

Die Funktion des Tumorsuppressors RASSF1A mit besonderer Berücksichtigung der epigenetischen Inaktivierung in Weichteilsarkomen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen
Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biochemie der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von Frau Dipl. Biochem. Claudia Seidel
geboren am 23.11.1978 in Karl-Marx-Stadt

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Schulz
2. Gutachter: Prof. Dr. Karin Breunig

Verteidigung am 25.01.07

urn:nbn:de:gbv:3-000011320

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011320>]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis.....	iii
Tabellenverzeichnis	xi
Abkürzungsverzeichnis.....	xi
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Tumorsuppressor <i>RAS Association Domain Family 1</i> (RASSF1).....	1
1.1.1 Funktion von RASSF1	3
1.2 Weichteilsarkom	14
1.3 Bronchialkarzinom.....	14
1.4 Epigenetische Inaktivierung	15
1.4.1 Epigenetische Inaktivierung als Ursache der Krebsentstehung.....	15
1.4.2 Epigenetische Inaktivierung des Promoters von <i>RASSF1A</i>	17
1.5 Ziele der Arbeit	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Geräte.....	22
2.1.3 Gebrauchswaren.....	24
2.1.4 Gebrauchslösungen.....	24
2.1.5 Sterilisation/Autoklavieren von Lösungen und Geräten.....	31
2.1.6 Molekulargewichtsstandards	32
2.1.7 Enzyme	32
2.1.8 Antikörper	32
2.1.9 Vorgefertigte Systeme	33
2.1.10 Vektoren.....	33
2.1.11 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials.....	34
2.1.12 Firmen	35
2.2 Methoden	37

2.2.1	Untersuchung epigenetischer Inaktivierung.....	37
2.2.2	Mutationssanalyse mittels SSCP.....	41
2.2.3	Funktionelle Untersuchungen zur Funktion von RASSF1.....	42
3	Ergebnisse	52
3.1	Epigenetische Inaktivierung in Weichteilsarkomen.....	52
3.1.1	Epigenetische Inaktivierung krebsrelevanter Gene.....	52
3.1.2	Epigenetische Inaktivierung von <i>MST1</i> , <i>MST2</i> , <i>WW45</i> , <i>LATS1</i> und <i>LATS2</i>	56
3.2	Epigenetische Inaktivierung der Gene <i>MST</i> , <i>LATS</i> und <i>WW45</i> im Bronchialkarzinom.....	60
3.2.1	Epigenetische Inaktivierung im nicht kleinzelligen Lungenkarzinom....	60
3.2.2	Epigenetische Inaktivierung in kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien	62
3.3	Mutationsanalyse von <i>RASSF1A</i> , <i>B-RAF</i> und <i>K-RAS</i> in Weichteilsarkomen.	63
3.3.1	<i>RASSF1A</i>	63
3.3.2	<i>B-RAF</i>	63
3.3.3	<i>K-RAS</i>	64
3.4	Untersuchungen zur Funktion von RASSF1	65
3.4.1	Proliferationsverhalten stabil transfizierter Klone	66
3.4.2	Migrationsverhalten der stabilen Klone RASSF1A, RASSF1AMut203, RASSF1AMut133 und RASSF1ADelSARAH.....	74
3.4.3	Lokalisationsuntersuchungen	76
3.4.4	Apoptoserate.....	79
3.4.5	Interaktionsstudien	85
3.4.6	Untersuchung der Phosphorylierung von RASSF1A mittels phosphoserinspezifischer Antikörper	88
4	Diskussion	89
4.1	Epigenetische Inaktivierung	89
4.1.1	Epigenetische Inaktivierung tumorrelevanter Gene in Weichteilsarkomen	89
4.1.2	Epigenetische Inaktivierung der Gene <i>MST</i> , <i>WW45</i> und <i>LATS</i> in Weichteilsarkomen.....	91

