

1 Einleitung

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen und eine zunehmende Zahl von Menschen erkrankt und leidet daran. Die molekularen Ursachen der Krebsentstehung sind äußerst vielschichtig und eine Heilung nur in komplexer Einzelanalyse möglich. Neben den Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen kristallisiert sich immer mehr eine weitere Ebene der Regulation der Genexpression als entscheidender Parameter der Krebsentstehung heraus, die epigenetische Inaktivierung z.B. durch Promoterhypermethylierung. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Funktion und der epigenetischen Inaktivierung des Tumorsuppressorgens RASSF1A, das häufig durch Promoterhypermethylierung in Zellen ausgeschaltet wird, woraus die Veränderung zur Krebszelle resultieren kann.

1.1 Der Tumorsuppressor *RAS Association Domain Family 1* (RASSF1)

RASSF1 wurde in einem Hefe-2-Hybrid Experiment, in dem nach Interaktionspartnern des DNA-Reparaturproteins XPA (Xeroderma Pigmentosum, *complementation group A*) gescreent wurde, gefunden (Dammann *et al.* 2000). Das Gen ist auf Chromosom 3p21.3 lokalisiert. Der Verlust des kurzen Armes des Chromosoms 3 wird häufig bei Krebsentstehungsprozessen beobachtet, so z.B. in über 90% der kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien und in bis zu 40% der nicht kleinzelligen Lungenkarzinome (Dammann *et al.* 2000). Die zusätzliche epigenetische Inaktivierung des zweiten Allels führt zum fast vollständigen Expressionsverlust und kann in der Krebsentstehung resultieren, wenn z.B. ein Tumorsuppressorgen betroffen ist. Knudson beschrieb diesen Prozess, bei dem beide Allele durch unterschiedliche Mechanismen verloren gehen, in seiner *two hit hypothesis* (Knudson 1971). Sieben Spleißvarianten werden vom Gen *RASSF1* transkribiert. Die drei Hauptformen stellen *RASSF1A*, *RASSF1C* und *RASSF1F* dar; *RASSF1A* und *RASSF1F* werden vom Promoter A, *RASSF1C* vom Promoter C transkribiert (Abbildung 1). Beide Promotoren tragen CpG Inseln, in der Krebsentstehung scheint jedoch lediglich die epigenetische Inaktivierung des Promoters A durch Hypermethylierung eine Rolle zu spielen. Das Protein RASSF1A besteht aus 340 Aminosäuren und trägt vier potentiell relevante Funktionsdomänen: die N-terminale C1 (*protein kinase C conserved region 1*) Domäne, die auch als Diacylglycerol/Phorbolster Bindedomäne (DAG) bezeichnet wird, eine putative Phosphorylierungsstelle der ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) Kinase, die *RAS association (RalGDS/AF-6) domain* (RA) und die C-terminale SARAH (Sav/RASSF1/Hippo) Proteininteraktionsdomäne. Dem Transkript RASSF1C fehlt die C1 Domäne des N-Terminus. Die ATM Domäne und auch die C-terminalen Domänen RA und SARAH sind identisch mit den Domänen des Proteins RASSF1A (Dammann *et*

al. 2000) (Abbildung 1). Das Transkript RASSF1F ist 92 Aminosäuren lang und beinhaltet lediglich die C1 Domäne (Dammann *et al.* 2005) (Abbildung 1).

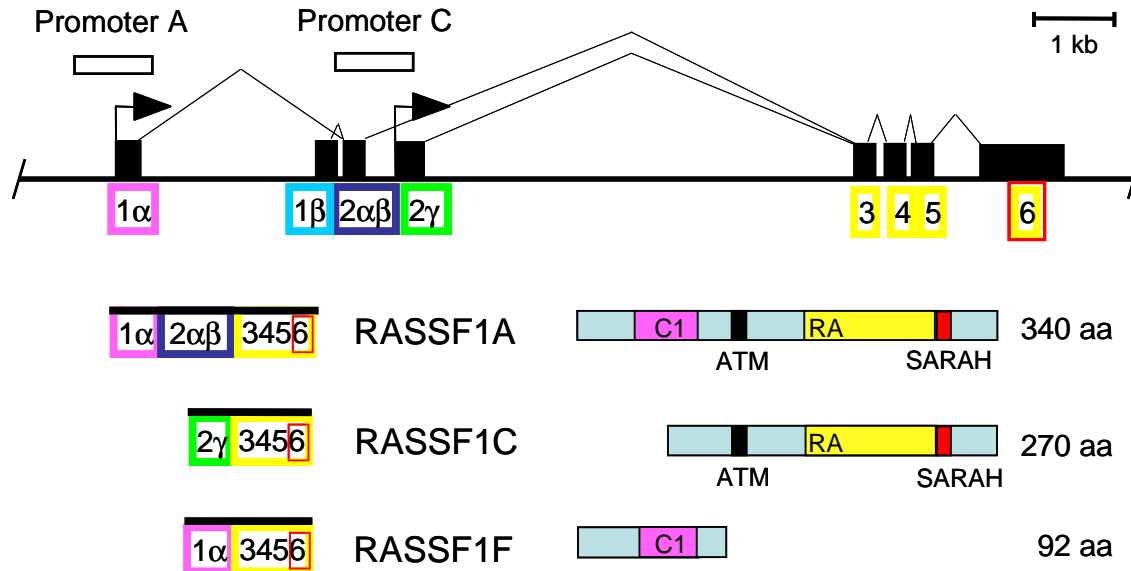


Abbildung 1. Aufbau des Genes RASSF1 und der 3 Haupttranskripte RASSF1A, RASSF1C und RASSF1F im Überblick. Mit 1α, 1β, 2αβ, 2γ, 3, 4, 5, 6 wurden die 7 Exons des Genes bezeichnet, C1 stellt die diacylglycerolbindende Domäne, ATM die ATM-Phosphorylierungsstelle, RA die Ras Association Domain und SARAH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

Die C1 Domäne ist von den Protein Kinase C (PKC) Molekülen bekannt. Bei diesen Kinasen führt eine Bindung von Diacylglycerol an der C1 Domäne zur Translokation des Proteins aus dem Zytosol zur Zellmembran (Newton 1995). Die Komplexierung von Zinkionen durch das in der C1 Domäne liegende Zinkfingermotiv kann Einfluss auf die Fähigkeit zur Phorbolsterbindung und damit auf die Lokalisation der Proteine haben (Ahmed *et al.* 1991). Kim *et al.* definierten folgende Konsensussequenz für Substrate der ATM Kinase: (P/L/I/M)X(L/I/D/E)SQ (Kim *et al.* 1999). Auch RASSF1A trägt eine solche putative Phosphorylierungsstelle der ATM Kinase an Position W125 bis K138, das Serin an Position 131 könnte potentiell phosphoryliert werden und es wurde ebenfalls gezeigt, dass das Glutamin (bei RASSF1A an Position 132) essentiell für eine effektive Phosphorylierung des Serin ist (Kim *et al.* 1999). Bei der RAS-Assoziations Domäne in RASSF1 handelt es sich um eine RalGDS/AF-6 Bindedomäne. RalGDS wurde 1993 als Guanidinaustauschfaktor der Ras Proteine RalA und RalB gefunden (Albright *et al.* 1993; Kikuchi *et al.* 1994; Campbell *et al.* 1998). Spaargaren und Bischoff zeigten in Hefe-2-Hybrid Experimenten, dass die R-RAS Bindedomäne des Proteins RalGDS sowohl mit R-RAS, H-RAS und K-RAS als auch mit RAP interagieren und RalGDS so als Effektor dieser RAS Proteine fungieren kann (Spaargaren and Bischoff 1994). Bei der SARAH Domäne handelt es sich um eine Proteininteraktionsdomäne, die unter anderen nach den Drosophila-Proteinen Sav (Salvador) und Hpo (Hippo) benannt ist, die Mitwirkende in einem neuen

Signaltransduktionsweg in *Drosophila* darstellen (Scheel and Hofmann 2003; Udan *et al.* 2003). Die homologen Proteine des Menschen WW45 (Sav) und MST (Hpo) interagieren ebenfalls über die SARAH Proteininteraktionsdomäne (Praskova *et al.* 2004; Chan *et al.* 2005).

