

R-RAS IHON KARSINOGENEESISSÄ

LK Katriina Nieminen

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Tampereen yliopisto

Lääketieteen ja biotieteiden yksikkö

Kesäkuu 2017

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö

NIEMINEN KATRIINA: R-RAS IHON KARSINOGENEESISSÄ

Kirjallinen työ, 30 s.
Ohjaaja: professori Tero Järvinen

Kesäkuu 2017

Asiasanat: R-Ras, onkogeneeni, karsinogeneesi, kasvain, iho, papillooma

R-Ras on Ras-perheeseen kuuluva pieni GTPaasi, joka muistuttaa rakenteellisesti muita Ras-perheen genejä. Useat näistä muista Ras-perheen geneistä ovat tunnettuja proto-onkogenejä, joiden aktivoivat mutaatiot kykenevät aiheuttamaan normaalin solun transformaation syöpäsoluksi. Näiden Ras-geenien mutaatioiden on arvioitu olevan keskeisessä osassa useissa eri syövässä, n. 50 % kaikista syöpätapauksista.

Huolimatta rakenteellisista yhtäläisyyksistä ko. tunnettuihin Ras onkogeneihin, R-Ras geeniä aktivoivien mutaatioiden ei ole kuitenkaan osoitettu aiheuttavan syöpää. Sen sijaan proteiinin aktivaation on esitetty hillitsevän syöpäsoluille tyypillistä proliferatiota ja invasiivista kasvua. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää R-Ras:n roolia kemiallisesti indusoidussa ihon kasvainmallissa. Käyttämällä poistogeenistä hiirikantaa (R-Ras KO) ja vertailemalla sitä normaaliin hiirikantaan havaitsimme, että R-Ras on merkittävä tekijä epidermaalisten kasvainten kehittämisessä.

19 viikkoa kestäneessä kokeessa perimältään normaaleilla (villi-tyyppi, WT) eläimillä kehittyi lähes kuusinkertainen määrä kasvaimia verrattuna poistogeenisiin eläimiin. Kasvaimet myös ilmaantuivat aiemmin ja kasvoivat suuremmiksi villi-tyypin eläimillä. Vaikka R-Ras ilmentyi voimakkaasti ihon dermaalisisissa verisuonissa, sitä ei havaittu sekä normaalissa että karsinogeneilla käsitellyssä epidermiksessä, jossa kasvaimet manifestoituivat. Nämä seikat antavat ymmärtää, että huolimatta aiemmin kuvatuista anti-onkogeenisistä ominaisuuksistaan, R-Ras vaikuttaisi olevan merkittävässä roolissa kasvaimen kehittämisessä (ihon kokeellisessa, kemiallisessa karsinogeneesi-mallissa) mekanismeilla, jotka mahdollisesti liittyvät kasvainkudoksen immunologiseen säätelyyn.

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	7
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	11
2.1 Hiiret	11
2.2 Kasvaininduktio	11
2.3 Immunohistokemia ja TUNEL-värjäys	12
2.3.1 Kvantitatiivinen analyysi	13
2.4 Ihonäytteiden preparointi ja analysointi	13
3.5 Statistiikka	14
3 TULOKSET	15
3.1 Dermaalinen R-Ras on merkittävässä roolissa ihokasvainten kehittymisessä ...	15
3.2 R-Ras tuotanto on rajoittunut verisuoniin ja ihon dermaaliseen osaan	17
3.3 R-Ras KO eläinten resistenssi ihokasvainten kehittymiselle ei selity vähentyneellä vaskularisaatiolla	19
3.4 R-Ras KO eläimillä dermaalisten solujen proliferaatio on rajoittunutta ja apoptoosi kiihtynyttä	21
4 POHDINTA	24
LÄHTEET	27
LIITTEET	30

1 JOHDANTO

Ras-proteiinit ovat pieniä guanosiinitrifosfaattia sitovia ja hydroksyloivia G-proteiineja, guanosiinitrifosfataaseja, jotka toimivat solunsisäisinä signaalinvälittäjinä useissa keskeisissä signaalinvälitysteissä. Nämä pienet GTPaasit ovat ryhmätoiminnallisesti solun sisässä, sytosolissa, esiintyviä entsyymejä, joiden taipumus sitoa ja hydrolysoida GTP:tä tekee niistä oleellisen osan solujen biokemialliseen säätelyyn osallistuvaa viestijärjestelmää. Ras-geeniperheen koodaamien GTPaasien toiminnalliset erityispiirteet tekevät niistä ennen kaikkea solun proliferaation, mutta myös erilaistumisen, migraation ja selviytymisen (elon jäämisen) keskeisiä säätelijöitä. Ne ilmentyvät pääasiassa voimakkaasti jakautuvissa soluissa, joissa ne välittävät solun kasvuun ja jakautumiseen vaikuttavia signaaleja. (1)

GTPaasit toimivat osana solunsisäistä viestijärjestelmää ottaen vastaan signaaleja ja välittäen niitä eteenpäin aktivoimalla eri toisiolähetinjärjestelmiä ja ionikanavia. Ne toimivat eräänlaisina molekulaarisina on/off-kytkiminä solun sisäisen signaalinvälitysverkoston kriittisissä kohdissa ja kontrolloivat solunsisäisiä prosesseja vuorottelemalla aktiivisen ja inaktiivisen muodon välillä riippuen niihin sitoutuneen GTP:n hydrolysaatiosta. GTPaasit ovat aktiivisia GTP:n ollessa niihin sitoutuneena ja inaktivoituvat GTP:n hydrolysoituessa guanosiinidifosfaatiksi, GDP:ksi.

Koska Ras-perheen GTPaasit osallistuvat keskeisesti moniin solun jakautumista, erilaistumista ja selviytymistä sääteleviin signaalintireitteihin, niiden aktiivisuus solussa on tarkasti säädeltyä. GTPaasien toiminnan merkittävin säätely tapahtuu erilaisten ulkoisten säätelyproteiinien kautta, joista tärkeimpiä ovat GTPaasia aktivoivat proteiinit (GTPase activating proteins, GAP) ja guanosiini-nukleotidi-vaihtajat (Guanine

Nucleotide Exchange Factors, GEF). GEF:t katalysoivat GDP:n vaihtamista GTP:ksi ja siten suosivat GTPaasin aktiivista muotoa, kun taas GAP:t inaktivoivat kompleksia voimistamalla GTPaasin hydrolysoivaa vaikutusta.

