoinositide 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* 273(37), 24052-24056
- Yan, Z., Chen, M., Perucho, M. and Friedman, E. (1997, a)). Oncogenic Ki-ras but not oncogenic Ha-ras blocks integrin β 1-chain maturation in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 30928-30936
- Yan, Z., Deng, M., Chen, M., Xu, Y., Ahram, M., Sloane, B. F. and Friedman, E. (1997, b)). Oncogenic c-Ki-ras but not oncogenic c-Ha-ras up-regulates CEA expression and disrupts basolateral polarity in colon epithelial clls. *J- Biol. Chem.* 272, 27902-27907
- Yoon, S. Y. et al. (2001). Grb2 dominantly associates with dynamin II in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *J. Cell Biochem.* 84, 150-155
- Zajac-Kaye, M. (2001). Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. *Lung Cancer* 34, S43-46
- Zarbl, H., Sukumar, S., Arthur, A. V., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M. (1985). Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature* 315, 382-385

Zhang, L. et al. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276, 1268-1272

Zheng, Y., Cerione, R., Bender, A. (1994). Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J. Biol. Chem.* 269, 2369-2372

Zheng, Y., Hart, M. J., Shinjo, K., Evans, T., Bender, A., Cerione, R. A. (1993). Biochemical comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* Bem2 and Bem3 proteins. Delineation of a limit Cdc42 GTPase-activating protein domain. *J. Biol. Chem.* 268, 24629-24634

Zuber, J., Tchernitsa, O. I., Hinzmann, B., Schmitz, A. C., Grips, M., Hellriegel, M., Sers, C., Rosenthal, A. and Schäfer, R. (2000). A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nature genetics* 24, 144-152

9. Anhang

In diesem Kapitel sind die Autoradiografien der reversen Northern-Blots und der konventionellen Northern-Blots aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit zusammenhängend abgebildet.

9.1. Reverse Northern-Blots

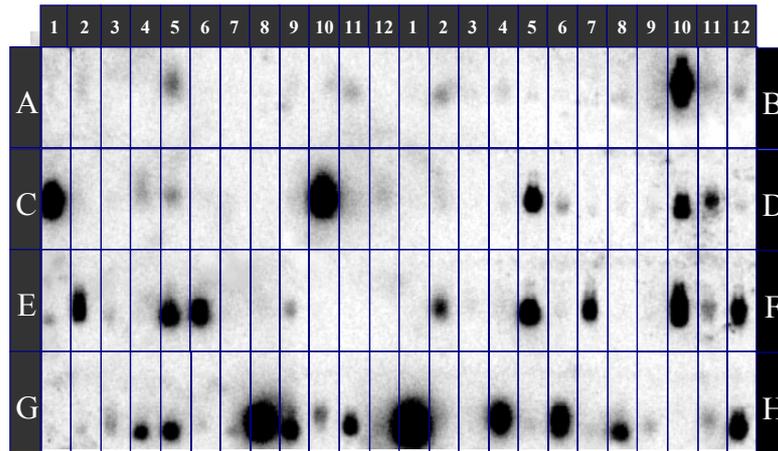
Die Hybridisierung erfolgte mit ^{32}P -radioaktiv markierten Gensonden aus RNA von H-, K- und NRAS-transformierten Zellen (s. Beschreibung zu jeweiligem Filter).

Membranen DO1, DO2 und DO3: mit Genen (cDNA) bestückt, die in HRAS-transformierten Rattenfibroblastenzellen (FE8) im Vergleich zu den nicht-transformierten 208F-Zellen und/oder die in KRAS-transformierten Ovarialepithelzellen (ROSE A2/5) im Vergleich zu den nicht-transformierten ROSE-199-Zellen erhöhte mRNA-Spiegel aufwiesen (hochregulierte Gene)

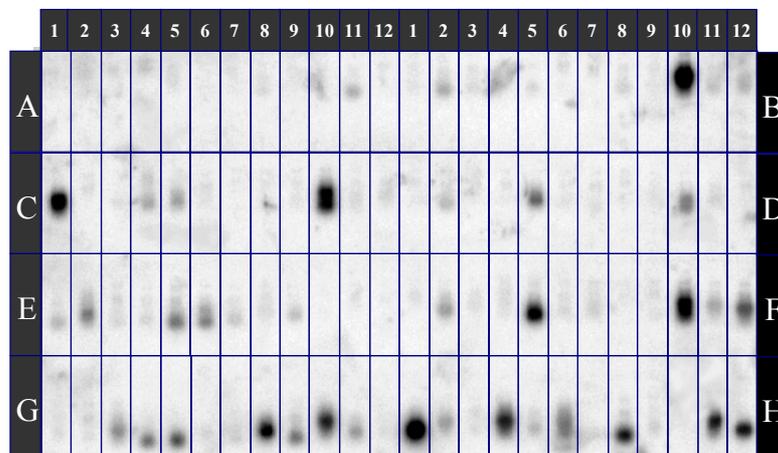
Membranen DT2 und DT3: mit Genen bestückt, die in den transformierten Zellen erniedrigte mRNA-Spiegel aufwiesen (reprimierte Gene)

Zur Normalisierung der Hybridisierungsintensitäten wurde jeweils in Position H12 (s. Koordinatenraster über jeder Membran) eine GAPDH-Kontrolle mitgeführt.

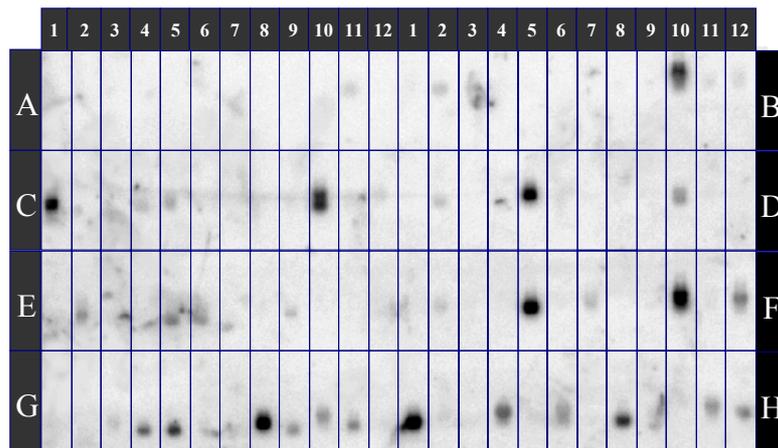
Die Gennamen mit ihren Koordinaten finden sich in den Tabellen 3 und 4 unter Resultate.