1.1.1 Funktion von RASSF1

Einige Ansätze zur Aufklärung der Funktion von RASSF1 liegen bereits vor, doch die genaue Wirkweise und betroffene Signalkaskaden sind nicht grundlegend analysiert. RASSF1A ist ein Tumorsuppressor. In zahlreichen Krebsarten liegt der Promoter von *RASSF1A* methyliert vor, das heißt, die Expression von RASSF1A ist während der Krebsentwicklung vermindert bzw. aufgehoben worden (Dammann *et al.* 2005). Die Reexpression von RASSF1A in Krebszelllinien führte zu einer Abnahme der Proliferation (Dammann *et al.* 2000; Burbee *et al.* 2001; Dreijerink *et al.* 2001; Kuzmin *et al.* 2002; Rong *et al.* 2004). In Nacktmäuse injizierte A549 Zellen, die RASSF1A reexprimierten, bildeten kleinere Tumore, verglichen mit A549 Zellen, die RASSF1A nicht exprimierten (Dammann *et al.* 2000).

1.1.1.1 Lokalisation von RASSF1

Wird RASSF1A als GFP Fusionsprotein überexprimiert, so liegt eine Kollokalisierung zu Tubulin vor (Liu *et al.* 2003; Dallol *et al.* 2004; Rong *et al.* 2004; Vos *et al.* 2004). Dabei ist RASSF1A während der Interphase am Zytoskelett assoziiert und während der Mitose liegt eine Kollokalisierung zu Spindelpolen und Spindeln vor. Rong *et al.* bestätigte auch die Interaktion von endogenem RASSF1A mit Mikrotubulin (Rong *et al.* 2004). Die Interaktion mit β -Tubulin und mit γ -Tubulin konnte im Präzipitationsexperiment *in vivo* nachgewiesen werden (Liu *et al.* 2003; Vos *et al.* 2004). Auch das Transkript RASSF1C ist tubulinassoziiert (Rong *et al.* 2004; Vos *et al.* 2004). Die Behandlung der transfizierten Zellen mit Nocodazol zeigte, dass RASSF1A die Mikrotubulstrukturen zu stabilisieren vermag. Die Interaktion mit Tubulin erfolgt über die Domänen ATM und RA, d.h. über den Abschnitt D120 bis S288 (Liu *et al.* 2003; Rong *et al.* 2004). Liu *et al.* zeigten auch, dass die Deletion des C-Terminus (RASSF1ADel289-340) von RASSF1A zu einer Ausbildung abnormer Spindeln bzw. monopolarer Spindeln führt (Liu *et al.* 2003). Die mutagenisierten Formen RASSF1AMut65 (C \rightarrow R) und RASSF1AMut257 (R \rightarrow Q) und die deletierte Variante RASSF1ADel120-185 waren nach Transfektion als GFP-Fusion nicht mikrotubulinassoziiert und auch die stabilisierende Funktion von RASSF1A nach Nocodazolbehandlung war nach Mutation aufgehoben (Dallol *et al.* 2004; Vos *et al.* 2004).

Im Hefe-2-Hybrid Experiment fanden Dallol *et al.* zwei Interaktionspartner von RASSF1A, die ebenfalls mikrotubuliassoziiert vorliegen, VCY2IP1/C19ORF5 und MAP1B (*microtubule-associated protein 1B*) (Dallol *et al.* 2004), das in der Entwicklung des Nervensystems, im Transport zwischen Axonen und dem Auswachsen von Neuriten eine Rolle zu spielen scheint (Bloom *et al.* 1985; Ma *et al.* 2000).

C19ORF5 wurde auch von Song *et al.* im Hefe-2-Hybrid Experiment als Interaktionspartner von RASSF1A ermittelt und *RASSF1A binding protein 1* (RABP1) genannt (Song *et al.* 2005). Es wurden zwei Proteindomänen in RABP1 identifiziert, die für eine Mikrotubulinassoziation verantwortlich sind (Song *et al.* 2005). Die Interaktion mit RASSF1A wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt und die Lokalisation an das Centrosom während des Zellzyklus dargestellt (Song *et al.* 2005). Fehlt RABP1, so bindet RASSF1A nicht mehr an Spindeln und die Interaktion mit CDC20 (*cell division cycle 20 homolog*) ist verhindert (Song *et al.* 2005). In weiteren Studien zu C19ORF5 wird dessen Funktion als Vermittler zwischen Tubulinstrukturen und Mitochondrien gesehen, was Einfluss auf die Kontrolle des Zelltods und die Fragmentierung genomischer DNA während des Zelltods (MAGD, *mitochondrial aggregation and genome destruction*) hat (Liu *et al.* 2005). C19ORF5 interagiert mit dem DNA Bindeprotein LRPPRC, das mitochondrienassoziiert und ebenfalls ein DNA Bindeprotein ist (Liu *et al.* 2005).

1.1.1.2 Interaktion von RASSF1A mit RAS

Die Lokalisation von RASSF1A am Zytoskelett stellt einen scheinbaren Widerspruch zur vermuteten Assoziation mit dem membranständigen Ras dar. Chen *et al.* zeigten jedoch, dass die Form K-RAS ebenfalls tubulinassoziiert vorliegen kann, während z.B. H-RAS nicht an Tubulin bindet (Chen *et al.* 2000). Diese Lokalisation würde eine mögliche Interaktion von K-RAS mit RASSF1A fördern. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen RASSF1A und K-RAS wurde auch vermutet, da sich die epigenetische Inaktivierung des Promoters von *RASSF1A* und die Mutation des Gens *K-RAS* z.B. in Pankreaskarzinomen ausschloss (Dammann *et al.* 2003). K-RAS kann mit RASSF1A koimmunopräzipitiert werden (Vos *et al.* 2004). Wird aktiviertes K-RAS in der humanen, embryonalen Nierenzelllinie 293-T überexprimiert, so resultiert daraus eine genomische Instabilität der Zellen. Dieser Phänotyp kann durch Überexpression von GFP-RASSF1A, nicht aber durch Überexpression der deletierten RASSF1A Variante RASSF1ADel120-185 aufgehoben werden (Vos *et al.* 2004). RASSF1ADel120-185 ist kernlokalisiert. Ortiz-Vega *et al.* konnten keine direkte Interaktion mit RAS detektieren, postulierten jedoch die indirekte Interaktion über das mit RASSF1A heterodimerisierende und zu RASSF1A homologe Protein NORE1 (*novel Ras effector 1*) (Ortiz-Vega *et al.* 2002). Vos *et al.* zeigten jedoch, dass die RA Domäne, die sowohl im Protein RASSF1A als auch in RASSF1C exprimiert wird, an aktiviertes RAS bindet (Vos *et al.* 2000). Auch *in vivo* wurde eine Interaktion von RASSF1C mit aktivem GTP gebundenen RAS bestätigt (Vos *et al.* 2000). RASSF1C löste nach Expression in NIH 3T3 Zellen einen wachstumsinhibierenden Effekt aus, dieser Effekt wurde bei Koexpression von aktivem Ha-RAS(G12V) verstärkt (Vos *et al.* 2000). Khokhlatchev *et al.* konnten keine Interaktion von RASSF1A weder mit Ha-RAS(G12V) noch mit Ki-RAS(G12V) nachweisen, zeigten jedoch, dass NORE1 mit beiden RAS Formen interagiert (Khokhlatchev *et al.* 2002).