Ras-geeniperhe on yksi Ras-superperheen kuudesta (Ras, Rho, Ran, Rab, Arf ja Rad) alayksiköstä. Ras-alaperheen viiteen eri alaryhmään kuuluvista jäsenistä kliinisesti merkittävimpiä ja parhaiten tunnettuja ovat K-Ras, H-Ras, N-Ras, M-Ras ja R-Ras. Ras-superperheen Pienet GTPaasit ovat rakenteeltaan monomeerisiä ja homologisia heterotrimeeristen G-proteiinien alfa-alayksikön kanssa. Toisin kuin heterotrimeeriset G-proteiinit, joiden aktiivisuus on riippuvainen kompleksiin liittyneen reseptorin aktiivisuudesta, Ras-perheen GTPaasit kykenevät toimimaan itsenäisesti ilman erillisen reseptorin vaikutusta: Ras-proteiini pystyy ilman ulkoista aktivaatiota irrottamaan GDP:n ja sitomaan tilalle GTP:n. Tämä itsenäinen toiminta on normaaliolosuhteissa hidasta ja solun toiminnan kannalta merkityksetöntä.

Aktivoiva mutaatio Ras-proteiinia koodaavassa geenissä voi johtaa siihen, ettei GTPaasi enää ole sitä inhiboivat GAP-proteiinin vaikutuksen alaisena, vaan pysyy jatkuvasti aktiivisena. Ilman vastetta negatiiviseen säätelyyn Ras-proteiini lähettää jatkuvasti kasvustimulaatiota solulle ilman normaalitilanteessa vaadittavaa kasvutekijästimulaatiota (5). Kun kriittisessä kohdassa vaste kasvustimulaation negatiiviseen säätelyyn menetetään, liiallinen GTPaasi-aktiivisuus johtaa epätarkoituksenmukaiseen muutokseen solun käyttäytymisessä ja mahdollisesti jopa solun syöpäsoluksi muuttumiseksi.

Koska Ras-perheen proteiinit säätelevät pääasiassa solun kasvuun ja jakautumiseen liittyviä toimintoja, näiden proteiinien epätarkoituksenmukainen toiminta johtaa solun kasvun, erilaistumisen ja jakautumisaktiivisuuden säätelyn epäonnistumiseen, mikä toimii lähtökohtana syövän kehittymiselle (2). Edellä kuvatulla tavalla mutaatio Ras-geenissä voi johtaa merkittävään muutokseen solun toiminnassa muuttuneen GTPaasi-aktiivisuuden kautta, kun vaste negatiiviseen säätelyyn menetetään. Liiallinen GTPaasi-aktiivisuus antaa solulle voimakkaan kasvustimulaation (5), mikä johtaa kiihtyneeseen proliferaatioon, invaasioon ja metastasointiin sekä apoptoosin eli solujen ohjelmoidun solukuoleman välttämiseen (6). Seurauksena on normaalin solun muuntuminen geneettisesti epävakaaaksi syöpäsoluksi. Kolmen parhaiten tunnetun Ras-geenin (H-Ras, K-Ras ja N-Ras) tiedetään olevan yleisimpiä ihmisen onkogeenejä; näiden proteiinien pysyvästi aktivoituneisiin muotoihin johtavia mutaatioita on löydetty 25-35%:ssa kaikista syöpätyypeistä (3) ja jopa 90%:ssa tietyn tyyppisistä syöivistä omaa jonkin Ras-onkogeenin aktivoivan mutaation (4).

R-Ras muistuttaa rakenteeltaan muita Ras-perheen proteiineja, mutta muodostaa kuitenkin poikkeuksen syöpäalttiuden suhteen. Siinä missä yhden aminohapon mutaatio voi muuttaa toisen Ras-perheen jäsenen syöpää aiheuttavaksi onkogeeniksi, R-Ras geenissä vastaavan muutoksen on raportoitu aiheuttavan vain vähäisiä muutoksia proteiiniaktiivisuudessa. Lisäksi havaitut muutokset proteiiniaktiivisuudessa ovat olleet riittämättömiä aiheuttamaan solun muuntumista patologistesti käyttäytyväksi syöpäsoluksi (7). R-Ras geenin aktivoivia mutaatioita ei ole toistaiseksi löydetty yhdestäkään ihmisellä tavattavasta syöpäkasvaimesta (8), vaikka K-Ras:n ja H-Ras:n tiedetään olevan merkittävimpiä ja yleisimpiä tunnettuja proto-onkogeenejä. R-Ras toimiikin solunsisäisessä signaaloinnissa H-Ras:n vastavaikuttajana ja näiden kahden

Ras-perheen proteiinin vaikutukset solun kasvuun ja kehitykseen ovat päinvastaisia. Rintasyöpäsoluilla suoritetuissa soluviljely-kokeissa onkin todettu, että R-Ras itse asiassa inhiboi kaikkia syövälle tunnusomaisia piirteitä; proliferaatiota ja migraatiota (9).

Hiljattain myös osoitettiin, että verisuonten endoteliaalisoluissa voimakkaasti ilmevä R-Ras estää verisuonten uudismuodostukselle eli angiogeneesille keskeistä solujen jakautumista ja verisuonten syöpäkasvaimen kasvua sekä toisaalta edistää verisuonten maturaatiota (suonen seinämän stabilisaatio eli verisuonen seinämän permeabiliteetin eli läpäisevyyden lasku) kasvaimen angiogeneesin ja valtimovaurioiden yhteydessä (9). Vaikka R-Ras ilmentymistä eri kudoksissa kartoittavan tutkimuksen mukaan R-Ras ei ilmenny normaaleissa epiteelikudoksissa (10), epiteeliaalista alkuperää olevien kasvainten (eli karsinoomien) tiedetään tuottavan R-Ras proteiinia (11). Tämän perusteella oletimme, että karsinogeenilähtöinen kasvainmuodostus iholla saattaisi indusoida R-Ras ilmentymisen epiteelisoluissa ja lähdimme selvittämään R-Ras proteiinin roolia syövän synnyssä ihon epidermaalisen karsinogeneesimallin avulla.

AINEISTO JA MENETELMÄT

1.1 Hiiret

Homotsygoottiset poistogeeniset hiiret, joilla STOP-kodonin omaavan DNA-jakson insertio estää R-Ras:n ilmentymisen 4:n ja 5:n eksonin välillä kromosomi 7:n R-Ras:sta (R-Ras KO -hiiret) hankittiin Masanobu Komatsun laboratorion (Sanford-Burnham Medical Research Institute of Lake Nona, Orlando, Florida, USA). Ennen kokeiden suorittamista R-Ras -heterotsygoottiset hiiret takaisinristeytettiin kahdeksan sukupolven verran C57BL/6 -kannan (Harlan) kanssa, jotta saavutettaisiin R-Ras:ia ilmentävä (villityyppinen, WT) ja poistogeeninen (KO) kanta samassa hiiren taustageenikannassa (sisarukset). Genotyyppi määritettiin jokaisesta eläimestä PCR:llä (10) ja R-Ras:n ilmentymisen puuttuminen varmistettiin myöhemmin standardeja immunovärjästekniikoita (immunohistokemia ja western blotting kudoksista) käyttäen. Hiiriä ruokittiin tavanomaisilla laboratoriopelleillä ja vedellä ad libitum. Kaikki eläinkokeet suoritettiin Etelä-Suomen Eläinkoelautakunnan hyväksymiä linjauksia noudattaen.