4.1.3	Epigenetische Inaktivierung der Gene <i>MST</i> , <i>WW45</i> und <i>LATS</i> im Bronchialkarzinom.....	93
4.2	Mutationsanalyse	94
4.2.1	<i>RASSF1A</i> Polymorphismus Codon 133.....	94
4.2.2	Mutationsanalyse des Codons 600 von <i>B-RAF</i>	94
4.2.3	Mutationsanalyse des Codons 12 von <i>K-RAS</i>	95
4.3	Funktion von <i>RASSF1</i>	96
4.3.1	Funktionelle Unterschiede der Transkripte <i>RASSF1A</i> , <i>RASSF1C</i> und <i>RASSF1F</i>	97
4.3.2	Funktion der C1 Domäne von <i>RASSF1A</i>	100
4.3.3	Funktion der ATM Domäne von <i>RASSF1</i>	103
4.3.4	Funktion der RA Domäne von <i>RASSF1</i>	105
4.3.5	Funktion der SARAH Domäne von <i>RASSF1</i>	107
4.3.6	Einordnung der funktionellen Zusammenhänge.....	111
4.4	Einordnung der experimentellen Vorgehensweise	112
4.4.1	Methylierungsuntersuchungen.....	112
4.4.2	Funktionelle Untersuchungen.....	113
5	Zusammenfassung	114
5.1	Epigenetische Untersuchungen.....	114
5.2	Funktionelle Analysen	115
6	Ausblick.....	116
7	Literaturverzeichnis	a

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Aufbau des Gens *RASSF1* und der 3 Haupttranskripte *RASSF1A*, *RASSF1C* und *RASSF1F* im Überblick. Mit 1 α , 1 β , 2 $\alpha\beta$, 2 γ , 3, 4, 5, 6 wurden die 7 Exons des Gens bezeichnet, C1 stellt die diacylglycerolbindende Domäne, ATM die ATM-Phosphorylierungsstelle, RA die Ras Association Domain und SARAH die SARAH Domäne dar. 2

Abbildung 2. Schema der Wirkweise von *RASSF1A* in der Zellzyklusregulation durch Inhibierung des APC-CDC20 Komplexes. Neben Emi1 (early mitotic arrest1) und

- Mad2, die die Mitose in dem Übergang von der G2-zur Prophase bzw. in der Metaphase arretieren, ist auch RASSF1A als neuer Regulator der Mitose beschrieben, der durch die Bindung von CDC20 einen Arrest in der Prometaphase bewirkt.....7
- Abbildung 3. Schema des Signalweges, in den RASSF1A, MST, WW45 und LATS involviert sind. Die Interaktionen zwischen RASSF1A und RAS, RASSF1A und MST, MST und WW45 sowie die Phosphorylierung von LATS durch MST sind in der Literatur beschrieben (Siehe 1.1.1.2 und 1.1.1.5.1). Die Interaktion von RASSF1A mit LATS ist hypothetisch. Folgende Interaktionsdomänen sind gekennzeichnet: Die RAS-Assoziationsdomäne des Proteins RASSF1A, die SARAH-Domäne der Proteine RASSF1A, WW45 und MST, die C1 Domäne (LIM ähnlich) von RASSF1A und die LIM-bindende Domäne von LATS..... 10
- Abbildung 4. Schema des Wirkmechanismus von RASSF1A im Apo2L/TRAIL Signalweg und über die TNF-Rezeptoren (TNF-R). Die Aktivierung von RASSF1A und dessen Bindungspartner MAP1/MOAP1 kann durch die Rezeptoren DR4/5, aktiviert durch den APO2L/TRAIL und TNF-R, aktiviert durch TNF erfolgen. Daraus resultiert die Aktivierung von Bax, das im Mitochondrium die Ausschüttung von Cytochrom C vermittelt und damit die Apoptose induziert. Alternativ wird Bax durch die Aktivierung der Caspasen 8 und 10 aktiviert..... 12
- Abbildung 5. Überblick über die in der Literatur beschriebenen Interaktionspartner von RASSF1A und die Signalwege, in die RASSF1A involviert ist (Siehe Kapitel 1.1.1.7.)..... 13
- Abbildung 6. Methylation Specific PCR der Gene RASSF1A, p16 und ER α in primären Weichteilsarkomen. Es wurden Primer, die nach Bisulfit Behandlung der Tumor DNA, spezifisch ursprünglich methylierte (m) und unmethylierte (u) CpGs detektieren, im jeweiligen PCR Ansatz eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrolle wurden eine in vitro methylierte Kontroll-DNA (Meth.; Siehe 2.2.1.4) und eine unmethylierte Kontrolle (HeLa bzw. A549) mitgeführt. Die Produktlängen betragen bei der MSP von RASSF1A 93bp für das methylierte bzw. 105bp für das unmethylierte Produkt. Die Produktlängen der MSP von p16 betragen 150bp für das methylierte bzw. 151bp für das unmethylierte Produkt und die der MSP für ER α 159bp für das methylierte bzw. 161 für das unmethylierte PCR-Produkt. Mit M ist der 100 bp Marker gekennzeichnet.....52
- Abbildung 7. Combined Bisulfit Restriction Analysis der Gene MSH2 und MLH1 in Weichteilsarkomen. Die zu untersuchenden Abschnitte wurden durch PCR amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen TaqI (COBRA MLH1) und HpyCH4IV (COBRA MSH2) geschnitten. Die Restriktionen (+) und ungeschnittene PCR Produkte (-) wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrollen wurde eine in vitro methylierte Kontrolle (Meth.; Siehe 2.2.1.4) und