1.1.1.3 Das Homolog NORE1

Das Protein NORE1 (*novel Ras effector 1*) ist ein Homolog des Proteins RASSF1A. NORE1 wurde in einem Hefe-2-Hybrid Screen nach Interaktionspartnern des aktiven RAS gefunden und auch die Bindung von RAS *in vivo* wurde gezeigt (Vavvas *et al.* 1998; Ortiz-Vega *et al.* 2002). Die Bindung erfolgt über die C-terminale RA Domäne (Ortiz-Vega *et al.* 2002). Es wurde auch gezeigt, dass NORE1 homodimerisiert und mit RASSF1A, nicht aber mit RASSF1C heterodimerisiert; die Interaktion von NORE1 mit RASSF1A erfolgt über den N-Terminus des Proteins RASSF1A (RASSF1A1-119) (Ortiz-Vega *et al.* 2002). Eine Interaktion von RASSF1A oder RASSF1C mit RAS im Hefe-2-Hybrid Experiment konnte hier nicht gezeigt werden, so dass eine indirekte Assoziation mit RAS durch die Bindung an NORE1 postuliert wurde (Ortiz-Vega *et al.* 2002). NORE1 hat von allen homologen Proteinen mit 49% die höchste Sequenzhomologie zu RASSF1A und trägt im N-Terminus ebenfalls eine C1 Domäne (Agathangelou *et al.* 2005). In mitotischen Zellen ist die Isoform NORE1A, wie RASSF1A kolokalisiert zu den Centrosomen und den Spindelapparaten (Moshnikova *et al.* 2006). Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression zur Inhibierung des ERK-Signalweges führt (Moshnikova *et al.* 2006). Ebenso wie RASSF1A inhibiert die Reexpression von NORE1 in A549 Zellen die Proliferation (Dammann *et al.* 2000; Aoyama *et al.* 2004). Die Deletion der MST bindenden Domäne von NORE1 änderte nichts am Proliferationsverhalten der Zellen (Aoyama *et al.* 2004).

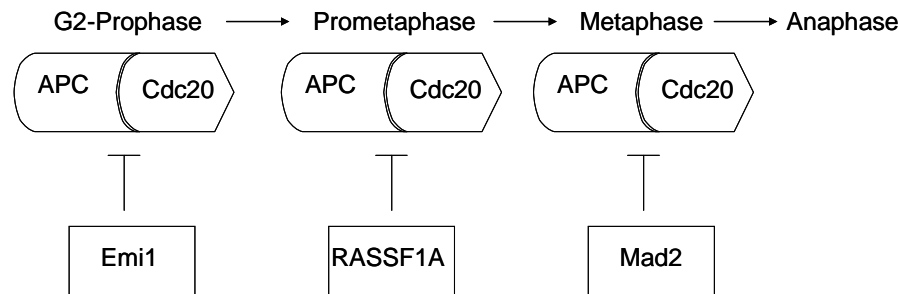
1.1.1.4 Zellzyklusregulation und Migration

In der Brustkrebszelllinie MCF7 wurde 24 bzw. 48 h nach transienter Überexpression von RASSF1A ein Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklus detektiert, während nach 72 h Überexpression ein Arrest in der G₂-M-Phase festgestellt wurde (Rong *et al.* 2004). Zellen der humanen, embryonalen Nierenzelllinie 293T, die endogenes RASSF1A exprimieren, arretierten nach zusätzlicher Überexpression von exogenem RASSF1A oder RASSF1C ebenfalls in der G₂-M-Phase (Rong *et al.* 2004). Song *et al.* zeigten auch einen G₂-M-Arrest nach Überexpression von RASSF1A, der jedoch in diesem Fall nicht durch RASSF1C hervorgerufen werden konnte (Song *et al.* 2004). RASSF1A inhibiert den Zellzyklus, die mutagenisierten Formen RASSF1AMut65 und RASSF1AMut257 zeigten jedoch eine signifikant niedrigere Inhibierung verglichen zu RASSF1A (Dallol *et al.* 2004). Die Form RASSF1AMut131 (S→F) zeigte dabei jedoch keine Veränderungen verglichen mit RASSF1A (Vos *et al.* 2004). Die Überexpression von RASSF1A resultierte weiterhin in einer verlangsamten Migration und einer veränderten Morphologie der Zellen (Dallol *et al.* 2005). Ebenso wurde gezeigt, dass auch eine Herabregulation der RASSF1A Expression zur ungewöhnlichen Zellmorphologie, verminderten Zell-Zell-Adhäsion und zur verstärkten Migration der Zellen führte (Dallol *et al.* 2005). Der Inhibitor der Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase LY294002 konnte den Effekt einer erhöhten Migrationsfähigkeit nach Herabregulation der RASSF1A Expression aufheben und zusätzlich wurde eine erhöhte Phosphorylierung von AKT verzeichnet (Dallol *et al.* 2005). Die Erhöhung des Cyclin

D1 Levels nach Herabregulation von RASSF1A kann durch den Inhibitor LY294002 verhindert werden (Dallol *et al.* 2005). Die Hemmung der Akkumulation von Cyclin D1 bei Expression von RASSF1A war von Shivakumar *et al.* bereits beschrieben (Shivakumar *et al.* 2002), ebenso, wie die Möglichkeit den Zellzyklusarrest in der G₁-Phase, hervorgerufen durch Reexpression von RASSF1A in der humanen Lungenkrebszelllinie H1299, durch Überexpression von E7 (aus Papillomavirus) oder Cyclin A zu umgehen (Shivakumar *et al.* 2002). Die mutagenisierten Formen RASSF1AMut133 (A→S) und RASSF1AMut131 (S→F) arretierten den Zellzyklus ebenso wie RASSF1A (Shivakumar *et al.* 2002). Eine funktionelle Auswirkung auf den Zellzyklusarrest nach Mutation des Codons 131 und 133 liegt nicht vor, obwohl eine Abnahme der Phosphorylierung im Western Blot detektiert wurde (Shivakumar *et al.* 2002). RASSF1A scheint somit in den Rb Signaltransduktionweg involviert zu sein. Rb1, ein Tumorsuppressorgen, das in Retinoblastoma inaktiviert vorliegt, stellt einen Regulator des Übergangs von der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus zur S-Phase dar und ist somit entscheidend für die Regulation der Proliferation der Zelle. Liegt Rb1 aktiv (lediglich an zwei Stellen phosphoryliert) vor, so bindet es die Transkriptionsfaktoren E2F1, E2F2 und E2F3, wird es jedoch hyperphosphoryliert, so wird es inaktiviert, E2F wird nicht mehr gebunden und die Transkription von Proteinen, die den Übergang zur S-Phase initiieren, wird eingeleitet (Ho and Dowdy 2002; Sherr 2004; Schulz 2005). Phosphoryliert wird Rb durch die CDK4/Cyclin D bzw. durch die CDK2/Cyclin E. Gezeigt wurde, dass die Herabregulation von RASSF1A das Cyclin D1 Level erhöht (Shivakumar *et al.* 2002). Eine Erhöhung des Cyclin D1 Levels könnte regulatorische Effekte auf Rb haben und so möglicherweise den von Rong *et al.* beschriebenen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase verursachen. Die exogene Expression von RASSF1A rief eine verminderte Phosphorylierung von JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) und eine verminderte Expression von Cyclin D1 hervor und auch die JNK Substrate ATF-2 und c-Jun wurden nicht mehr phosphoryliert (Whang *et al.* 2005), woraus die Gruppe die Regulation des Cyclin D1 Levels durch RASSF1A, den wachstumsinhibierenden Effekt von RASSF1A und den G₁-Arrest durch den JNK Signalweg vermittelt sieht (Whang *et al.* 2005).