1.2 Kasvaininduktio

Tutkiaksemme R-Ras:n osuutta ihokasvainten muodostumisessa, käsitelimme aikuisten hiirten (R-Ras KO ja WT) selän kerran paikallisesti DMBA-mutageenillä (*7,12-Dimethylbenz[a]anthracene*), ja sen jälkeen toistuvasti (2 x viikossa) solujen kasvua lisäävällä TPA:lla (growth promoting histone deacetylase inhibitor) (14). Edellä selostettu käsittely sai aikaan papilloomien kehittymisen viikkojen aikana interfollikulaarisesta epidermiksestä.

Käytännössä kokeelliset työt suoritettiin seuraavasti: 8-viikkoisten hiirien selästä poistettiin karvat ja 24 tuntia myöhemmin 50 µg DMBA:ta (Sigma) 200 µl:ssa asetonissa siveltiin selkäpuolen ihon karvattomalle alueelle. Viikon kuluttua tästä, hiirien selän ihoa käsiteltiin kahdesti viikossa 5 µg:lla TPA:ta (Sigma) 200 µl:ssa asetonissa aina 19 viikon ajan. Kasvaimet laskettiin kahdesti viikossa. Alueelle kasvanut karvoitus poistettiin huolellisesti, kasvaimia varoen, kahden viikon välein.

1.3 Immunohistokemialliset ja TUNEL-värjäykset

Ihonäytteet sekä hoitamattomista kontrollihiiristä että DMBA-TPA hoidetuista hiiristä kerättiin 19 viikon kuluttua kokeen aloituksesta. Kudosnäytteet fiksattiin 4% paraformaldehydillä ja valettiin paraffiiniin. Paraffinileikkeille (6 µm paksuisille) suoritettiin hematoksyliini/eosiinivärjäys (HE) ja DAB-immunohistokemiallinen värjäys (IHC). IHC:ssa käytettiin seuraavia vasta-aineita valmistajan ohjeiden mukaisesti: LS-C147992 kanin anti-R-Ras- (Lifespan Biosciences, Seattle, Washington, USA), TEC-3 rotan anti-Ki67 (DakoCytomation, Glostrup, Tanska) ja 550274 rotan anti-CD31 (BD Pharmingen, Oxford, Englanti). Käytetyt sekundaari vasta-aineet olivat horseradish peroxidase (HRP) -konjugoidut vuohen anti-kani- (Dako) ja 414311F anti-rotta -histidiini (Nichirei Bio, Tokio, Japani). Immunohistokemiallinen TUNEL-värjäys apoptoottisille tumille suoritettiin käyttäen K403-50 TUNEL IHC -kittiä (Biovision, Milpitas, Kalifornia, USA) yhdessä metyyli vihreän tumavärjäyksen kanssa.

1.3.1 Histologisten näytteiden kvantitatiivinen analyysi

Kaikki lasit skannattiin käyttäen Aperio ScanScope® CS- ja XT systems (Aperio Technologies, Kalifornia, USA) -ohjelmistoja (15). Lasien tarkastelu ja analysointi tapahtui käyttämällä verkkopohjaista ImageScope™ -ohjelmaa. Immunohistokemiallisten signaalien kvantifointiin käytettiin Spectrum Analysis -algoritmikokoelmaa ja Image Scope –analytiikkaohjelmistoa. Kyseiset algoritmit määrittävät positiivisen värjäytymän pinta-alan, keskimääräisen positiivisen intensiteetin (optinen tiheys) sekä heikon (1+), keskivahvan (2+), ja vahvan (3+) positiivisen värjäytymän (26). Kaikki kvantifioidut histokemialliset analyysit (Ki-67, CD31, TUNEL) suoritettiin jokaisen värjäytymän osalta vakiintuneita käytäntöjä noudattaen (15, 16).

1.4 Ihonäytteiden preparointi ja analyysi

Näytteet otettiin sekä kontrollieläinten että DMBA- ja TPA-käsiteltyjen eläinten seulan ihosta tuumori-induktioprotokollan 19. viikolla. Kerätyt ihonäytteet jäädytettiin välittömästi nestemäisellä typellä ja myöhemmin hajotettiin ns. RIPA-puskurissa, johon oli lisätty cOMplete proteaasi-inhibiittoria (Roche) sekä HALT -fosfataasi-inhibiittoria (Thermo Scientific). Kudokset homogenisoitiin ja supernatanttien proteiinikonsentraatio mitattiin Qubit-laitteella (Invitrogen).

Jokaisesta näytteestä 50 µg proteiinia ladattiin NuPAGE 4-12% gradientin geelille (Invitrogen, Paisley, Englanti) ja ajettiin Magic Mark ja Blue See –standardien kanssa. R-Rasin havaitsemiseen käytettiin seuraavia primaarivasta-aineita: kanin polyklooniset vasta-aine R-Ras vastaan (Cell Signaling Technology:ltä, Danvers, Massachusetts, USA) ja anti-b-aktiini (Millipore, Espoo, Suomi) ja vuohen anti-GAPDH

(AbCam, Cambridge, Englanti). Käytetty sekundaarinen vasta-aine oli HRP-konjugoitu anti-kani (Cell Signaling Technology). Western blot-membraanit kuvattiin saturoituattomina ImageQuant-laitteella (GE Lifesciences, Amersham, Englanti) ja kvantifioitiin densitometrisesti ImageJ –ohjelmistolla (NIH, Bethesda, USA), jossa b-aktiinia tai GAPDH:ta käytettiin proteiinien latausmäärien normalisointiin eri näytteen välillä.

1.5 Statistiikka

Keskiarvot on esitetty 95% luottamusvälein. Kaikki data analysoitiin, jotta sen normaalijakaumanmukaisuus voitiin määritellä. Merkitsevyys tietyssä aikapisteessä laskettiin käyttäen Studentin t-testiä normaalijakaumaa noudattavalle datalle. Survival plotin data analysoitiin logrank-merkitsevyydestillä (Mantel-Cox) ja ei-normaalijakautunut aikajana analysoitiin nonlineaarisella regressiolla. Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornia, USA) -ohjelmistoa käytettiin suurimpaan osaan analyyseja ja STATA 11 (College Station, Texas: StataCorp LP) -statistista analyysiohjelmistoa käytettiin non-lineraariseen regressioanalyysiin.