- eine unmethylierte Kontrolle (HeLa) mitgeführt. Mit M ist der 100 bp DNA Längenstandard gekennzeichnet. 53
- Abbildung 8. RASSF1A Expressionsanalysen in der Rhabdomyosarkomzelllinie RD und in Weichteilsarkomen. (A) Die Reexpression von RASSF1A nach Behandlung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD mit 0 μ M, 5 μ M und 10 μ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin wurde mittels real-time-RT-PCR (Produktgröße 239 bp) analysiert. Die Expression des Ansatzes nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin wurde in einer komparativen Auswertung als 100% angenommen. Zellen, die nicht mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelt wurden zeigen nur 2% der Expression. Als Kontrolle diente die Expression des Genes GAPDH (Größe des PCR Produktes 176 bp). (B) Real-time-RT-PCR Analyse der Expression von RASSF1A in Weichteilsarkomproben, die einen methylierten (m) bzw. unmethylierten (u) Promoter von RASSF1A aufwiesen. Mit M ist der 100 bp DNA Längenstandard gekennzeichnet..... 55
- Abbildung 9. Kaplan-Meier Überlebensanalyse für Weichteilsarkompatienten mit methyliertem bzw. unmethyliertem RASSF1A Promoter. Patienten, deren Tumor in die Stadien zwei und drei klassifiziert wurden, wurden in die Analyse einbezogen. Signifikant ($p=0,0284$; Log-Rank-Test) höher war die Überlebenszeit für Patienten, die keine RASSF1A Promoterhypermethylierung des Tumors aufwiesen. 56
- Abbildung 10. Methylation Specific PCR der Gene MST1, MST2, LATS1, LATS2 und WW45 in Weichteilsarkomen. Es wurden Primer, die nach Bisulfit Behandlung der Tumor DNA, spezifisch ursprünglich methylierte (m) und unmethylierte (u) CpGs detektieren, im jeweiligen PCR Ansatz eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrolle wurden eine in vitro methylierte Kontroll-DNA (Meth.; Siehe 2.2.1.4) und eine unmethylierte Kontrolle (HF53, HeLa bzw. 6/93) mitgeführt. Die Produktlängen betragen bei der MSP von MST1 120 bp für das methylierte bzw. 125 bp für das unmethylierte Produkt. Die Produktlängen der MSP von MST2 betragen 99 bp für das methylierte bzw. 108 bp für das unmethylierte Produkt und die der MSP für LATS1 125 bp für methyliertes und unmethyliertes PCR Produkt, für LATS2 150 bp für methyliertes und unmethyliertes Produkt und für WW45 116 bp für das methylierte bzw. 131 bp für das unmethylierte Produkt. Mit M ist der 100 bp DNA Längenstandard gekennzeichnet..... 57
- Abbildung 11. MST1 Expressionsanalyse in SKLMS. Die Expression von MST1 nach Behandlung der Leiomyosarkomzelllinie SKLMS mit 0 μ M und 10 μ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin wurde nach RNA Isolation mittels RT-PCR (200 bp) analysiert. Als Kontrolle dient die Expression des Genes GAPDH (Größe des PCR Produktes 176 bp). 59
- Abbildung 12. Analyse der Überlebenszeit mittels Cox`proportional hazard regression model für Weichteilsarkompatienten nach Methylierungsstatus des MST1