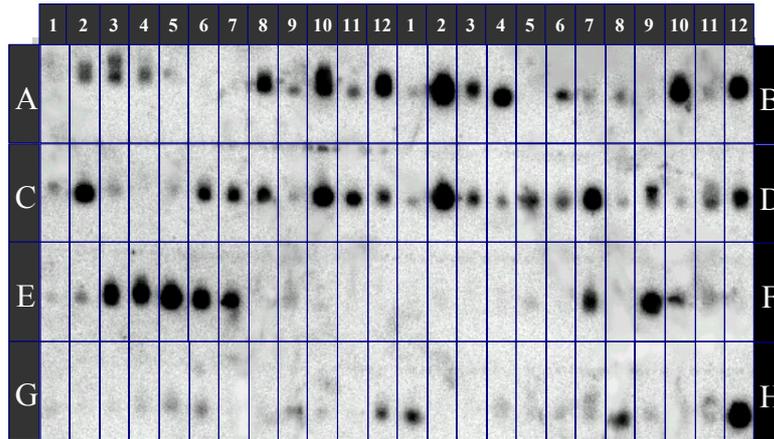
DO1, Sonde: 32 P-markierte cDNA aus HRAS-transformierten Zellen (FE-8)



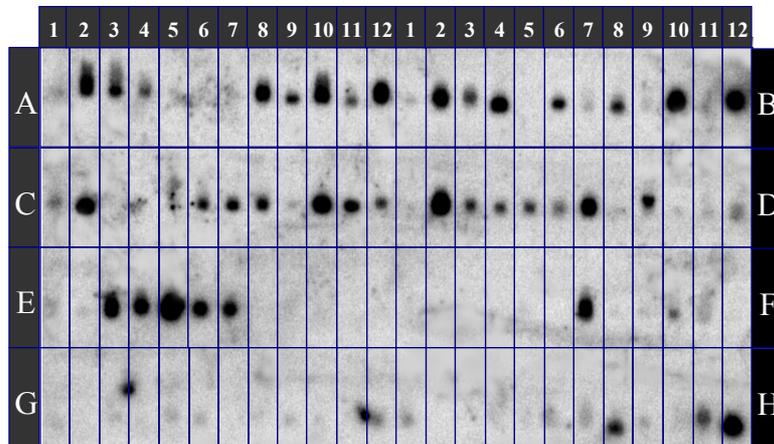
DO1, Sonde: 32 P-markierte cDNA aus KRAS-transformierten Zellen (Klon 3)



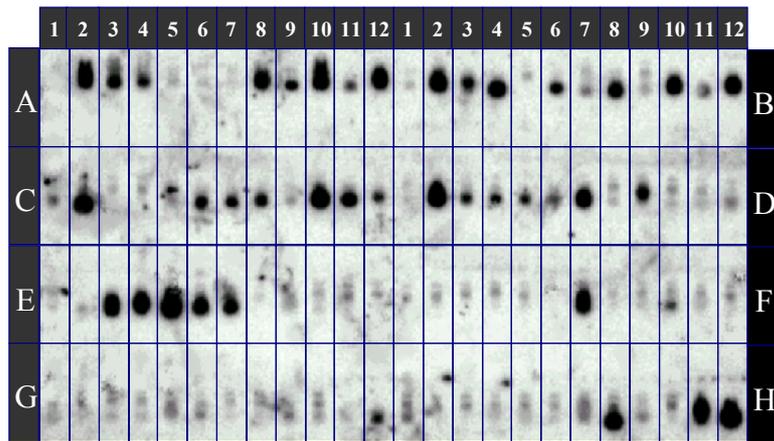
DO1, Sonde: 32 P-markierte cDNA aus NRAS-transformierten Zellen (Klon 3)



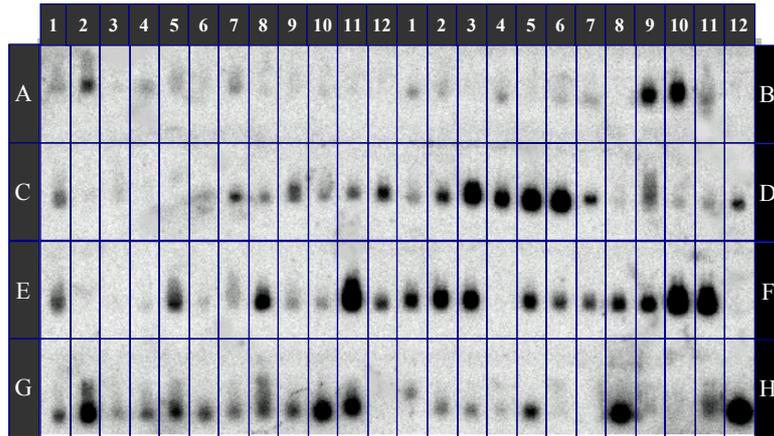
DO2, Sonde: 32 p-markierte cDNA aus HRAS-transformierten Zellen (FE-8)



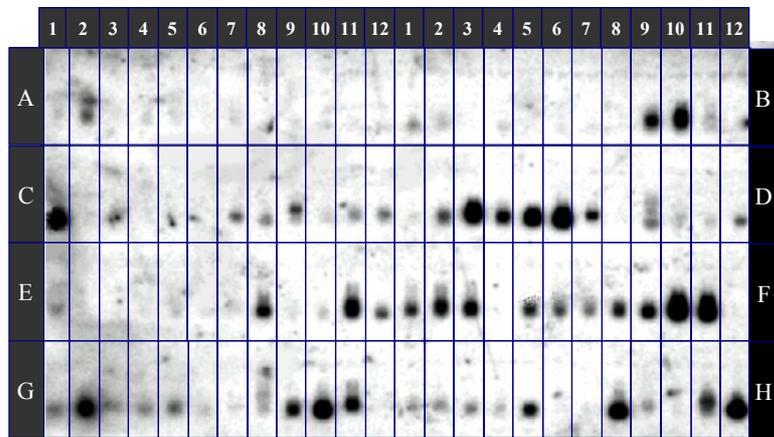
DO2, Sonde: 32 p-markierte cDNA aus KRAS-transformierten Zellen (Klon 3)



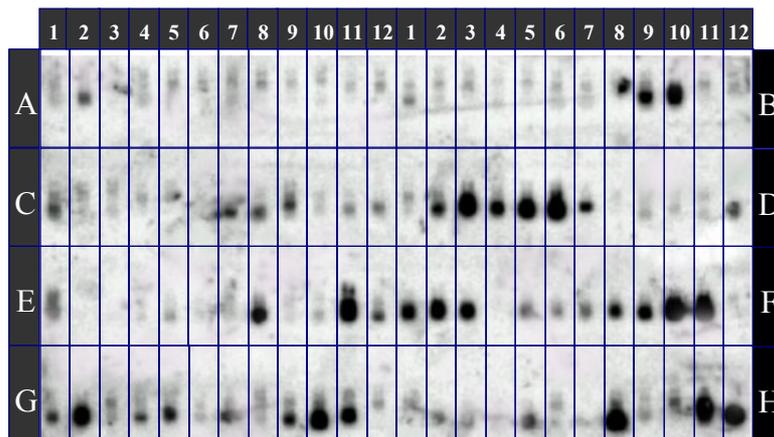
DO2, Sonde: 32 p-markierte cDNA aus NRAS-transformierten Zellen (Klon 3)