2 TULOKSET

2.1 Dermaalisella R-Ras:lla on merkittävä rooli ihokasvainten kehittämisessä

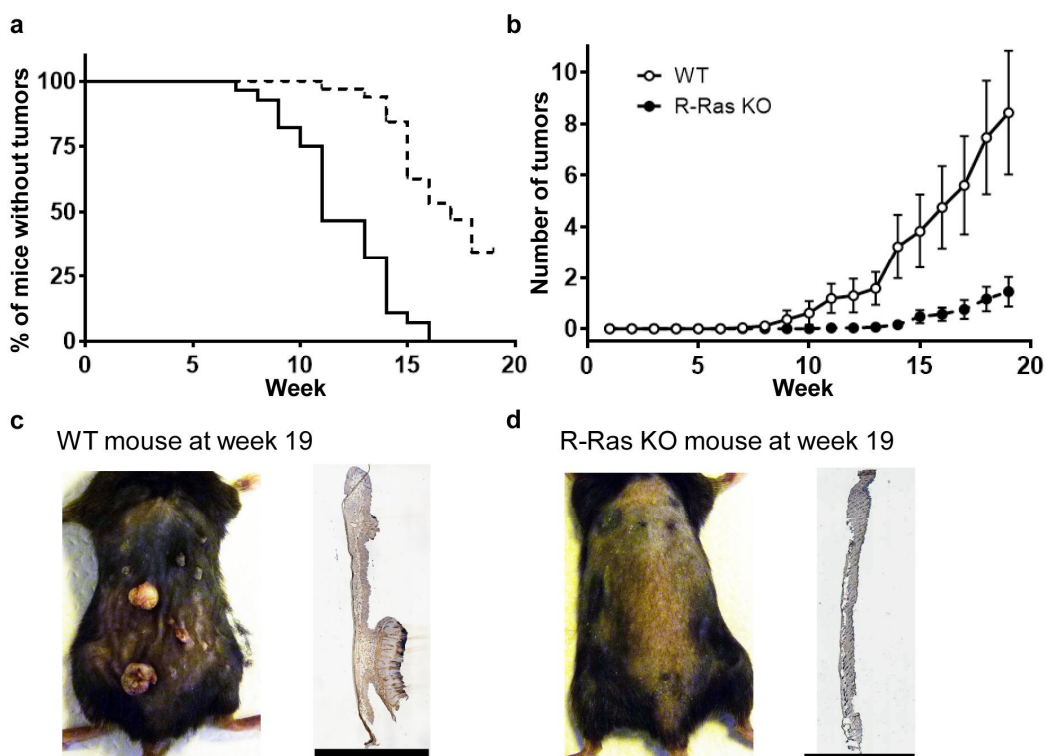
Huolimatta hiljattain julkaistusta tutkimuksesta, jonka mukaan R-Ras ei ekspressoitu normaalissa epiteelikudoksessa (10), epiteeliaalista alkuperää olevien kasvainten tiedetään tuottavan R-Ras proteiinia (11). Tämän perusteella oletimme, että karsinogeenilähtöinen kasvainmuodostus saattaisi indusoida R-Ras ekspression epidermiksen soluissa ja lähdimme selvittämään R-Ras proteiinin roolia ihon epidermaalisen karsinogeneesi-mallin avulla. Täysikasvuisten R-Ras KO- ja WT-eläinten selän iho käsiteltiin kertaalleen DMBA:lla ja tämän jälkeen toistetusti kasvainten kasvua edistävällä TPA:lla. Käsittely sai aikaan papilloomien muodostumisen interfollikulaarisesta epidermiksestä (17).

Ensimmäiset papilloomat havaittiin villi-tyyppin eläimillä seitsemän viikon kuluttua DMBA-käsittelystä ja 16 viikon kuluttua kaikille (100%, n=28) WT-eläimille oli kehittynyt papilloomia (Kuva 1a). Kasvainten määrä villityypin eläimillä nousi tasaisesti, kunnes 19 viikon kuluttua kokeen aloittamisesta papilloomia oli kehittynyt noin 6 jokaista (WT) eläintä kohden (Kuva 1b).

R-Ras poistogeeniset eläinten havaittiin puolestaan olevan huomattavan vastustuskykyisiä ihokasvainten kehittämiselle (Kuva 1a-d). Kasvaimet kehittyivät KO-eläimillä 6 viikkoa (mediaani) myöhemmin kuin WT-eläimillä. Kun 16 viikon jälkeen kaikilla WT eläimillä oli kasvaimia, 53% R-Ras KO eläimistä ei ollut kehittynyt ainuttakaan havaittavissa olevaa papilloomaa. Lopulta vain yhdelletoista (34%, n=32) R-Ras KO eläimelle kehittyi useampi kuin yksi papilloomia kokeen aikana. Myöskään villi-

tyypin eläimillä yleisesti esiintyneitä suuria papilloomia (halkaisija >2mm) ei havaittu lainkaan poistogeenisillä eläimillä (Kuva 1c-d).

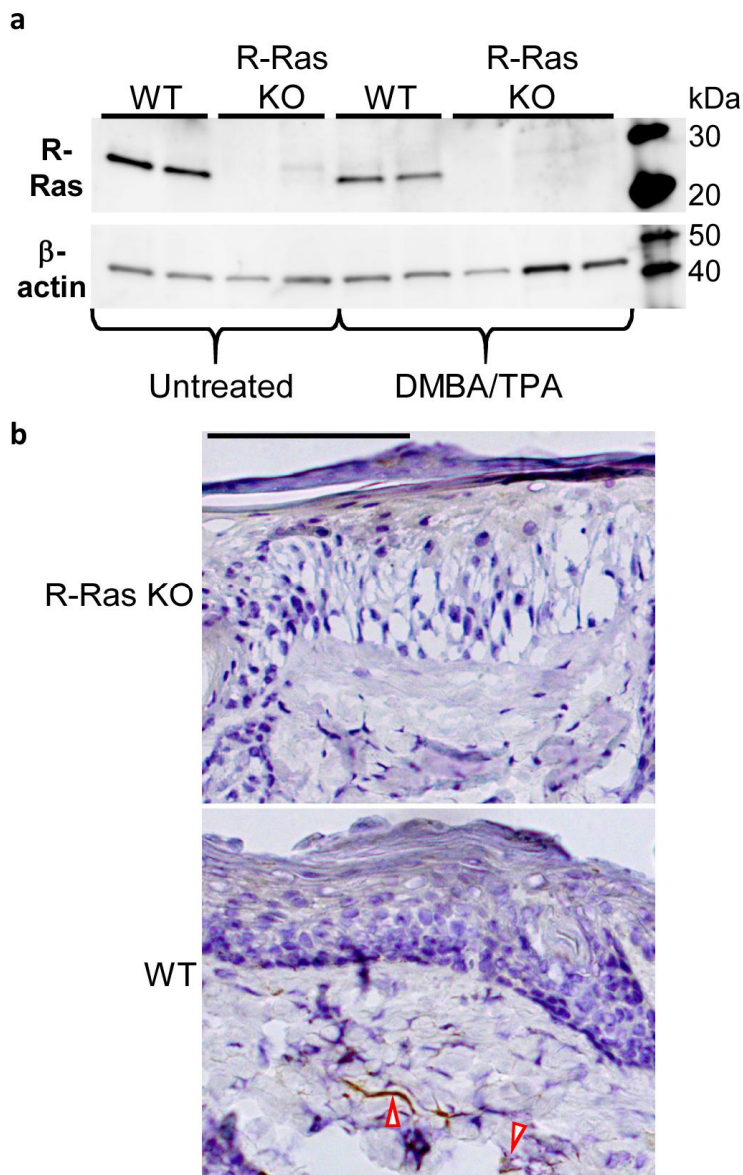
Lisäksi suoritettaessa erilaisia histologisia analyyseja (H&E, R-Ras, CD31, Ki67, apoptoosi) ennalta määritellyistä kohdista kemiallisesti altistettua ihoa, R-Ras KO-hiirillä havaittu juuri lainkaan papilloomia (ns. intra-dermaalisia kasvaimia). Kokeiden aikana villityypin eläimillä kasvaimia ilmaantui keskimäärin jopa kolme kertaa niin paljon kuin R-Ras KO-eläimillä (negatiivinen binominaalinen regressioanalyysi: IRR=3.2; 95% CI 1.97, 5.21). Kokeen päättyessä (19 viikkoa DMBA/TPA -käsittelyn jälkeen) villityyppisillä eläimillä oli keskimäärin lähes 6 kertaa enemmän kasvaimia kuin R-Ras KO -hiirillä.