- Promoters. Patienten, deren Tumor in die Stadien zwei und drei klassifiziert wurden, wurden in die Analyse einbezogen. Signifikant (RR=8.2; p=0.036) höher war die Überlebenszeit für Patienten, die eine MST1 Promoterhypermethylierung des Tumors aufwiesen.60
- Abbildung 13. Methylation Specific PCR der Gene MST1, MST2, LATS1, LATS2 und WW45 in Lungenkarzinomen (T) und Normalgewebekontrollen (N). Es wurden Primer, die nach Bisulfit Behandlung der Tumor DNA, spezifisch ursprünglich methylierte (m) und unmethylierte (u) CpGs detektieren, im jeweiligen PCR Ansatz eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrolle wurden eine in vitro methylierte Kontroll-DNA (Meth.; Siehe 2.2.1.4) und eine unmethylierte Kontrolle (HF53) mitgeführt. Die Produktlängen betragen bei der MSP von MST1 120 bp für das methylierte bzw. 125 bp für das unmethylierte Produkt. Die Produktlängen der MSP von MST2 betragen 99 bp für das methylierte bzw. 108 bp für das unmethylierte Produkt und die der MSP für LATS1 125 bp für methyliertes und unmethyliertes PCR Produkt, für LATS2 150 bp für methyliertes und unmethyliertes Produkt und für WW45 116 bp für das methylierte bzw. 131 bp für das unmethylierte Produkt. Mit M ist der 100 bp DNA Längenstandard gekennzeichnet.61
- Abbildung 14. SSCP Analyse des Codons 133 des Gens RASSF1A in Weichteilsarkomtumoren. Die Analyse der PCR Produkte auf Polymorphismen erfolgte im 16%igen Acrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Als Kontrolle (K1) diente DNA aus Blut eines heterozygoten Trägers des Polymorphismus G/TCT. Mit wt sind die Proben gekennzeichnet, die keinen Polymorphismus tragen. Als DNA Längenstandard wurde der 100 bp DNA Marker (M) mitgeführt.63
- Abbildung 15. Sequenzanalyse des Codons 600 des Gens B-RAF. Die Kontrollen der SSCP SKMEL (heterozygot GAG/GTG) und Blut-DNA (wt GTG) sowie die Kontrollsequenzierung der Weichteilsarkomprobe STS 20 (heterozygot GAG/GTG) wurden dargestellt.64
- Abbildung 16. SSCP Analyse des Codons 600 des Gens B-RAF in Weichteilsarkomtumoren. Die Analyse der PCR Produkte auf Polymorphismen erfolgte im 17%igen Acrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Als Kontrolle (SKMEL) diente DNA der Melanomzelllinie SKMEL, die heterozygot die Mutation GAG (GAG/GTG) trägt. Mit wt sind die Proben gekennzeichnet, die homozygot das Codon 600 GTG aufwiesen.64
- Abbildung 17. SSCP Analyse des Gens K-RAS in Weichteilsarkomtumoren. Die Analyse der PCR Produkte auf Polymorphismen erfolgte im 15%igen Acrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Als Wildtyp-Kontrolle (K, GGT/GGT) diente DNA aus Blut. Die Pankreaskarzinomzelllinien CAPAN1 (GTT/GTT), HUP-T3 (CGT/GGT) und PaCa-2 (TGT/TGT) wurden als Kontrollen

- für die Mutationsereignisse GTT, CGT und TGT eingesetzt. Als DNA Längenstandard wurde der 100 bp DNA Marker (M) mitgeführt. 65
- Abbildung 18. Nachweis der stabilen Expression von RASSF1A, RASSF1C, RASSF1F, der mutagenisierten Formen von RASSF1A (Siehe Tabelle 13) sowie der deletierten Formen RASSF1ADelC1, RASSF1ADelC1ATM und RASSF1ADelSARAH mittels RT-PCR. Eingesetzt wurden die Primer FlagF (Flag-Tag) und L27111, die PCR Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel analysiert. Als DNA Längenstandard dient ein 100 bp Marker. 67
- Abbildung 19. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1F exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. 68
- Abbildung 20. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C, die Formen RASSF1AMut52 und RASSF1AMut53 (Klone 1 und 3) exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. (A) zeigt Wachstumskurven, die in zinkfreiem Optimem (1% FCS) aufgenommen wurden, während im Ansatz (B) dem Optimem (1% FCS) 10 μ M Zinkionen zugegeben wurden. 69
- Abbildung 21. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C, RASSF1AMut131 und RASSF1AMut132 exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. 70
- Abbildung 22. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1AMut133 (3 Klone) exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. 70
- Abbildung 23. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C RASSF1AMut246 und RASSF1AMut257 exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. 71
- Abbildung 24. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1AMut203 (drei Klone) exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). In drei unabhängigen Experimenten wurden 150000 Zellen in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl ermittelt. 71
- Abbildung 25. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C RASSF1ADelC1 und RASSF1ADelC1ATM exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. 72