Eine regulatorische Funktion wurde RASSF1A durch die Bindung von CDC20 zugesprochen (Abbildung 2), diese Interaktion inhibiert die Aktivität des APC (*anaphase promoting complex*)-CDC20 Komplexes (Abbildung 2), der dafür verantwortlich ist, dass zellzyklusabhängige Proteine wie Cycline ubiquitiniert und daraus resultierend abgebaut werden (Peters 2002; Song and Lim 2004; Song *et al.* 2004; Wasch and Engelbert 2005). Song *et al.* zeigten ebenfalls die Assoziation von RASSF1A zu den Spindelapparaten während der Mitose und den G₂-M-Arrest bei Überexpression von RASSF1A, der mit einer Akkumulation von Cyclin A und Cyclin B einhergeht (Song *et al.* 2004). Durch die Interaktion von CDC20 mit dem N-Terminus von RASSF1A reguliert dieses den APC-CDC20 Komplex negativ und kontrolliert damit den Übergang von Prometaphase in die Mitose (Song *et al.* 2004). Mathe *et al.* spricht in diesem Zusammenhang von RASSF1A als „neuem Hüter der Mitose“ (Mathe

2004) und die regulatorische Funktion von RASSF1A wird als unabhängig von den ebenfalls negativ regulierenden Proteinen Emi1 (*early mitotic arrest 1*) und Mad2 beschrieben (Song and Lim 2004) (Abbildung 2). Die Interaktion von RASSF1A mit CDC20 ist abhängig von dem Protein RABP1 (Song *et al.* 2005).



Nach Mathe, 2004 bzw. Song *et al.*, 2004b

Abbildung 2. Schema der Wirkweise von RASSF1A in der Zellzyklusregulation durch Inhibierung des APC-CDC20 Komplexes. Neben Emi1 (*early mitotic arrest1*) und Mad2, 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.

Eine weiterer Mechanismus der Zellzyklusregulation durch RASSF1A wurde postuliert, nachdem die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor p120^{E4F} gezeigt wurde, die über den N-Terminus von RASSF1A geht (Fenton *et al.* 2004). Die Koexpression von RASSF1A und p120^{E4F} bewirkte eine Erniedrigung des Anteils an Zellen in der S-Phase und eine Erhöhung der Zellen in der G₁-Phase (Fenton *et al.* 2004). Die Gruppe konnte zeigen, dass die Regulation des Zellzyklus dabei von der Expression des Cyclin A2 abhängen könnte und dass RASSF1A dabei die Bindung von p120^{E4F} am Promoter von Cyclin A2 reguliert und somit dessen Expression (Ahmed-Choudhury *et al.* 2005). Cyclin A2 ist im Übergang der Zelle zur S-Phase und in den G₂-M-Übergang involviert.

1.1.1.5 RASSF1A und Apoptose

Die Rolle von RASSF1 in apoptotischen Prozessen ist verschieden beschrieben. So wurde gezeigt, dass die Transfektion von RASSF1C in die embryonale Fibroblastenzelllinie der Maus NIH 3T3 Zellen Apoptose induziert, und dass dieser auch wachstumsinhibierender Effekt verstärkt wurde, wenn konstitutiv aktives Ha-RAS(G2V) koexprimiert wurde (Vos *et al.* 2000). Mit RASSF1A transient transfizierte H1299 Zellen zeigten keinerlei apoptotische Reaktion (Shivakumar *et al.* 2002). Nach Expression von GFP-RASSF1A in MCF7 und 293T Zellen jedoch wurde im zeitlichen Verlauf von 24 h bis 72 h ein Anstieg der Zellkerne in der Sub-G₀-G₁-Phase, die apoptotisch sind, festgestellt (Rong *et al.* 2004).

Möglich wäre eine Regulation der Apoptose durch RASSF1A über den Interaktionspartner MST, bei dem es sich um eine proapoptotische Kinase handelt, oder über die von Apo2L/TRAIL bzw. Interferon induzierten Apoptosemechanismen. Beide Signalmechanismen werden im Folgenden beschrieben.

1.1.1.5.1 RASSF1A und dessen Interaktionspartner MST

Ein weiterer Interaktionspartner von NORE1 und RASSF1A wurde im Hefe-2-Hybrid System beschrieben: MST1 (*Mammalian STE20 like Kinase*) (Khokhlatchev *et al.* 2002). Die Bindung des Interaktionspartners erfolgt über den C-Terminus von NORE1 und RASSF1A bzw. den C-Terminus von MST1 (Khokhlatchev *et al.* 2002). Die Bindung von NORE1 und MST1 wurde *in vivo* bestätigt und auch die Trimerisierung mit Ha-RAS(G12V) konnte nachgewiesen werden, wobei MST1 und RAS keine Bindung eingehen (Khokhlatchev *et al.* 2002). Die Überexpression von MST1 löst Apoptose aus und die Lokalisation von MST1 an der Zellemembran verstärkt den apoptotischen Effekt von MST1 (Khokhlatchev *et al.* 2002). MST1 ist ein Homolog der Hefe Ste20 (*Sterile20*) Kinasen, die eine Verknüpfung zwischen G-Protein gekoppelten Pheromonrezeptoren und *downstream* MAPK (*mitogen activated protein kinases*) darstellen (de Souza and Lindsay 2004). Eine Untergruppe der Ste20 Kinasen sind die GCKs (*germinal center kinases*), zu denen auch MST1 zählt und die in Regulationsprozesse des Zytoskeletts oder der Apoptose involviert sein können (de Souza and Lindsay 2004). Der C-Terminus von MST1 enthält zwei funktionelle Domänen, die für die Homo- bzw. Heterodimerisation verantwortlich sind (Creasy *et al.* 1996). In dieser Proteinregion liegen auch zwei Caspaseschnittstellen, die von den Caspasen 3, 6, 7 und 9 bzw. 6 und 7 geschnitten werden können, woraus zwei Schnittprodukte resultieren, die 36 bzw. 40-41 kDa groß und katalytisch aktiv sind (Creasy *et al.* 1996; de Souza and Lindsay 2004). MST1 wird durch proapoptische Stimuli wie Paclitaxel aktiviert und bei Überexpression löste MST1 Apoptose aus (Graves *et al.* 1998; Lee *et al.* 2001; Ura *et al.* 2001; Ura *et al.* 2001; de Souza and Lindsay 2004). Es wurde gezeigt, dass sowohl das vollständige Protein MST1 durch Aktivierung von Caspasen, als auch die durch Caspasen geschnittenen Fragmente Apoptose induzieren (Ura *et al.* 2001). MST1 ist im nicht aktivierten Zustand im Zytoplasma lokalisiert. Nach Restriktion durch Caspasen, wobei die Sequenzen, die für eine Kernlokalisierung verantwortlich sind, freigelegt werden, wird es in den Kern transloziert, wo es die Chromatinkondensation durch die Phosphorylierung von H2B und apoptotische Prozesse durch Assoziation mit dem Protein DAP4 (*death associated protein 4*) einleitet (Lee *et al.* 2001; Ura *et al.* 2001; Lin *et al.* 2002; Cheung *et al.* 2003). Glantschnig *et al.* zeigten, dass für die Aktivierung von MST1 nicht nur die Restriktion durch Caspasen verantwortlich ist, sondern die Phosphorylierung an den Positionen Thr183 und Thr187 und an den Positionen Thr177 und Thr387, und dass die Phosphorylierung durch intermolekulare Autophosphorylierung durch Dimerisierung verstärkt wird (Glantschnig *et al.* 2002). MST1 aktiviert p38MAPK und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und diese die MAPK Kinasen 6 und 7, nicht aber die ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) und damit nicht die MAPK Kinase 1 (Creasy *et al.* 1996; Graves *et al.* 1998). Die Rolle von JNK in der von MST1 gesteuerten Apoptose wurde auch von weiteren Arbeitsgruppen postuliert (Watabe *et al.* 1999; Ura *et al.* 2001; Glantschnig *et al.* 2002). Die Phosphorylierungsstelle an Position Thr183 wurde ebenfalls von (Praskova *et al.* 2004) beschrieben, die auch eine