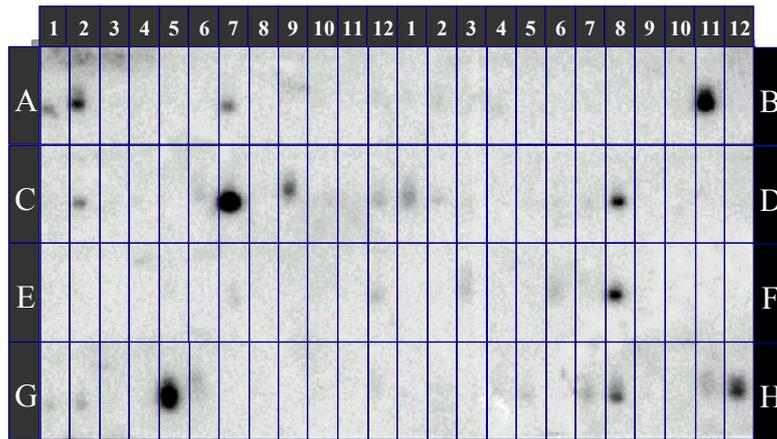
DO3, Sonde: ^{32}p -markierte cDNA aus HRAS-transformierten Zellen (FE-8)



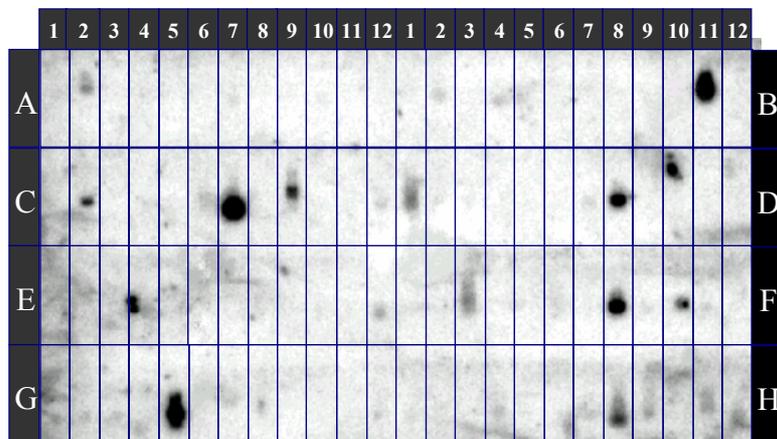
DO3, Sonde: ^{32}p -markierte cDNA aus KRAS-transformierten Zellen (Klon 3)



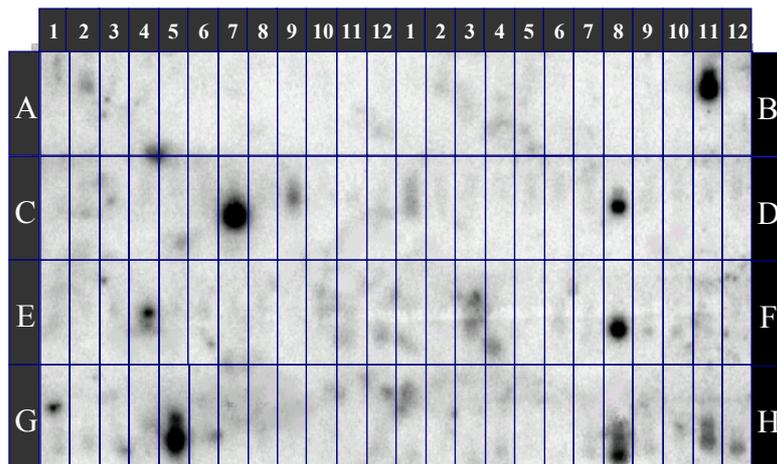
DO3, Sonde: ^{32}p -markierte cDNA aus NRAS-transformierten Zellen (Klon 3)



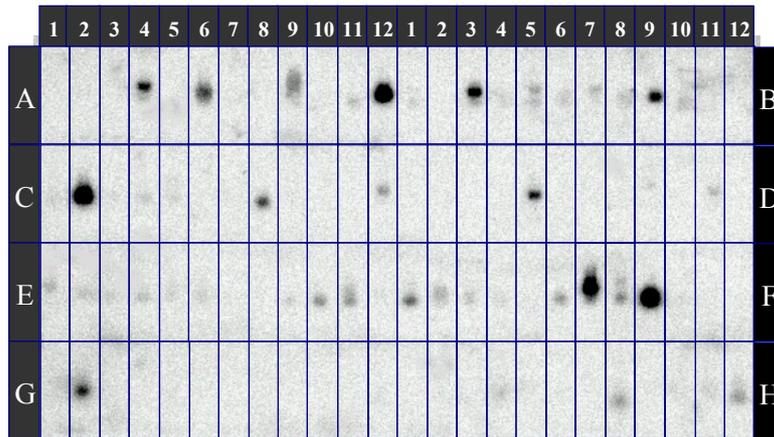
DT2, Sonde: ^{32}p -markierte cDNA aus HRAS-transformierten Zellen (FE-8)



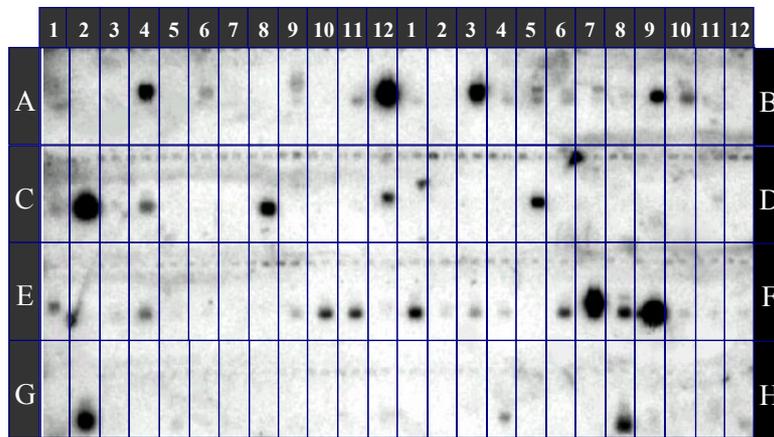
DT2, Sonde: ^{32}p -markierte cDNA aus KRAS-transformierten Zellen (Klon 3)