- Abbildung 26. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1ADelSARAH (zwei Klone) exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). In drei unabhängigen Experimenten wurden 150000 Zellen in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl ermittelt.72
- Abbildung 27. Mittlere Koloniegrößen der im weichen Agar gebildeten Kolonien nach 4 Wochen Wachstum. Es wurden die Größen von mindestens 20 Kolonien je Klon vermessen und der Mittelwert bestimmt.73
- Abbildung 28. Koloniebildung in weichem Agar verschiedener stabil transfizierter A549 Zellen, die RASSF1A, RASSF1C, RASSF1AMut257, RASSF1ADelC1, RASSF1ADelC1ATM, RASSF1AMut53, RASSF1ADelSARAH, RASSF1F und RASSF1AMut133 exprimierten im Vergleich zur Vektorkontrolle. Die Zellen wurden in weichem Agar gegossen und wuchsen über vier Wochen zu Kolonien aus, die nach der Färbung mit Iodonitrotetrazoliumchlorid am Mikroskop Leica DMIRB mit dem Programm MetaVue vermessen wurden. Die Abbildung zeigt Beispielkolonien, zur Auswertung wurden mindestens 20 Kolonien pro Ansatz herangezogen.....74
- Abbildung 29. Migrationsgeschwindigkeiten in μ /min von stabil transfizierten Zellen, die RASSF1A, RASSF1ADelSARAH (A), RASSF1AMut203 (B) und RASSF1AMut133 (C) exprimierten sowie der Vektorkontrolle. Die Zellen wurden in eine künstliche Kollagenmatrix gegossen und bis zu zwei Tagen unter dem Mikroskop beobachtet, alle 10 min wurde ein Bild aufgenommen.75
- Abbildung 30. Lokalisation von RASSF1C, RASSF1CDeSARAH, RASSF1A, RASSF1ADelSARAH, und RASSF1AMut203 in HEK293 nach transienter Transfektion in HEK293 Zellen. Die Ansätze wurden mit Anti- α -Tubulin-Antikörpern und DAPI (Kernfärbung) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen.77
- Abbildung 31. Abnorme Spindeln, Spindelpolanordnungen und Chromosomenungleichverteilungen in HEK293 nach transienter Expression von RASSF1ADelSARAH. Es wurde mit Anti- α -Tubulin- Antikörper und DAPI (Kernfärbung) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen. Trotz der Kolo-kalisation zu Tubulin, zeigten sich starke Veränderungen beim Verlauf der Mitose.78
- Abbildung 32. Anteil Mitosen bzw. abnormer Mitosen nach Expression von YFP-RASSF1A bzw. YFP-RASSF1ADelSARAH in HEK293. Ca. 1000 Transfizierte Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten ausgezählt und der Anteil mitotischer Zellen, sowie abnormer mitotischer Zellen wurde bestimmt.78
- Abbildung 33. Apoptoserate nach transienter Transfektion von Flag-RASSF1A, Flag-RASSF1C, Flag-RASSF1F und der mutagenisierten RASSF1A-Konstrukte sowie der Vektor-Kontrolle (pCMV-Tag1) in A549 Zellen. Apoptotische Zellkerne