KUVA 1. R-Ras:lla on keskeinen rooli ihokasvainten kehittämisessä. **(a)** Ensimmäiset papilloomat havaittiin villi-tyyppin eläimillä seitsemän viikon kuluttua DMBA-käsittelystä ja 16 viikon kuluttua kaikilla (100%, n=28) WT-eläimillä oli papilloomia. Vastaavasti 53%:lle R-Ras KO eläimistä ei ollut 16 viikon kuluessa kehittynyt ainuttakaan havaittavissa olevaa papilloomaa. **(b)** Kasvainten määrä villityypin eläimillä nousi tasaisesti ja 19 viikon kohdalla papilloomia oli keskimäärin 6 jokaista (WT) eläintä kohden. **(c-d)** Villi-tyyppin eläimillä yleisesti esiintyneitä suuria papilloomia (halkaisija >2mm) ei havaittu lainkaan R-Ras KO eläimillä.

2.2 R-Ras proteiinin ilmentyminen on rajoittunut verisuoniin ja ihon dermaliseen osaan

WesternBlot-analyysissä havaittiin huomattava R-Ras:n ilmentyminen sekä käsittelemättömien että DMBA/TPA-käsittelyn saaneiden villityypin hiirten ihossa (Kuva 2a). Samalla R-Ras-proteiinin täydellinen puuttuminen varmistettiin käsittelemättömien ja DMBA/TPA käsiteltyjen R-Ras poistogeenisten eläinten näytteistä (Kuva 2a). R-Ras:n ilmentymistä ei havaittu lainkaan normaalin tai DMBA/TPA käsitellyn ihon epidermaalisessa solukossa villi-tyyppin hiirillä (Kuva 2b). Dermaalisissa verisuonissa (ja mahdollisesti myös joissakin sidekudoksen soluissa) R-Ras proteiinia ilmentyi, mutta epidermoksen (ja kasvainten) osalta R-Ras:n ilmentymistä ei todettu missään vaiheessa (Kuva 2b).

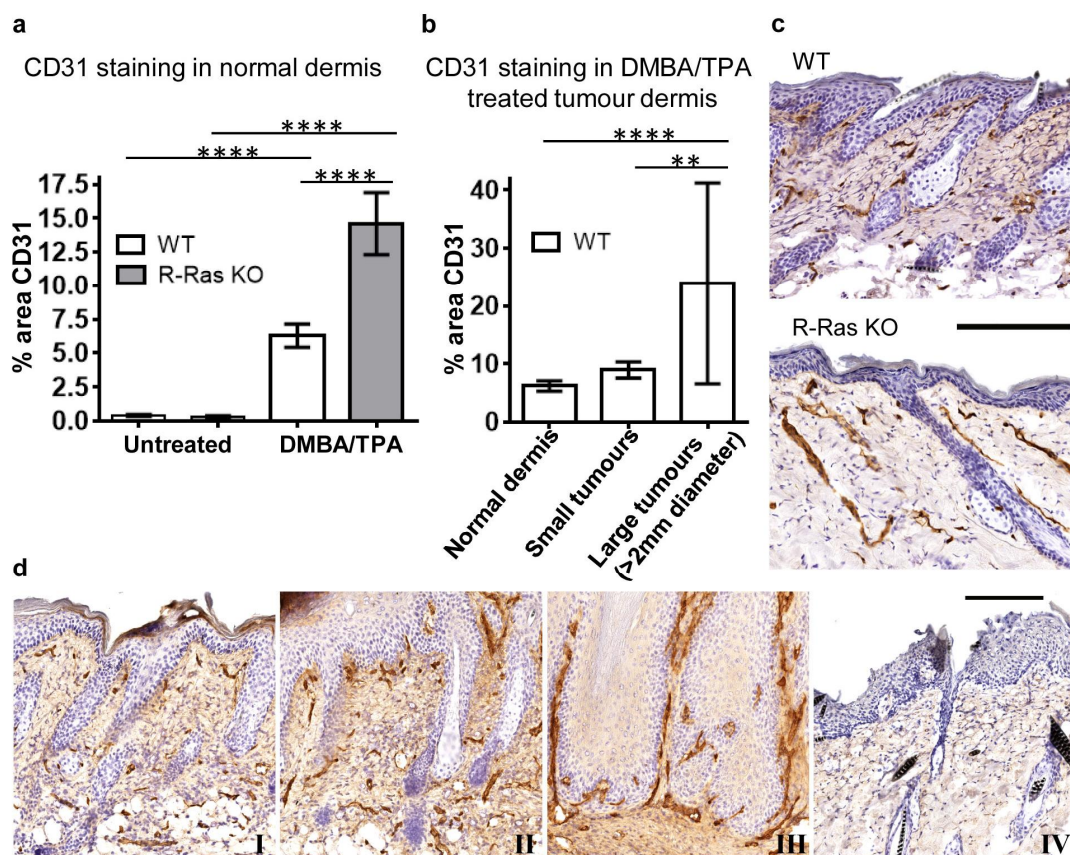


KUVA 2. R-Ras ilmentyminen on rajoittunut ihossa verisuoniin ja yksittäisiin soluihin ihon dermaaliseen osaan. **(a)** WesternBlot-analyysillä varmistettiin R-Ras:n ilmentyminen villityypin hiirten ihossa sekä sen täydellinen puuttuminen R-Ras poistogeenisten eläinten näytteistä. **(b)** R-Ras-proteiinia ilmentyi villityypin hiirillä dermaalisisissa verisuonissa, mutta epidermaalisen solukon (ja kasvainten) osalta R-Ras:n ilmentymistä ei todettu missään vaiheessa.