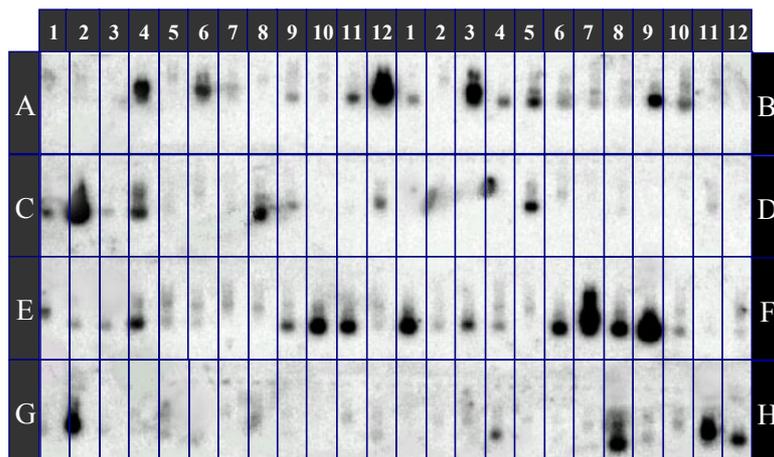
DT2, Sonde: ^{32}p -markierte cDNA aus NRAS-transformierten Zellen (Klon 3)



DT3, Sonde: ^{32}p -markierte cDNA aus HRAS-transformierten Zellen (FE-8)



DT3, Sonde: ^{32}p -markierte cDNA aus KRAS-transformierten Zellen (Klon 3)



DT3, Sonde: ^{32}p -markierte cDNA aus NRAS-transformierten Zellen (Klon 3)