- wurden mit Hilfe der TUNEL Färbung fluoreszenzmarkiert und im Verhältnis zu DAPI gefärbten Zellkernen ausgezählt. 79
- Abbildung 34. Apoptoserate nach transienter Expression von Flag-RASSF1A, Flag-RASSF1AMut53, Flag-RASSF1AMut131 und Flag-RASSF1AMut246 sowie der Vektor-Kontrolle (pCMV-Tag1) in A549 Zellen in Vierfachbestimmung. Apoptotische Zellkerne wurden mit Hilfe der TUNEL Färbung fluoreszenzmarkiert und im Verhältnis zu DAPI gefärbten Zellkernen ausgezählt. 80
- Abbildung 35. TUNEL Experiment in A549 Zellen. Transient YFP-RASSF1ADelSARAH exprimierende A549 Zellen wurden mit TUNEL und DAPI gefärbt. A stellt eine transfizierte (grüne Fluoreszenz), apoptotische (rote TUNEL Fluoreszenz) Zelle dar, während B eine transfizierte, nicht apoptotische Zelle und C eine nicht transfizierte, nicht apoptotische Zelle zeigt. 81
- Abbildung 36. Apoptoserate nach transienter Expression der Proteine YFP-RASSF1C, YFP-RASSF1A, YFP-RASSF1ADelSARAH und YFP-RASSF1AMut203 in A549. Mit TUNEL markierte Zellen wurden im Verhältnis zu transfizierten Zellen ausgezählt. Das Experiment erfolgte in einer Dreifachbestimmung. 81
- Abbildung 37. Stabilisierung der Tubulinstrukturen durch YFP-RASSF1A, YFP-RASSF1C und YFP-RASSF1ADelSARAH in HEK293 während der Mitose und nach Behandlung mit Nocodazol, verglichen mit YFP exprimierenden Zellen. HEK293 Zellen wurden transient transfiziert und nach 24 h für 1h mit 20 μ M Nocodazol behandelt. Die Ansätze wurden mit Anti- α -Tubulin-Antikörpern und DAPI (Kernfärbung) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen. 83
- Abbildung 38. Stabilisierung der Tubulinstrukturen durch YFP-RASSF1A und YFP-RASSF1C in A549 nach Behandlung mit Nocodazol, verglichen mit YFP exprimierenden Zellen. A549 Zellen wurden transient transfiziert und nach 24 h für 1h mit 20 μ M Nocodazol behandelt. Die Ansätze wurden mit Anti- α -Tubulin-Antikörpern und DAPI (Kernfärbung) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen. 84
- Abbildung 39. Paclitaxel-induzierte Apoptose in stabil transfizierten A549 Zellen, die RASSF1A, RASSF1C, RASSF1F, RASSF1AMut133, RASSF1AMut203 bzw. RASSF1ADelSARAH exprimieren, sowie der Vektorkontrolle (Flag-Vektor) und A549. Die Rate apoptotischer Zellkerne wurde nach 18 h Behandlung mit 0,1 μ M Paclitaxel der stabil transfizierten A549 Zellen durch Auszählung der mit Hoechst33342 gefärbten Zellkerne am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Die Ansätze wurden in Vierfach- bzw. Doppelbestimmung durchgeführt. 85
- Abbildung 40. In vitro Interaktion der Proteine K-RAS und RASSF1A. Die Proteine MPB-K-RAS (71 kDa) und MPB (45 kDa, Kontrolle) wurden 4 h in E.Coli überexprimiert, das Gesamtprotein (A) wurde isoliert, der Proteingehalt bestimmt