Autophosphorylierung von MST1 feststellten. Die Koexpression von NORE1A, der Isoform NORE1B, RASSF1A und RASSF1C führte zu einer Reduktion der Phosphorylierung an Position Thr183 von MST1, die durch Koexpression von konstitutiv aktivem Ha-RAS(G12V) oder Ki-RAS(G12V) nicht aufgehoben wurde (Praskova *et al.* 2004). Die Aktivierung von MST1 erfolgte nur nach Induktion mit apoptotischen Stimuli, nach Mutation an Position Thr183 war die MST1 Aktivität abgeschwächt und das 36 kDa große Schnittprodukt nach Caspase Restriktion zeigte höhere Aktivität verglichen zu MST1 (Praskova *et al.* 2004). Die Gruppe postulierte, dass NORE1 und RASSF1 MST1 durch Bindung von MST1 im inaktiven Zustand halten, da eine Autophosphorylierung dann nicht katalysiert werden kann (Praskova *et al.* 2004). Ein Fehlen von NORE1 bzw. RASSF1 würde somit zur Freisetzung und Autoaktivierung von MST1 führen und damit zur Einleitung apoptotischer Prozesse. Die Interaktionsdomäne von RASSF1A und MST wurde *in silico* von (Scheel and Hofmann 2003) postuliert und als SARAH (Sav/RASSF1/Hpo) Domäne bezeichnet. Sowohl RASSF1A und RASSF1C als auch WW45, MST1 und MST2 tragen eine SARAH Domäne im jeweiligen C-Terminus (Abbildung 3). Sav steht für das Drosophila Protein Salvador, dass homolog zum humanen WW45 (*45 kDa WW domain protein*) ist und Hpo steht für das Drosophila Protein Hippo, dass homolog zum humanen MST ist. Der Signalweg, in den beide Proteine und auch RASSF1A involviert sind, scheint konserviert in der Natur vorzukommen, wenngleich das Homolog zu RASSF1 in Drosophila LD40758p zwar ebenfalls eine RA und ein SARAH Domäne aufweist, der N-Terminus jedoch Homologie zur LIM Domäne hat und weniger zur C1 Domäne von RASSF1A (Agathangelou *et al.* 2005), wobei es sich jedoch bei beiden um Zinkfinger motive handelt. Bei Sav handelt es sich um ein *scaffold* Protein, dass mit den Kinasen Hpo und Wts (Warts) interagiert (Tapon *et al.* 2002; Harvey *et al.* 2003; Wu *et al.* 2003). Wts ist homolog zu dem humanen Protein LATS (*large tumor suppressor*). Hpo kann Wts phosphorylieren, was zum Zellzyklusarrest führt und zur Apoptose durch Herabregulation von CyclinE und Diap1 (*Drosophila inhibitor of apoptosis*) (Harvey *et al.* 2003; Hay and Guo 2003; Wu *et al.* 2003). Diese Phosphorylierung wurde in Anwesenheit von Sav, das ebenfalls durch Hpo phosphoryliert werden kann, verstärkt (Pantalacci *et al.* 2003; Wu *et al.* 2003). Eine Interaktion von MST2 mit WW45 wurde gezeigt, ebenso wie die Fähigkeit von MST1 und MST2, LATS1 und LATS2 zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (Chan *et al.* 2005) (Abbildung 3). Es konnte jedoch keine Bindung von MST2 oder WW45 mit LATS1 gezeigt werden (Chan *et al.* 2005), obwohl die Interaktion der homologen Proteine Sav und Wts im Drosophila Signalweg bestätigt worden war. Ein Interaktionspartner von LATS2 ist Ajuba, dessen LIM (*Zinc-binding domain present in LIN-11, Isl1, MEC-3*) Domäne für die Interaktion mit LATS2 verantwortlich ist (Abe *et al.* 2006). Beide Proteine sind während der Mitose im Centrosom lokalisiert, dabei phosphoryliert LATS2 Ajuba und es wurde gezeigt, dass LATS2 und Ajuba die Organisation der Spindelmikrotubuli regulieren und γ -Tubulin zum Centrosom rekrutieren (Abe *et al.* 2006).

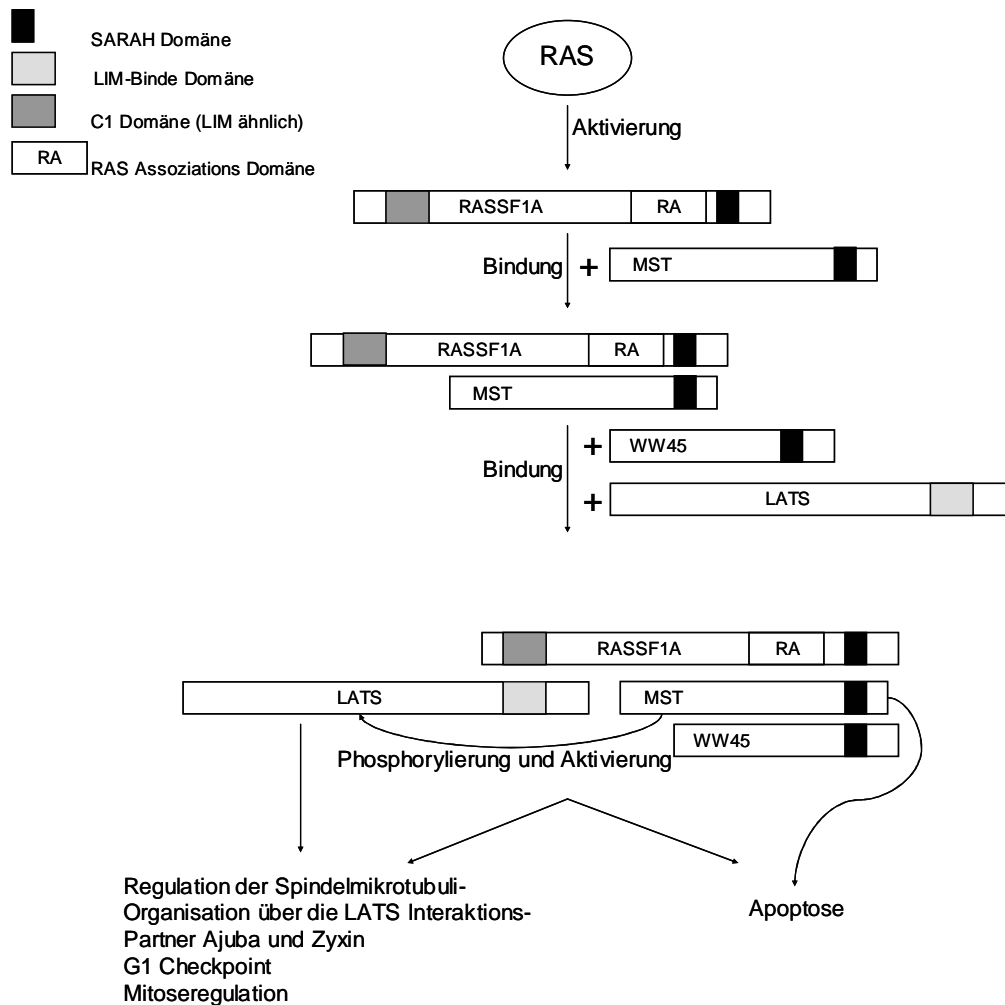


Abbildung 3. Schema des Signalweges, in den RASSF1A, MST, WW45 und LATS involviert sind. Die Interaktionen zwischen RASSF1A und RAS, RASSF1A und MST, MST und WW45 sowie die Phosphorylierung von LATS durch MST sind in der Literatur beschrieben (Siehe 1.1.1.2 und 1.1.1.5.1). Die Interaktion von RASSF1A 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.