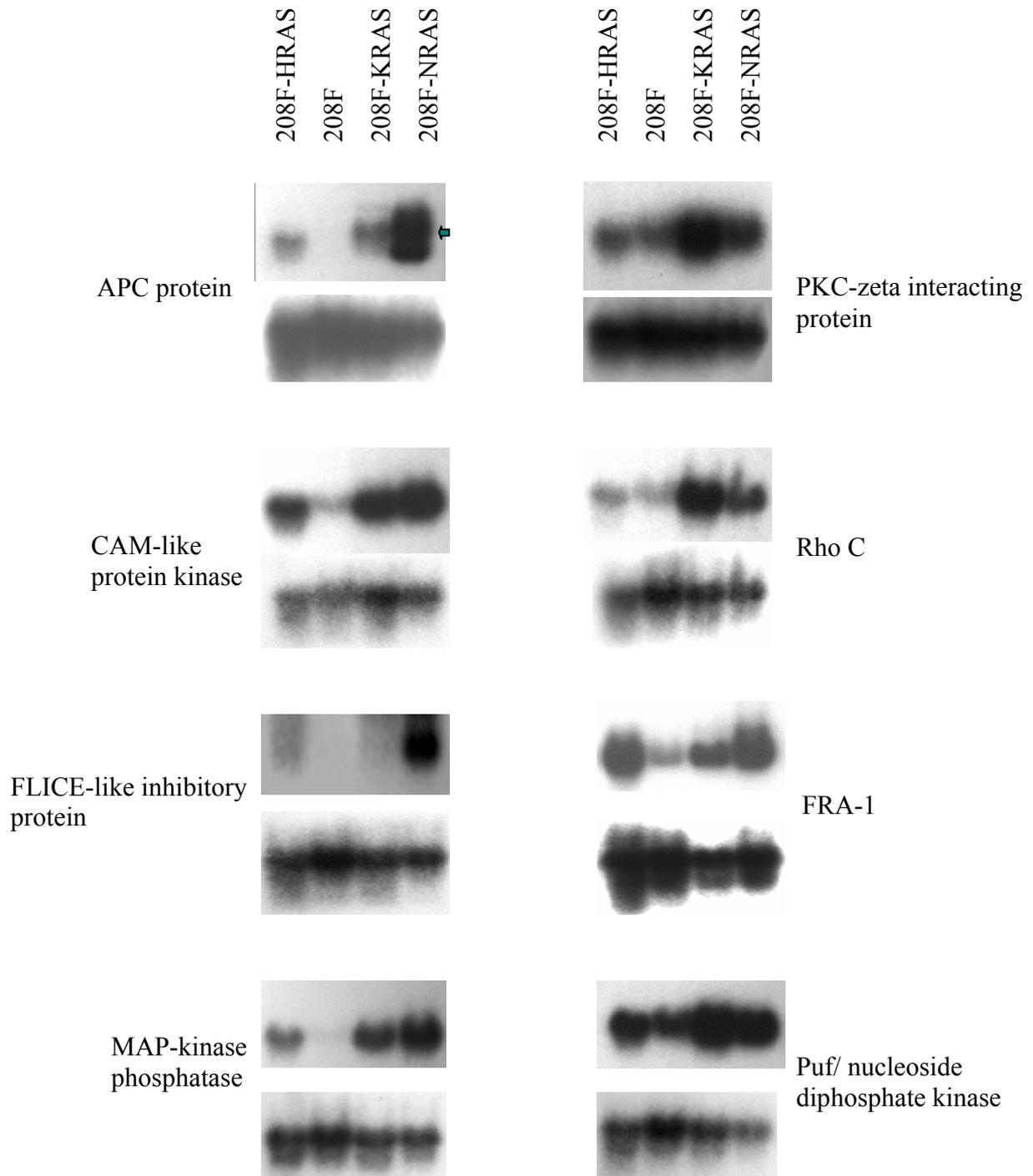
9.2. Konventionelle Northern-Blots

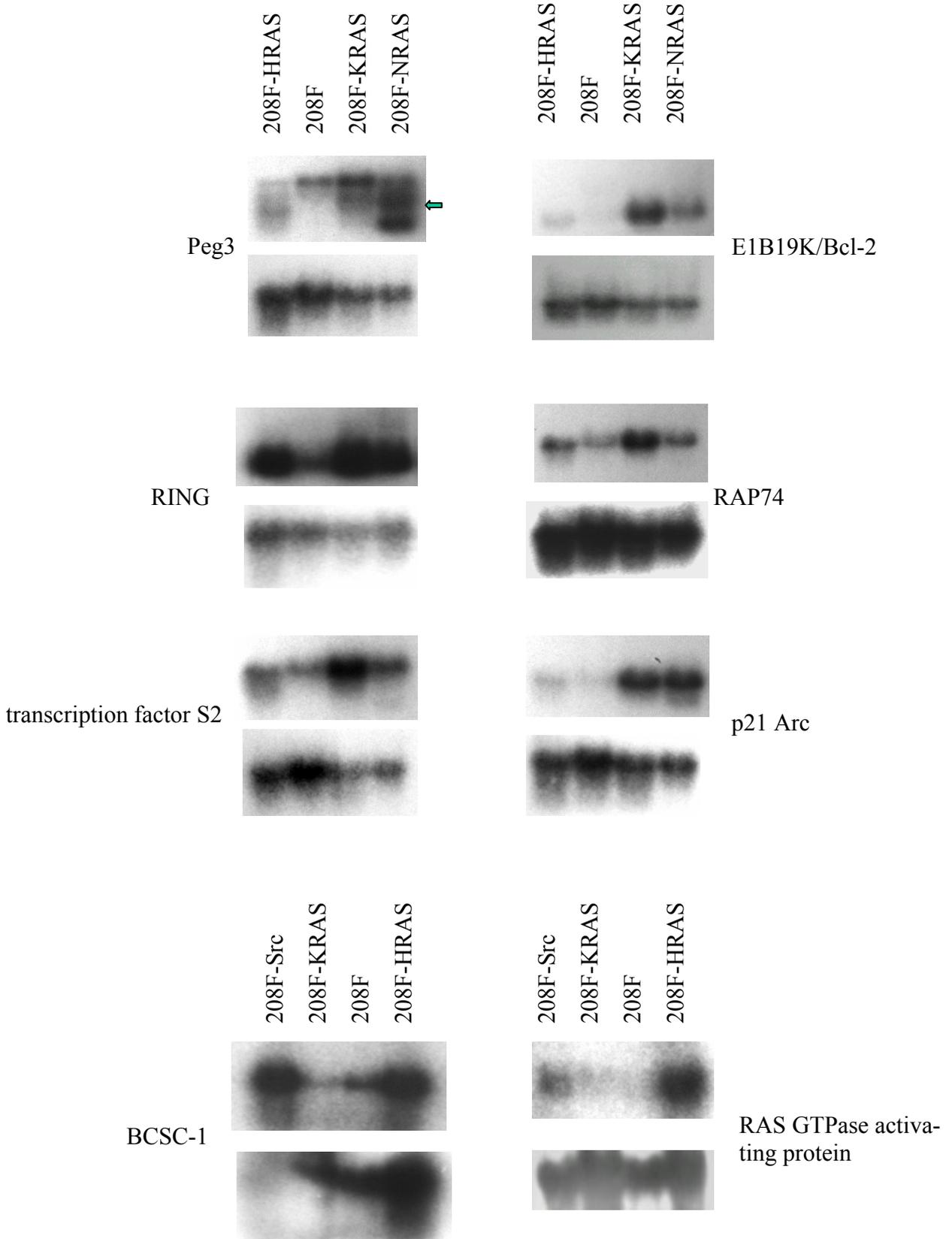
Die Hybridisierung erfolgte mit radioaktiv markierten Gensonden aus Plasmid-DNA (Bezeichnung des Gens jeweils neben jedem Blotbild). Zur Ladungskontrolle wurde nach Abklingen der radioaktiven