- und grosenanteilig die gleiche Proteinmenge MPB-K-RAS und MPB an Amylose Resin gebunden für die Präzipitation des radioaktiv markierten RASSF1A (B und C) eingesetzt. Mit M wurde der Proteinmarker bezeichnet, Banden der molekularen Masse von 50 und 75 kDa wurden gekennzeichnet. Die Detektion des radioaktiv markierten RASSF1A erfolgte am Phosphoimager. Eine Bindung von RASSF1A erfolgte an MPB-K-RAS jedoch nicht bzw. schwächer an MPB. Es wurde eine Doppelbestimmung (B und C) durchgeführt.86
- Abbildung 41. Interaktion der Proteine RASSF1A und RASSF1C mit MST1 und MST2 über die SARAH Domäne und Interaktion zwischen MST1 und WW45. Die zu untersuchenden Interaktionspartner wurden in HEK293 als Fusionsproteine koexprimiert, das Gesamtprotein wurde 48 h nach Transfektion isoliert und die GST-Fusionsproteine wurden mittels GSH-Sepharose präzipitiert. Koprazipitiert wurden Flag-markierte Interaktionspartner. Die Detektion erfolgte im Westen Blot sowohl mit Anti-Flag-Antikorpfern (Flag-Blot) als auch mit Anti-GST-Antikorpfern (GST-Blot). Mitgeführt wurde ein Protein-Molekulargewichtsstandard (M).....87
- Abbildung 42. Untersuchung der putativen Phosphorylierungsstelle Serin 203 des Proteins mit phospho-spezifischen Antikorpfern. GST-RASSF1A und GST-RASSF1AMut203 wurden in HEK293 überexprimiert, das Gesamtprotein wurde nach 48 h isoliert und die GST-Fusionsproteine wurden mit GSH-Sepharose aufgereinigt. Im Western Blot wurde mit phospho-serinspezifischen Antikorpfern und zur Kontrolle mit Anti-GST-Antikorpfern (GST-Blot) detektiert. Mit Pfeilen sind die Proteine GST-RASSF1A, GST-RASSF1AMut203 und GST im Western Blot markiert, bei dem mit phospho-serinspezifischen Antikorpfern detektiert wurde. GST-RASSF1A und GST-RASSF1AMut203 hatten eine molekulare Masse von 69 kDa. GST wurde als Kontrolle mitgeführt und migrierte bei 30 kDa. Mitgeführt wurde ebenfalls ein Protein-Molekulargewichtsstandard (Marker). ...88
- Abbildung 43. Vergleich der LIM Domänen der LATS bindenden Proteine Zyxin (LIM I und LIM II, die beide essentiell für die LATS Bindung sind und Ajuba (LIM) mit der C1 Domäne von RASSF1A. Die Zinkfinger motive der LIM Domänen und der C1 Domäne bestehen aus Cysteinen und Histidinen (blaue Balken) in bestimmten AS Abständen. Mit rotem Balken wurden die Cysteine der LIM Domänen markiert, die in der C1 Domäne durch ein Aspartat (brauner Balken) ersetzt werden könnte.101
- Abbildung 44. Mögliche regulatorische Funktion von RASSF1A durch Bindung von MST und LATS. RASSF1A könnte über die Interaktion mit MST und LATS an der Entscheidung, ob die Zelle proliferiert, arretiert bzw. in die Apoptose geht, beteiligt sein.110

Apo2L/TRAIL	<i>Apo2 ligand or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
C1	<i>protein kinase C conserved region 1</i>
CDC20	<i>cell division cycle 20 homolog</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CNK1	<i>connector enhancer of KSR</i>
COBRA	<i>Combined Bisulfite Restriction Analysis</i>
DAG	Diacylglycerol/Phorbolster Bindedomäne
DAP4	<i>death associated protein 4</i>
Diap1	<i>Drosophila inhibitor of apoptosis</i>
DISC	<i>Death Inducing Signalling Complex</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Emi1	<i>early mitotic arrest 1</i>
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
ER α	<i>estrogen receptor α</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- dehydrogenase
GCK	<i>germinal center kinases</i>
GFP	<i>Green fluoreszent protein</i>
GSH	<i>glutathione</i>
GST	<i>glutathione S-transferase</i>
Hpo	Hippo
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LATS	<i>large tumor suppressor</i>
LIM	<i>Zinc-binding domain present in LIN-11, Isl1, MEC-3</i>

MAGD	<i>mitochondrial aggregation and genome destruction</i>
MAP1/ MOAP1	<i>modulator of apoptosis 1, entspricht MOAP1</i>
MAP1B	<i>microtubule-associated protein 1B</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinases</i>
MFH	Malignes fibröses Histiozytome
MLH1	<i>mutL homologue 1</i>
MPB	maltose binding protein
MSH2	<i>mutS homologue 2</i>
MSH3	<i>mutS homologue 3</i>
MSP	<i>Methylation Specific PCR</i>
MST1	<i>Mammalian STE20 like Kinase</i>
NORE1	<i>novel Ras effector 1</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKC	Protein Kinase C
PMCA4b	<i>plasma membrane calmodulin-dependent calcium ATPase 4b</i>
PMS2	<i>postmeiotic segregation increased 2</i>
RA	<i>RAS association (RalGDS/AF-6) domain</i>
<i>RASSF1</i>	<i>RAS Association domain family 1</i>
Rb1	Retinoblastoma
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>
SARAH	Sav/RASSF1/Hippo
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
STS	<i>soft tissue sarcomas</i>
TUNEL	<i>Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling</i>
Wts	Warts
WW45	<i>45 kDa WW domain protein</i>
XPA	Xeroderma Pigmentosum, <i>complementation group A</i>
YFP	yellow fluoreszent protein