Für LATS1 wurde ebenfalls ein Interaktionspartner, Zyxin, gefunden wobei die Interaktion von 2 LIM Domänen im Protein Zyxin abhängig ist (Hirota *et al.* 2000). LATS1 ist während der Interphase an Centrosome und während der Metaphase und Anaphase in den Spindeln lokalisiert (Hirota *et al.* 2000). Zyxin ist in mitotischen Zellen mit LATS1 kolokalisiert und wird während der Mitose durch Cdc2 phosphoryliert, was für eine Bindung von LATS1 essentiell ist (Hirota *et al.* 2000). Es wurde gezeigt, dass LATS1 auch durch Cdc2 phosphoryliert wird und die phosphorylierte Form die Lokalisation an Centrosome und Spindeln zeigt (Morisaki *et al.* 2002). Zudem wurde publiziert, dass LATS an der Regulation des G₁-Checkpoints beteiligt ist und für die normale Progression der Mitose von Bedeutung ist (Abbildung 3), fehlt LATS, so kommt es zur Polyploidie und der G₁-Checkpoint ist aufgehoben (Iida *et al.* 2004).

1.1.1.5.2 Rolle von RASSF1A in den von Apo2L/TRAIL bzw. von Interferon induzierten Apoptosemechanismen

Reu *et al.* beschrieben einen starken Einfluss der Expression von RASSF1A auf die von Interferon induzierte Apoptose, dabei wurde zunächst festgestellt, dass in der Nierenadenokarzinomzelllinie ACHN, in der *renal cell carcinoma* Zelllinie SK-RC-45RCC und in der Melanomzelllinie A375, die mit IFN- α 2 oder IFN- β behandelt wurden, nur dann Apoptose induziert wurde, wenn zusätzlich mit dem DNA-Methyltransferasehemmer 5-Aza-2'-Deoxycytidine oder mit siRNA gegen die DNMT1 AS (*DNA methyltransferase 1*) behandelt wurde, die zur Demethylierung von CpGs führen und damit inaktivierte Promotoren reaktivieren (Reu *et al.* 2006). Die Induktion der Apoptose ging dabei mit einer Reexpression von RASSF1A durch Demethylierung des RASSF1A Promoters einher (Reu *et al.* 2006). In der RASSF1A exprimierenden Melanomzelllinie WM9 wurde Apoptose allein durch Zugabe von Interferon induziert, wobei zusätzlich eine Aktivierung durch Caspaseschnitt bei dem Interaktionspartner von RASSF1A MST1 festgestellt wurde (Reu *et al.* 2006). Nach Herabregulation des RASSF1A Proteinlevels mittels si-RNA wurde der apoptoseinduzierende Effekt von IFN reduziert (Reu *et al.* 2006). Es wurde weiterführend festgestellt, dass diese Induktion der Apoptose in Abhängigkeit der Interferone und RASSF1A Expression teilweise über eine Aktivierung des Apo2L/TRAIL (*Apo2 ligand or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) Weges führt (Reu *et al.* 2006). Apo2L/TRAIL stellt ein Mitglied der Tumor Nekrose Faktor Superfamilie dar und bindet an die Rezeptoren TRAIL-R1-R5 (LeBlanc and Ashkenazi 2003; Bouralexis *et al.* 2005). Dabei handelt es sich bei den Formen TRAIL-R1 und R2 um *death receptors* (DR4/5, Abbildung 4), die die Apoptose induzieren, während die Formen TRAIL-R3-R5 antagonistisch agieren und als *decoy* (Falle) *receptors* bezeichnet werden (Bouralexis *et al.* 2005). Die Bindung von Apo2L/TRAIL an die Rezeptoren TRAIL-R1 und R2 bewirkt die Interaktion des FADD Moleküls mit dem intrazellulären Teil des TRAIL Rezeptors, was wiederum die Pro-Caspase 8 rekrutiert und diese durch autoproteolytische Aktivierung spaltet (Bouralexis *et al.* 2005) (Abbildung 4). Daraus entsteht der *Death Inducing Signalling Complex* (DISC), der zur Aktivierung der Caspasen 8, 10 und 3 führt. Über das Protein Bid, das durch die Caspase 8 aktiviert wird, kann Bax ein Mitglied der Bcl-2 Familie zum Mitochondrium transloziert werden, wo es das Transmembranpotential reduziert und die Ausschüttung von Cytochrom C initiiert (Bouralexis *et al.* 2005) (Abbildung 4). Es wurde auch bereits gezeigt, dass IFN- β Zellen gegen Apo2L/TRAIL zu sensibilisieren vermag (Almasan and Ashkenazi 2003). Nach Stimulation mit TNF- α in MCF7 Zellen, die RASSF1A exprimierten, konnte gezeigt werden, dass Apoptose induziert wird, was nicht der Fall war, wenn RASSF1A nicht exprimiert wurde. In der Osteosarkomzelllinie U2OS zeigte sich nach Herabregulation der RASSF1A Expression durch shRNA, dass die Induktion der Apoptose durch TNF- α vermindert war, das heißt die Aktivierung der PARP, die Ausschüttung von Cytochrom C und die Aktivierung der Caspasen war reduziert (Baksh *et al.* 2005).