Sonde jede Membran mit einer ^{32}P -markierten 28S RNA-Sonde noch einmal hybridisiert.

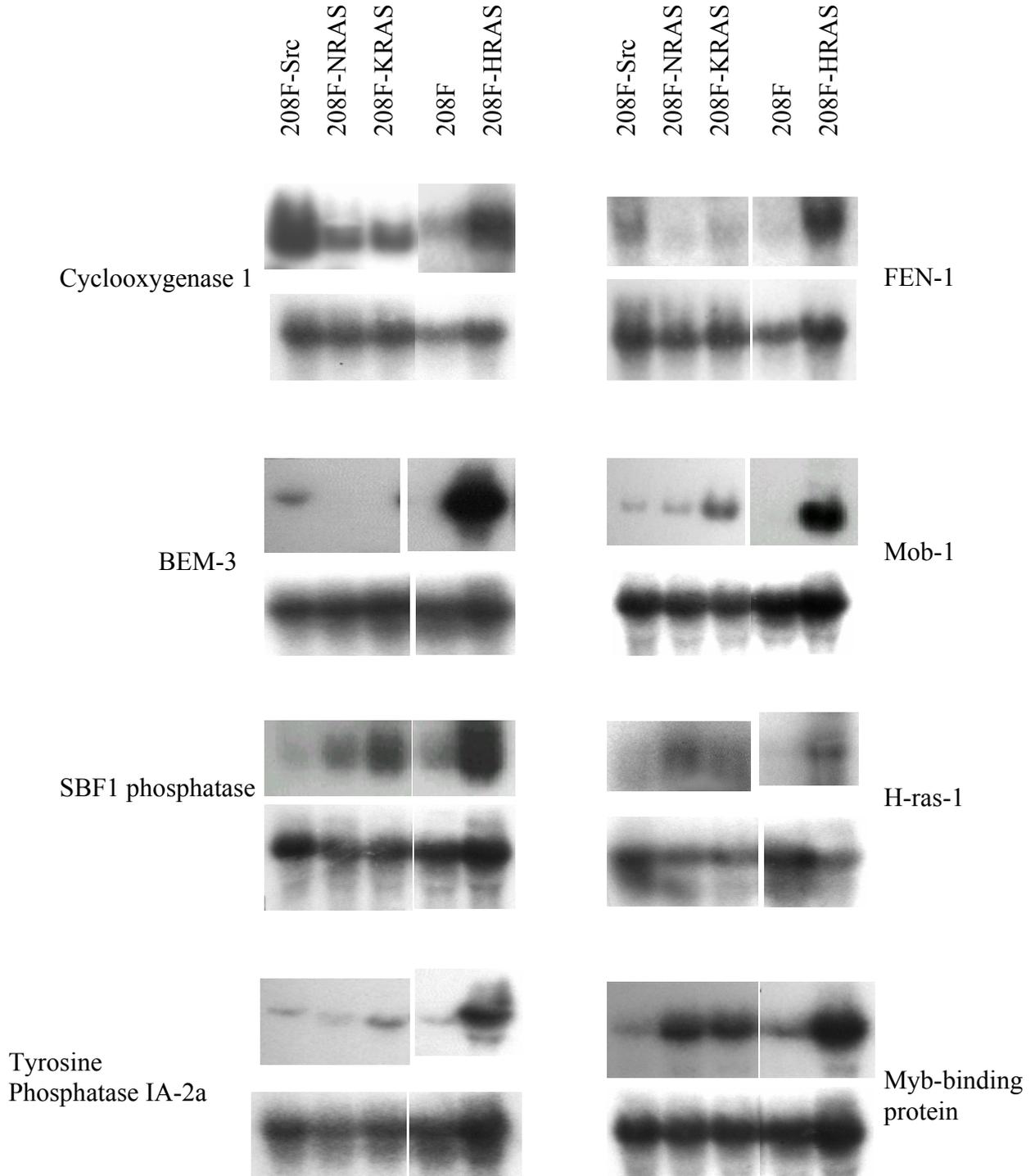
Die Herkunft der RNA aus verschiedenen Zelllinien (H-, K- und NRAS-transformierte Zellen, Src-transformierte Zellen und 208F-Zellen) ist direkt über jeder Spur angegeben.