2.3 R-Ras KO eläinten resistenssi ihokasvainten kehittymiselle ei ole selitettävissä vähentyneellä vaskularisaatiolla

Koska verenkierron riittävyys on merkittävimpiä rajoittavia tekijöitä kasvaimen kasvussa syövässä ja koska aikaisemmin on osoitettu, että ihmiseltä hiiren ihon alle siirretyt syöpäkasvaimet (xenograftit) ovat verisuonitukseltaan hypervaskularisoituneita R-Ras KO eläimillä (10,12), tutkittiin ihon vaskularisaatiota DMBA/TPA-käsittelyn saaneilta ja käsittelemättömiltä eläimiltä. Ihon verisuonituksen tiheydessä ei havaittu merkittäviä eroja normaalien, käsittelemättömien WT ja R-Ras KO eläinten välillä määritettäessä verisuonten lukumäärää ja tiehyttä ihossa CD31-vasta-aineeseen perustuvassa immunohistologisessa analyysissä (Kuva 3). Käsittely DMBA/TPA:lla sai aikaan yli 10-kertaisen lisäyksen verisuonituksen tiheydessä molemmilla genotyypeillä. Poistogeenisille eläimille kehittyi huomattavasti enemmän, lähes kolminkertainen määrä, verisuonitusta villi-tyyppin eläimiin verrattuna ($P < 0.0001$, Kuva 3a), mikä on linjassa edellisten tutkimusten (10,12) kanssa.

Huolimatta siitä, että DMBA/TPA-käsittelyn jälkeen villi-tyyppin hiirten ihossa havaittiin merkittävästi vähemmän verisuonitusta kuin R-Ras KO hiirillä, kasvainten kehittyminen edellyttää kuitenkin uudisverisuonia myös villityypin eläimillä, mitä kuvastaa suurentunut verisuonituksen määrä kasvainten alapuolella tiheimmän suonituksen paikantuessa suurten ($> 2\text{mm}$ halkaisijalta) kasvainten kohdalle ($P < 0.0001$ non-tumor epidermis vs. large tumors ja $P < 0.0036$ small vs. large tumors, Kuva 3b). Täten johtopäätöksemme on, että ihon verisuonitus ei selitä kasvainten vähäistä ilmentymistä R-Ras KO eläimillä, joiden vaskularisaatio oli DMBA/TPA-käsittelyn jälkeen huomattavasti runsaampaa kuin papilloomia tuottavilla villi-tyyppin eläimillä (Kuva 3).



KUVA 3. R-Ras KO eläinten resistenssi ihokasvainten kehittymiselle ei ole selity vähentyneellä vaskularisaatiolla vaan verisuonitus on suurempaa. **(a)** DMBA/TPA-käsittely sai aikaan yli 10-kertaisen lisäyksen verisuonituksen tiheydessä molemmilla genotyypeillä. Poistogeenisille eläimille kehittyi lähes kolminkertainen määrä verisuonitusta villi-tyypin eläimiin verrattuna ($P < 0.0001$). **(b)** Villityypin eläimillä havaittiin suurentunut verisuonituksen määrä kasvainten alapuolella tiheimmän suonituksen paikantuessa suurten (>2mm) kasvainten kohdalle ($P < 0.0001$ non-tumor epidermis vs. large tumors ja $P < 0.0036$ small vs. large tumors).

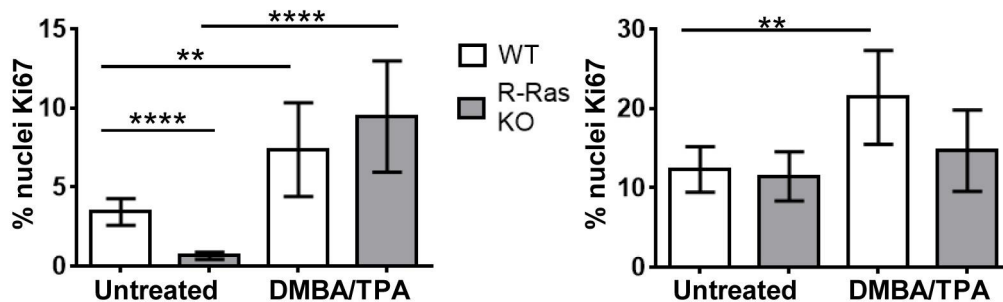
2.4 R-Ras KO-eläimillä dermaalisten solujen proliferaatio on rajoittunutta ja apoptoosi kiihtynyttä

Käsittelemättömillä villi-tyypin eläimillä havaittiin dermiksessä merkittävästi enemmän proliferoivia soluja (Ki67 määrittäminen) kuin käsittelemättömillä R-Ras KO eläimillä ($P < 0.0001$, Kuva 4a), vaikka epidermisen osalta vastaavaa eroa ei ollut todettavissa. Käsittely DMBA/TPA:lla sai aikaan huomattavan hyperproliferatiivisen vasteen iholla (Kuva 4a), mutta tilastollisesti merkittävää eroa genotyyppien välillä ei havaittu dermaalisten tai epidermaalisten solujen proliferaatiossa.

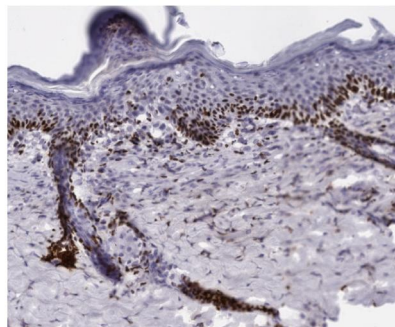
Tämä osoittaa, että huolimatta papilloomien huomattavasti suuremmasta ilmentymisestä villi-tyypin hiirillä (poistogeenisiin nähden), ei kahden genotyypin välillä ole havaittavissa juurikaan eroa proliferoivien solujen osuudessa epidermiksessä, jossa kasvaimet manifestoituivat.

Koska R-Ras:n salpaamisen mahasyövän epiteelisoluissa on raportoitu edistävän solujen ohjelmoituna kuolemaa eli apoptoosia (11), tutkimuksessa mitattiin myös apoptoosin määrää kumpaakin genotyyppiä edustavien eläinten ihossa TUNEL-värjäyksellä. Sekä villi-tyypin että R-Ras KO eläimillä havaittiin merkittävästi enemmän apoptoituvia soluja normaalissa epidermiksessä ($P = 0.0097$ ja $P < 0.0001$) kuin DMBA/TPA-käsitellyssä epidermiksessä (Kuva 4c), mutta eroa genotyyppien välillä ei havaittu. Vaikka epidermaalisten apoptoottisten solujen määrässä ei todettu genotyyppien välistä eroa, havaittiin merkittävästi enemmän apoptoottisia soluja dermiksessä käsittelemättömillä R-Ras KO eläimillä kuin vastaavilla villi-tyypin eläimillä ($P = 0.0007$, Kuva 4c).