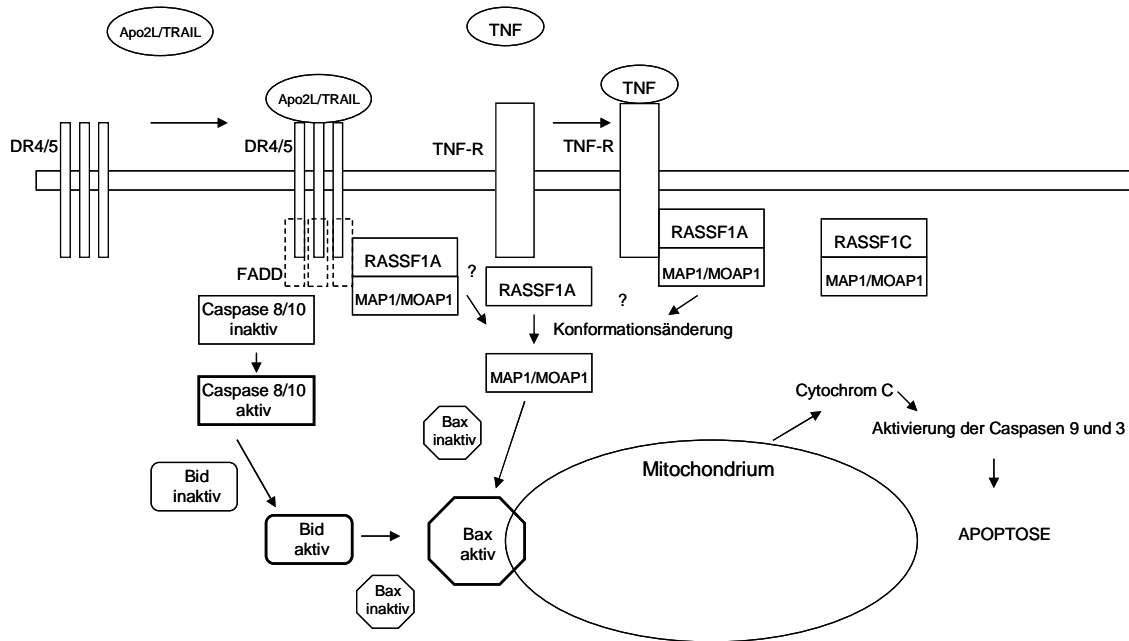


Abbildung 4. Schema des Wirkmechanismus von RASSF1A im Apo2L/TRAIL Signalweg und über die TNF-Rezeptoren (TNF-R). Die Aktivierung von RASSF1A und dessen Bindungspartner MAP1/MOAP1 kann durch die Rezeptoren DR4/5, aktiviert durch den APO2L/TRAIL und TNF-R, aktiviert durch TNF erfolgen. Daraus resultiert 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.

Es wurde gezeigt, dass der Signalweg durch Bindung von RASSF1A an das Protein MAP1 (*modulator of apoptosis 1*, entspricht MOAP1, publiziert von Vos *et al.*) reguliert wird, was wiederum an das Protein Bax bindet und dessen konformationelle Veränderung und Aktivierung ermöglicht (Baksh *et al.* 2005; Vos *et al.* 2006) (Abbildung 4). Die Bindung von RASSF1A mit MAP1 erfolgt über den C-Terminus von RASSF1A und die Sequenz 312EEEE in RASSF1A ist ebenfalls essentiell für die Bindung (Baksh *et al.* 2005). Beide RASSF1A und MAP1/MOAP1 binden an die Rezeptoren TNF-R1 und TRAIL-R1, RASSF1C kann jedoch nicht an diese Rezeptormoleküle binden (Baksh *et al.* 2005) (Abbildung 4).

Die mutierte Form RASSF1AMut65 (C→R) bindet nicht an MAP1/MOAP1 und damit kann Bax nicht aktiviert werden (Vos *et al.* 2006). Die Gruppe zeigte ebenfalls, dass aktiviertes K-RAS die Bindung von RASSF1A mit MAP1/MOAP1 fördert und dass eine Kofunktion von MAP1/MOAP1, RASSF1A und aktiviertem K-RAS Apoptose induziert (Vos *et al.* 2006). Es wurde damit eine Verbindung zwischen K-RAS und Bax über RASSF1A und MAP1/MOAP1 postuliert (Vos *et al.* 2006).

1.1.1.6 Weitere funktionelle Zusammenhänge

Armesilla *et al.* publizierten die Interaktion von RASSF1A und RASSF1C mit PMCA4b (*plasma membrane calmodulin-dependent calcium ATPase 4b*) und deren Kolo-kalisation an der Plasmamembran und am Zytoskelett (Armesilla *et al.* 2004). Die Interaktion von PMCA4b und RASSF1 konnte teilweise die EGF (*epidermal growth*

factor) abhängige Aktivierung des Erk Signalweges vermindern (Armesilla *et al.* 2004) (Abbildung 5).

Der *connector enhancer of KSR* (CNK1) bindet sowohl RASSF1A und RASSF1C als auch MST1 über die SARAH Domäne und es wurde gezeigt, dass die Interaktion von RASSF1A, MST1 mit CNK1 die apoptoseinduzierende Wirkung von CNK1 fördert (Rabizadeh *et al.* 2004)

1.1.1.7 Zusammenfassung der Funktion von RASSF1A

Die Signaltransduktionswege und Interaktionspartner von RASSF1A sind in Abbildung 5 zusammengefasst.

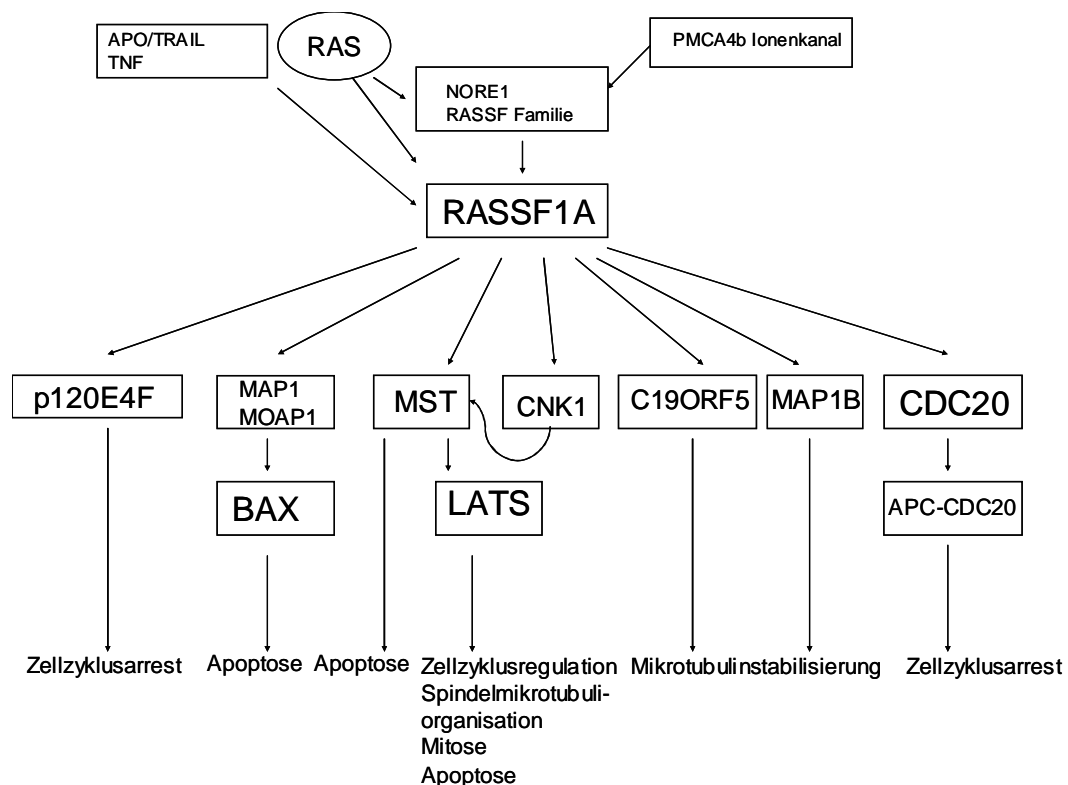


Abbildung 5. Überblick über die in der Literatur beschriebenen Interaktionspartner von RASSF1A und die Signalwege, in die RASSF1A involviert ist (Siehe Kapitel 1.1.1.7.).