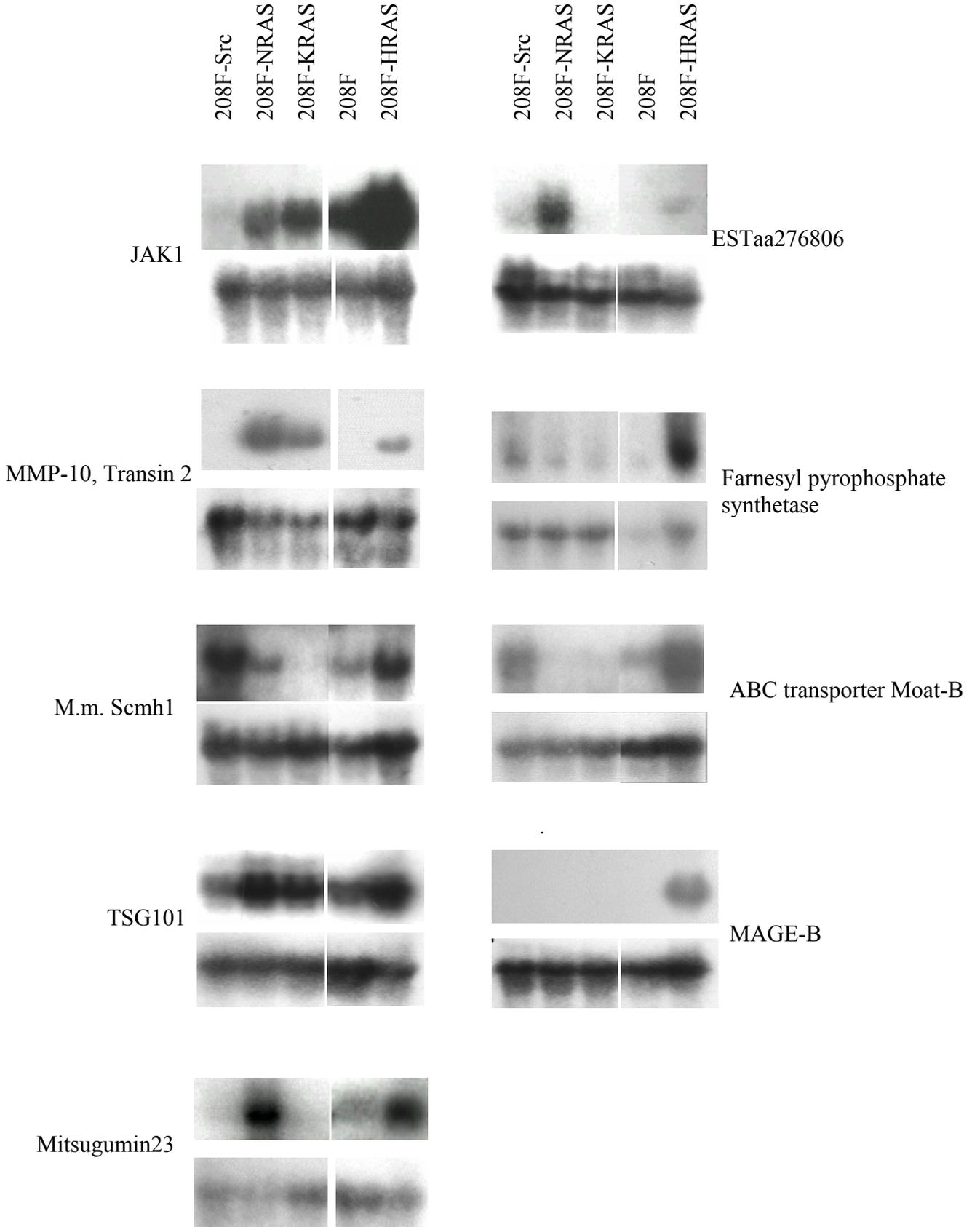
Blaue Pfeile bei einigen Membranen weisen auf das untersuchte Genfragment hin, welches mit Hilfe der jeweiligen Sequenz in den Gendatenbanken bestimmt werden konnte.

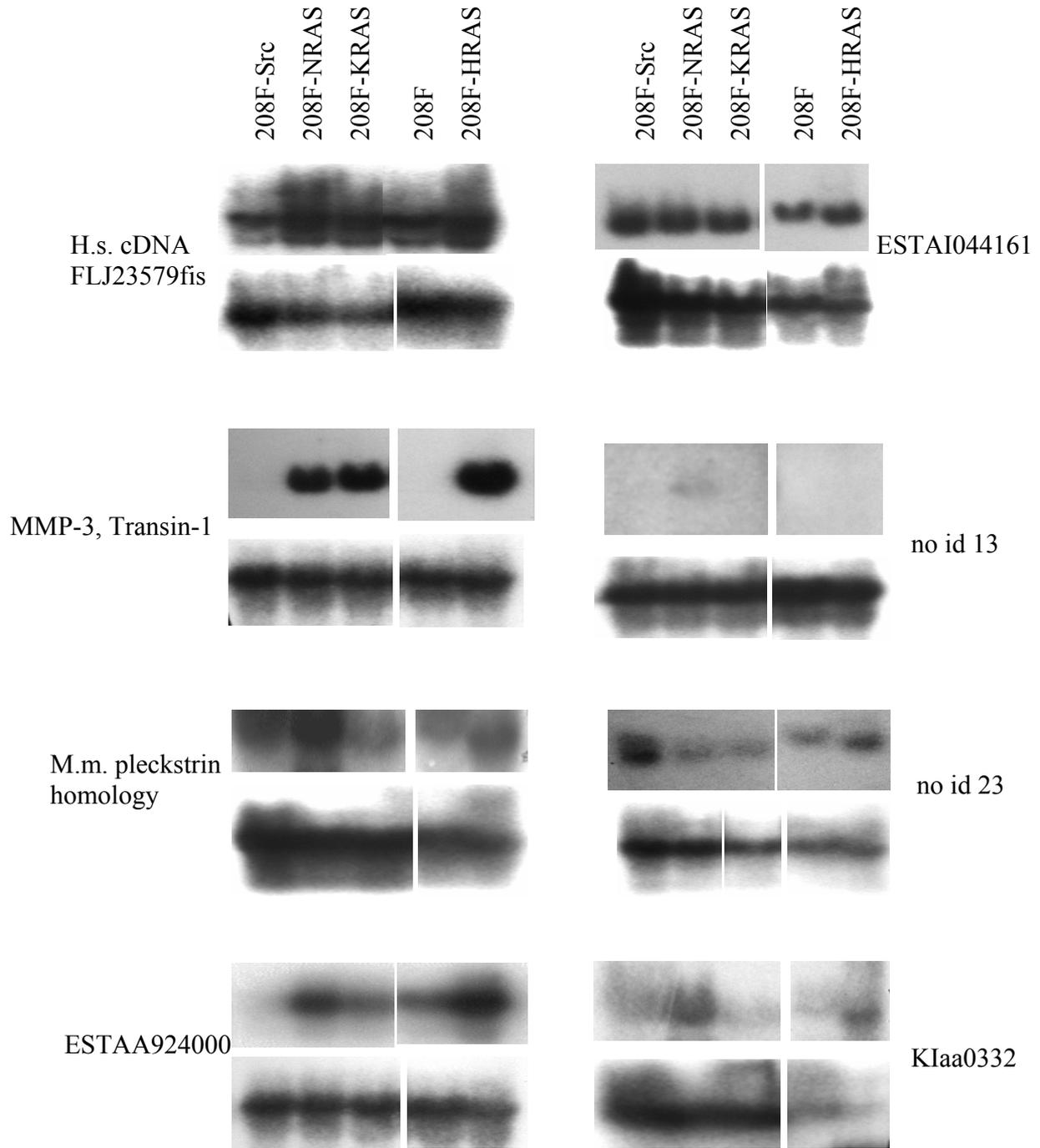
9.2.1. Hochregulierte Gene in H-/KRAS transformierten Zellen im Vergleich zu 208F-Zellen in Vorexperimenten