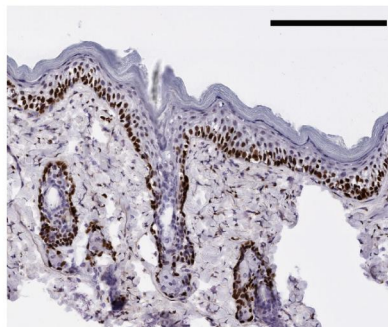
a Ki67 staining in non-tumour dermis Ki67 staining in non-tumour epidermis



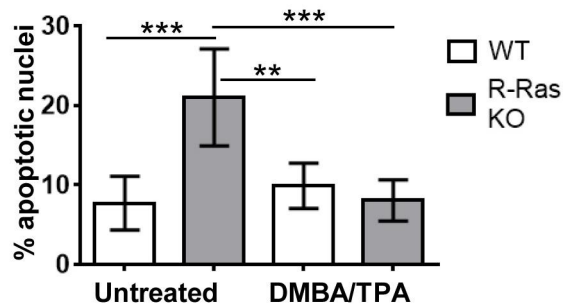
b Treated WT: Ki67



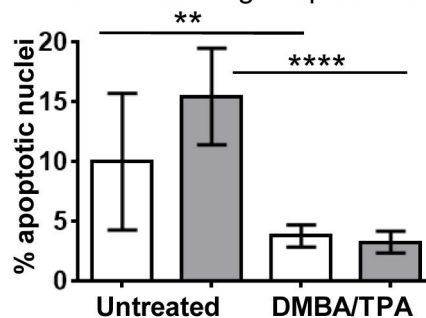
Treated R-Ras KO: Ki67



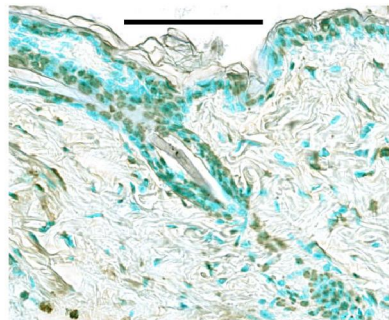
c TUNEL staining in dermis



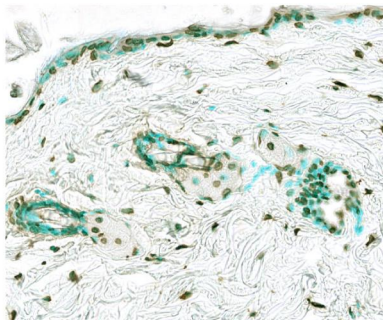
TUNEL staining in epidermis



d Untreated WT: TUNEL



Untreated R-Ras KO: TUNEL



KUVA 4. R-Ras KO-eläimillä dermaalisten solujen proliferaatio on rajoittunutta ja apoptoosi kiihtynyttä. **(a-b)** Käsittelemättömillä villi-tyypin eläimillä havaittiin dermiksessä merkittävästi enemmän proliferoivia soluja kuin käsittelemättömillä R-Ras KO eläimillä ($P < 0.0001$). Epidermiksen osalta vastaavaa eroa ei todettu.

DMBA/TPA-käsittely sai aikaan huomattavan hyperproliferatiivisen vasteen molemmilla genotyypeillä. **(c-d)** Sekä villi-tyypin että R-Ras KO eläimillä havaittiin merkittävästi enemmän apoptoituvia soluja normaalissa epidermiksessä kuin DMBA/TPA-käsitellyssä epidermiksessä ($P = 0.0097$ ja $P < 0.0001$). Merkitsevää eroa genotyyppien välillä ei havaittu. Sen sijaan dermiksessä havaittiin merkittävästi enemmän apoptoottisia soluja käsittelemättömillä R-Ras KO eläimillä kuin vastaavilla villi-tyypin eläimillä ($P = 0.0007$).

3 POHDINTA

Tutkimuksen hypoteesina oli, että kasvaimien ilmaantuminen tapahtuisi oleellisesti aiemmin R-Ras KO-eläimillä kuin villityypin eläimillä johtuen R-Ras:n ilmentymiseen liitetystä anti-onkogeenisistä ominaisuuksista kuten solujen voimakkaasta kiinnittymisestä ympäröivää soluvälitilaan sekä proliferaation että invasiivisen kasvun (solumigraation) estosta (13). Hypoteesin testaamiseksi käytimme hyvin kuvattua ja yleisesti käytettyä kemiallista karsinogeneesi-mallia (DMBA/TPA käsittely) normaaleille ja R-Ras poistogeenisille eläimille ihokasvainten indusoimiseksi (17). Ryhmien välillä ollut ainoa ero oli R-Ras-proteiinin ilmentyminen iholla. Yllättäen havaitsimme, että R-Ras:lla on keskeinen asema epidermaalisessa hyperplasiassa ja ihokasvainten kehittämisessä hiirillä.

Tiivistetysti, tutkimuksemme osoitti pienen GTPaasin, R-Ras:n, tärkeän roolin epidermaalisessa hyperplasiassa ja kasvainten kehittämisessä ihon karsinogeneesimallissa. Tämä on huomiota herättävää ja odottamatonta, sillä R-Ras:n aktiivisuus on aiemmin yhdistetty päinvastaisiin muutoksiin solujen käyttäytymisessä kuin sille rakenteellisesti läheisten Ras-perheen tunnettujen proto-onkogeenien (13). Toisin kuin muiden Ras-perheen jäsenten kohdalla, todisteita aktivoivista mutaatioista R-Ras geenissä ei ole löydetty maligniteettien yhteydessä (13). Tämä tekee erittäin mielenkiintoiseksi tutkimuksemme tuloksen, jonka mukaan R-Ras, Ras-perheen ainoa jäsen, jota ei tähän mennessä ole liitetty syövän kehittymiseen, on merkittävässä roolissa kasvainten kehittämisessä iholla.

Tulos on mielenkiintoinen myös siinä mielessä, ettei R-Ras:n ilmentymistä ollut havaittavissa epidermiksessä, jossa kasvaimet esiintyivät, vaan ainoastaan ihon dermaa-

lisessa osassa. Tämä havainto on linjassa aiempien tutkimusten kanssa, jotka ovat osoittaneet, ettei normaaleissa epiteelikudoksissa tuoteta R-Ras-proteiinia (10). Tutkimuksessamme ei kuitenkaan havaittu kasvainten tai normaalien epidermaalisten solujen tuottavan R-Ras:a vasteena kemiallisesti indusoidulle karsinogeneesille, mikä on ristiriidassa aikaisempien havaintojen kanssa, joiden mukaan epitelialaista alkupe-
rää olevat kasvaimet tuottavat huomattavasti R-Ras:a (11).