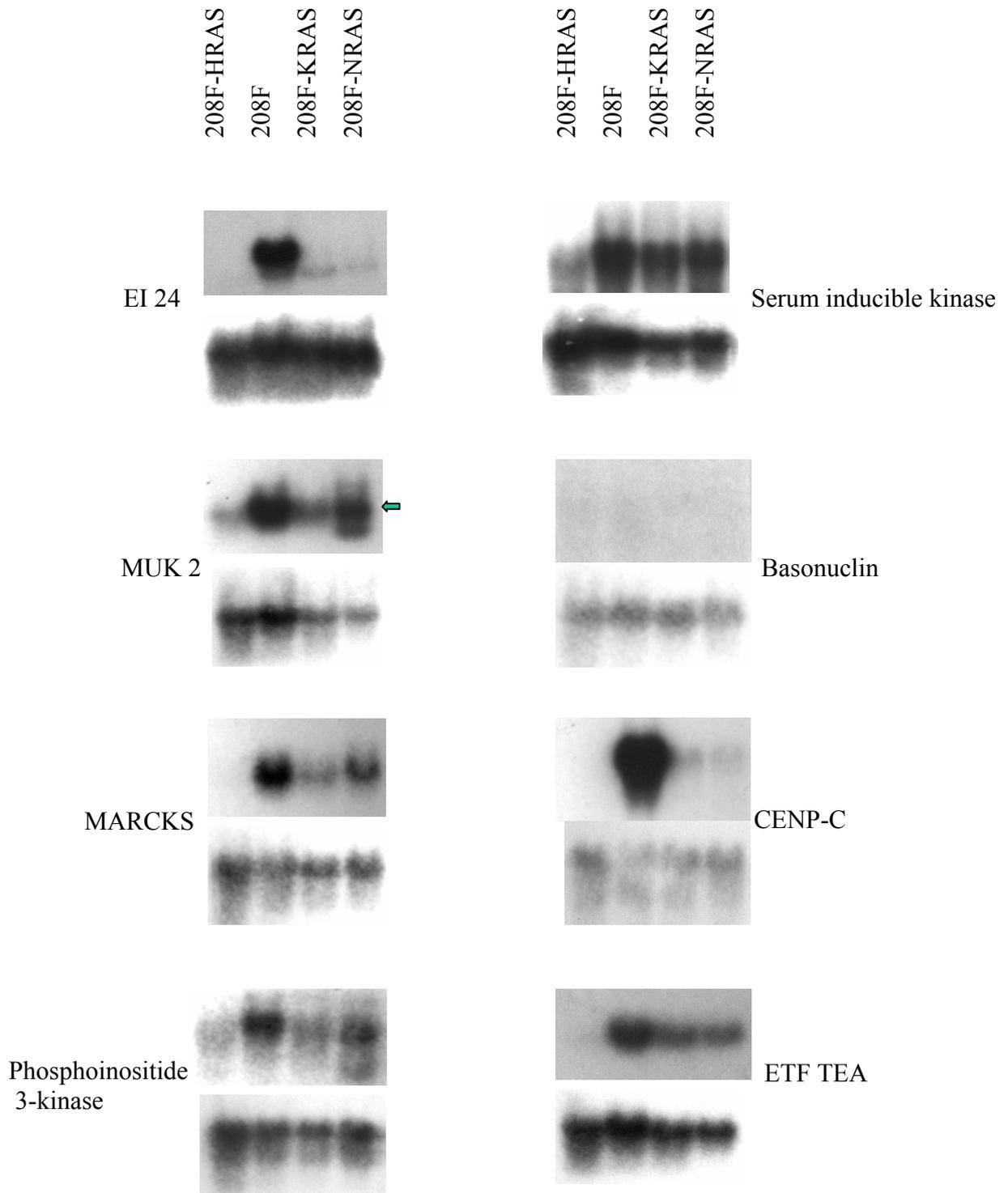


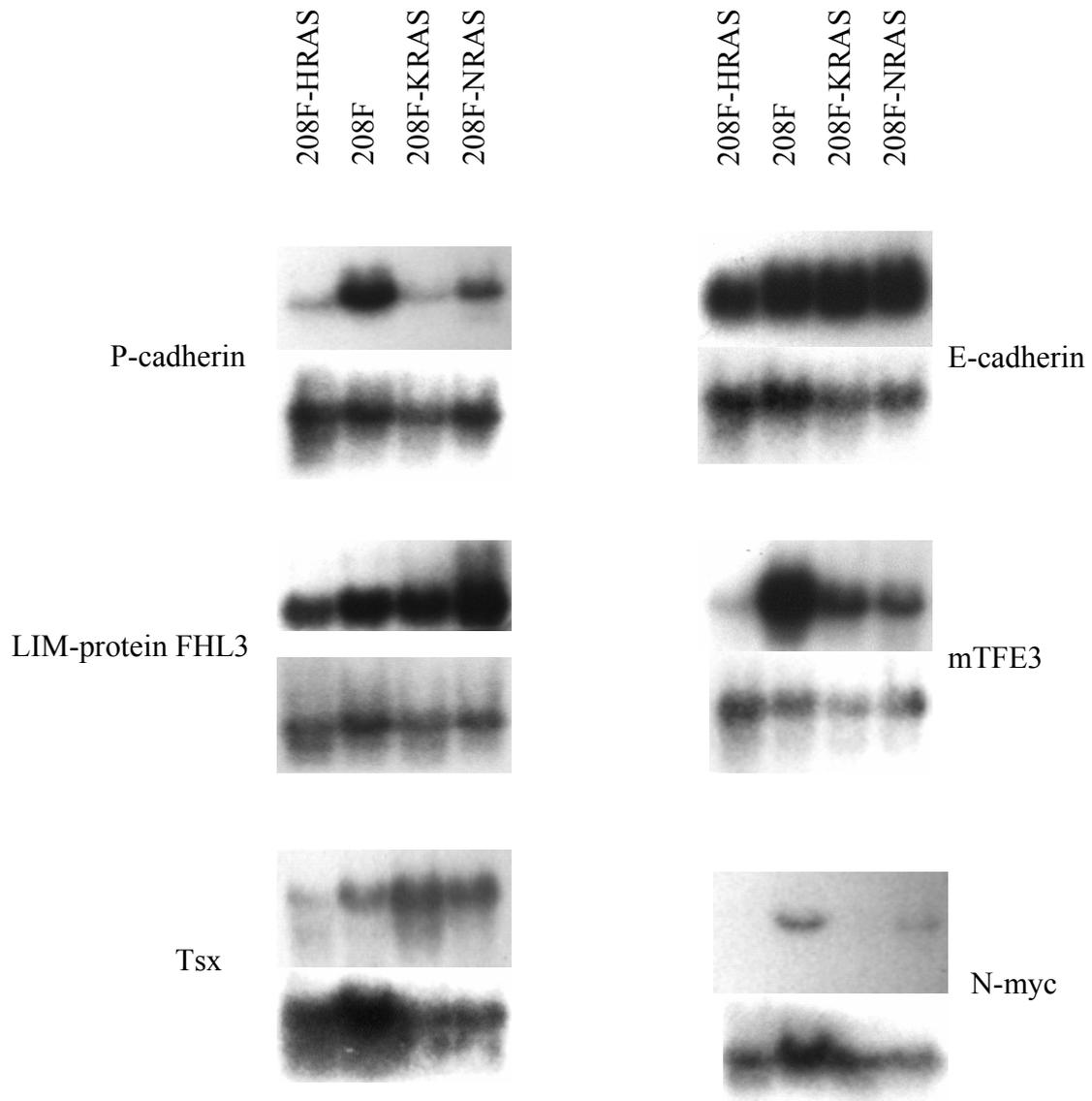


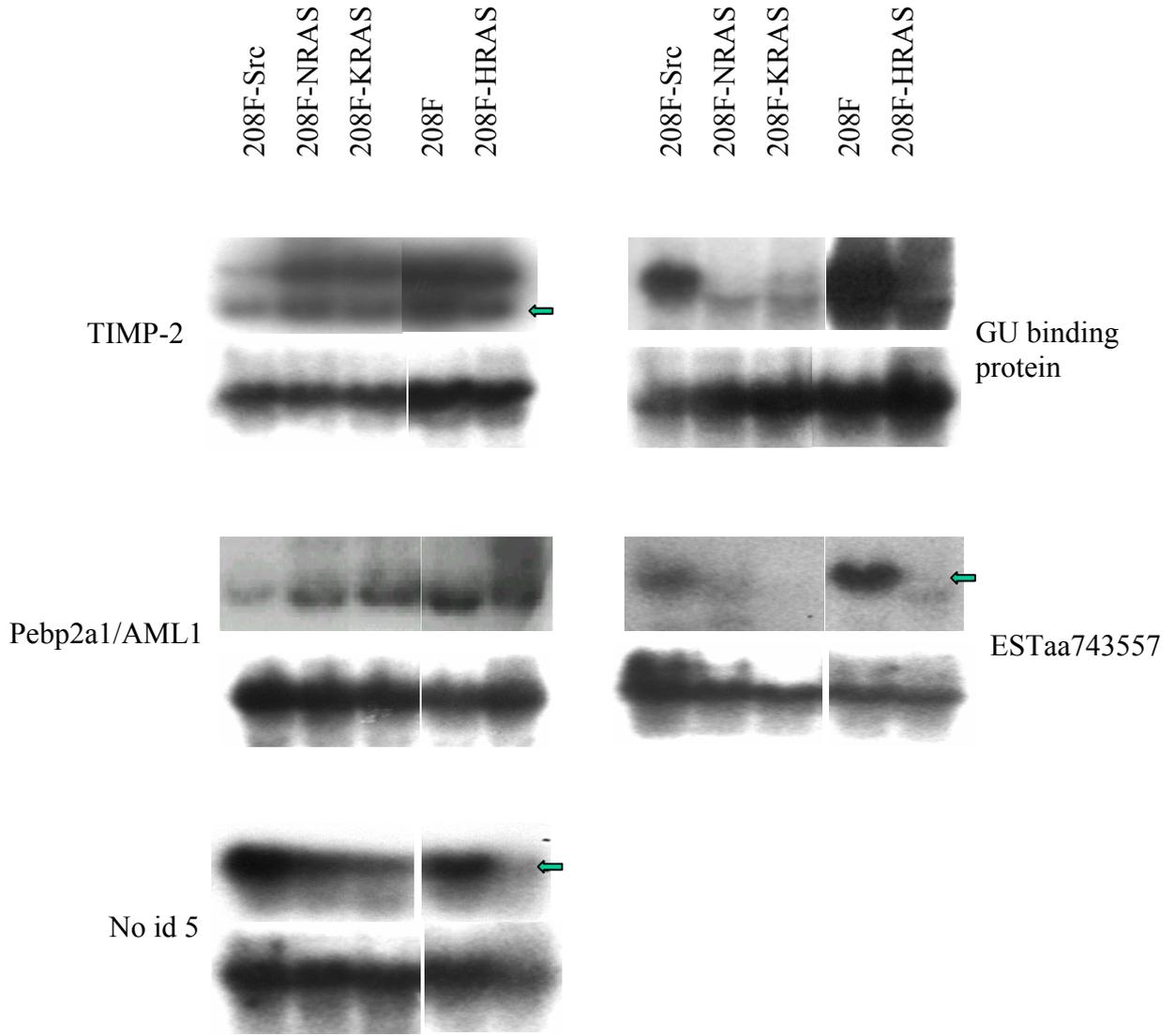




9.2.2. Supprimierte Gene in H-/KRAS transformierten Zellen im Vergleich zu 208F-Zellen in Vorexperimenten







Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mitveröffentlicht.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Anne Chantal Lieber, geb. Schmitz, geboren am 22.08.1974 in Euskirchen, dass die Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Die Dissertation stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Düsseldorf, den 15.05.2007

Anne Chantal Lieber