Kuitenkin tuloksemme mukailee tuoretta rintasyöpätutkimusta (23); Vaikka rintasyöpäsolujen ilmentämän R-Ras:n on havaittu tekevän kasvainsoluista yleisesti vähemmän onkogeenisia soluviljely-olosuhteissa (*in vitro*), R-Ras -ilmentymä oli merkittävässä määrin matalampi kasvaimessa, kuin ympäröivässä normaalisessa kudoksessa (23). Kyseiset tulokset yhdessä tuloksemme kanssa korostavat mahdollisuutta, että R-Ras:n voimakas ilmentyminen ympäröivässä sidekudoksessa voi olla merkittävämpää kasvaimen kehityksen ja etenemisen kannalta kuin mainittu ilmentyminen kasvainsoluissa itsessään. Avainkysymykseksi muodostuukin, onko rintasyöpäkasvaimia ympäröivässä sidekudoksessa todetulla R-Ras:n voimakkaalla ilmentymisellä (23) yhteyttä kasvaimen kehittymiseen rintasyövässä samaan tapaan kuin omassa tutkimuksessamme.

Mahdollisia R-Ras KO-eläinten vastustuskykyisyyttä kasvaimille selittäviä seikkoja läpikäydessä ilmeisintä vaikuttaa olevan, että suurin ja merkittävin ero R-Ras villityypin ja KO eläinten välillä on löydettävissä normaalista dermiksestä – ei epidermiksestä. Poistogeenisillä eläimillä havaittiin vähemmän jakautuvia tumia ja enemmän solukuolemaan tekeviä (apoptoituvia) soluja dermiksessä. Vielä on mahdotonta antaa selitystä sille, mikä on poistogeenisen genotyypin vaikutus epidermaalisen

kasvaimen kehittymiseen, etenkin kun normaaleilla (villityypin) hiirillä ei ole epidermaalista R-Ras-tuotantoa.

Löydöksemme antaa ymmärtää, että epidermaalinen papilloomanmuodostus R-Rasia ilmentävillä eläimillä johtuu mekanismeista, jotka ovat samankaltaisia kuin gastrointestinaalisen polypoosin kehitykseen johtavat (18); Gastrointestinaalisessa polypoosissa Lkb1 -geenin puuttuminen ympäröivästä mesenkymaalisesta kudoksesta aiheuttaa tuumorinmuodostusta kasvainsoluja tukevien stroomasolujen vähentyneen TGF β -tuotannon kautta sekä puutteellista TGF β -viestintää epiteelisoluissa (18). Myös tyvisolusyövässä puolestaan todetaan erilainen stroomasidonnainen riippuvuus (19, 20). Lisäksi dermiksessä voi olla R-Ras -riippuvaisia muutoksia immunipuolustuksessa tai vaeltavissa progeniittorisoluissa. Häiriöt tällaisten solutyypin toiminnassa on myös yhdistetty epidermaaliseen tuumorigeneesiin (21, 22).

4 LÄHTEET

1. Wennerberg K, Rossman K L, Der C J. *The Ras Superfamily at a glance. Journal of Cell Science* 2005;118:843-46.
2. Goodsell DS (1999). "The molecular perspective: the ras oncogene". *Oncologist* 4 (3): 263-4.
3. Bos J (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review". *Cancer Res* 49 (17): 4682-9. PMID 2547513.
4. Downward J (January 2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy". *Nat. Rev. Cancer* 3 (1): 11-22.
5. Ahmadian M R, Zor T ym. *Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants. Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7065-70.
6. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000). "Chapter 25, Cancer". *Molecular cell biology* (4th ed.). San Francisco: W.H. Freeman)
7. Lowe DG, Goeddel DV. *Heterologous expression and characterization of the human R-ras gene product. Mol Cell Biol* 1987; 7: 2845-2856.
8. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. *RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. Nat Rev Cancer* 2011; 11: 761-774.
9. Ehrhardt A, Ehrhardt GR, Guo X, Schrader JW. *Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together. Exp Hematol* 2002; 30: 1089-1106.
10. Komatsu M, Ruoslahti E. *R-Ras is a global regulator of vascular regeneration that suppresses intimal hyperplasia and tumor angiogenesis. Nat Med* 2005; 11: 1346-1350.

11. Nishigaki M, Aoyagi K, Danjoh I, Fukaya M, Yanagihara K, Sakamoto H, et al. *Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. Cancer Res 2005; 65: 2115-2124.*
12. Sawada J, Urakami T, Li F, Urakami A, Zhu W, Fukuda M, et al. *Small GTPase R-Ras regulates integrity and functionality of tumor blood vessels. Cancer Cell 2012; 22: 235-249.*
13. Sawada J, Komatsu M. *Normalization of tumor vasculature by R-Ras. Cell Cycle 2012; 11: 4285-4286.*
14. Gao Q, Liu W, Cai J, Li M, Gao Y, Lin W, et al. *EphB2 promotes cervical cancer progression by inducing epithelial-mesenchymal transition. Hum Pathol 2014; 45: 372-381.*
15. Xu L, Komatsu M. *Promoter cloning and characterization of the anti-vascular proliferation gene, R-ras: role of Ets- and Sp-binding motifs. J Biol Chem 2009; 284: 2706-2718.*
16. Järvinen TA, Ruoslahti E. *Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 21671-21676.*
17. Perez-Losada J, Balmain A. *Stem-cell hierarchy in skin cancer. Nat Rev Cancer 2003; 3: 434-443.*
18. Katajisto P, Vahtomeri K, Ekman N, Ventela E, Ristimäki A, Bardeesy N, et al. *LKB1 signaling in mesenchymal cells required for suppression of gastrointestinal polyposis. Nat Genet 2008; 40: 455-459.*

19. Nitzki F, Zibat A, Konig S, Wijgerde M, Rosenberger A, Brembeck FH, et al. *Tumor stroma-derived Wnt5a induces differentiation of basal cell carcinoma of Ptch-mutant mice via CaMKII. Cancer Res* 2010; 70: 2739-2748.
20. Lesack K, Naugler C. *Morphometric characteristics of basal cell carcinoma peritumoral stroma varies among basal cell carcinoma subtypes. BMC Dermatol* 2012; 12: 1-5945-12-1.
21. Wong SY, Reiter JF. *Wounding mobilizes hair follicle stem cells to form tumors. Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 4093-4098.
22. Swann JB, Smyth MJ. *Immune surveillance of tumors. J Clin Invest* 2007; 117: 1137-1146.
23. Song J, Zheng B, Bu X, Fei Y, Shi S. *Negative association of R-Ras activation and breast cancer development. Oncol. Rep.* 2014; 31: 2776-2784.

5 LIITTEET