Reguliert werden apoptotische Prozesse über RASSF1A durch die Interaktionspartner MAP1/MOAP1 (Baksh *et al.* 2005; Vos *et al.* 2006), der die Apoptose über Bax (Baksh *et al.* 2005) induziert und durch MST (Khokhlatchev *et al.* 2002; Praskova *et al.* 2004), bei dem es sich um eine Kinase handelt, die LATS phosphoryliert (Chan *et al.* 2005). LATS ist an Prozessen der Spindelmikrotubuliorganisation und Regulation der Mitose beteiligt (Hirota *et al.* 2000; Abe *et al.* 2006). MST ist jedoch eine proapoptische Kinase (de Souza and Lindsay 2004). Die Interaktionspartner C19ORF5/RABP1 und MAP1B wirken mikrotubulininstabilisierend und ermöglichen die Kolokalisation von RASSF1A mit Tubulin (Dallol *et al.* 2004; Song *et al.* 2005). Die Aktivierung von CDC20 resultiert in der Bindung von APC und ebenfalls in einem Zellzyklusarrest

(Song *et al.* 2004). Bei dem Interaktionspartner p120E4F handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der den Zellzyklus inhibieren kann (Fenton *et al.* 2004). Die Aktivierung von RASSF1A kann zum einen direkt durch RAS (Vos *et al.* 2000) und zum anderen indirekt über die Aktivierung von NORE1 (Ortiz-Vega *et al.* 2002) erfolgen. Beschrieben ist auch die Aktivierung von RASSF1A in Abhängigkeit von Interferon über den APO/TRAIL Signalweg bzw. den TNF Signalweg (Baksh *et al.* 2005; Reu *et al.* 2006). Armesilla *et al.* zeigten, dass RASSF1A auch durch PMCA4b, einer *plasma membrane calmodulin-dependent calcium ATPase*, aktiviert werden könnte (Armesilla *et al.* 2004).

1.2 Weichteilsarkom

Weichteilsarkome sind seltene Malignome der Weichgewebe (Fettgewebe, Muskelgewebe, Bindegewebe, Blutgefäße und Nerven) mit einer Häufigkeit von zwei Erkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr, das heißt z.B. 1.500 Neuerkrankungen in Großbritannien jährlich (Lehnert 2003; Clark *et al.* 2005). 50% der Betroffenen sterben an dieser Krankheit (Clark *et al.* 2005). Weichteilsarkome treten in der Regel sporadisch auf, genetische Prädispositionen liegen beim Li-Fraumeni Syndrom, beim hereditären Retinoblastom, beim Gardner und Werner Syndrom vor (Lehnert 2003). Die Tumore werden den Ausgangsgeweben zugeordnet. Leiomyosarkome und Rhabdomyosarkome sind muskulären Ursprungs, Liposarkome sind lipomatösen Ursprungs, Fibrosarkome sind fibrösen Ursprungs, maligne fibröse Histiozytome (MFH) sind fibrohistiozytären Ursprungs. Als Risikofaktoren für die Weichteilsarkomentstehung gelten ionisierende Strahlung, chemische Substanzen wie Asbest, Vinylchlorid und 2,3,7,8,-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Virusinfektionen führen zu der Entstehung von Karposi-Sarkomen und Leiomyosarkomen und für die Entstehung von Lymphangiosarkomen können z.B. Lymphstauungen der Arme verantwortlich sein (Lehnert 2003; Brennan 2005; Clark *et al.* 2005). Da die Erkrankten sich oft zu spät beim Arzt vorstellen, liegt die Metastasierungsrate bei 25%, wobei häufig die Lunge betroffen ist (Lehnert 2003). Die Prognose für Weichteilsarkompatienten hängt entscheidend vom *Grading* des Primärtumors ab: bei gut differenzierten Tumoren tritt fünf Jahre nach abgeschlossener Behandlung bei 75% der Patienten keine erneute Krebserkrankung auf, bei mäßig differenzierten Tumoren bei 50% der Patienten und bei schlecht differenzierten Tumoren sind es nur 10-20% (Clark *et al.* 2005).

1.3 Bronchialkarzinom

Das Bronchialkarzinom ist mit 45000 Neuerkrankungen in Deutschland die häufigste Tumorerkrankung und 80% der Fälle sind auf Rauchen zurückzuführen (Pietsch 2006). Bronchialkarzinome werden in kleinzellige Karzinome und nicht kleinzellige Karzinome unterteilt. Zu den nicht kleinzelligen Karzinomen werden dabei die Adenokarzinome, die Plattenepithelkarzinome und die großzelligen Karzinome, sowie

Mischformen gezählt (Pietsch 2006). Der Verlust des kurzen Armes des Chromosoms 3 ist eine der ersten und häufigsten Veränderungen, die in der Entstehung von Lungenkrebs eine Rolle spielen und mehr als 90% der kleinzelligen Bronchialkarzinome und 50-80% der nicht kleinzelligen Bronchialkarzinome weisen diesen Verlust der Heterozygotie auf (Whang-Peng *et al.* 1982; Kok *et al.* 1997). Der Tumorsuppressor *RASSF1A* liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 (Dammann *et al.* 2000). Die epigenetische Inaktivierung des zweiten Allels in Zellen, in denen durch Deletion das erste Allel bereits inaktiviert vorliegt, kann zur vollständigen Reduktion der Expression und damit zur Tumorentstehung führen. Die Hypothese, dass durch zwei Ereignisse unabhängig voneinander beide Allele eines Tumorsuppressorgens ausgeschaltet werden, wird als *two hit hypothesis* beschrieben (Knudson 1971).

1.4 Epigenetische Inaktivierung

1.4.1 Epigenetische Inaktivierung als Ursache der Krebsentstehung

1.4.1.1 Allgemeine Aspekte

Neben der Veränderung durch Mutation oder Deletion von Genen wird zunehmend die Bedeutung der epigenetischen Inaktivierung von Genen bei Prozessen der Krebsentstehung klar. Epigenetisch inaktiviert wird zum einen durch Methylierung der Promoterregion eines Gens, zum anderen ist die Deacetylierung und Demethylierung bzw. Methylierung bestimmter Histone in den Nukleosomen von Bedeutung (Fraga and Esteller 2005). Die DNA Methylierung von Promotoren von Genen z.B. Tumorsuppressorgenen, die in normalen Zellen unmethyliert vorliegen, führt zur verminderten Genexpression und kann die Tumorentstehung bedingen (Jones and Baylin 2002). Aber auch die Hypomethylierung von Promoterregionen von transposablen Elementen wie LINE, die meist hypermethyliert vorliegen, kann aufgrund von höherer Aktivität dieser Retrotransposons zur Krebsentstehung führen (Neuhausen *et al.* 2006). Die Methylierung erfolgt dabei an Cytosinen im CpG Kontext. Als CpG Insel wird ein DNA Abschnitt bezeichnet, der zahlreiche CpGs beinhaltet und CG-reich ist (Bird 1986). Liegen CpG Inseln in Promoterregionen, so kann es zur Inaktivierung durch Methylierung der Cytosine kommen (Bird 1986). Transkriptionell aktive Gene sind also zum einen durch unmethylierte CpGs in der Promoterregion ausgezeichnet und zum anderen aber auch durch die Acetylierung der Histone H3 und H4 und die Methylierung des Histones H3 am K4, während transkriptionell inaktive Gene methylierte Cytosine im CpG Kontext, deacetylierte Histone H3 und H4 und eine Methylierung des Histons H3 an Position K9 tragen (Schulz 2005). Die Regulation dieser Acetylierungs- bzw. Methylierungsreaktionen ist komplex und wird von Enzymen wie Methyltransferasen, Methylasen, Histonacetyltransferasen und Histondeacetylase vermittelt (Ballestar and Esteller 2002; Schulz 2005). Epigenetische Prozesse sind wichtige, natürliche Regulationsmechanismen, die Abläufe des genomischen *Imprintings*, der X Chromosomeninaktivierung und der Genregulation vermitteln

(Schulz 2005). Die Stilllegung durch epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kann jedoch zur schweren Veränderung von Zellen führen und damit zur Erkrankung an Krebs. Da die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens auf einem Allel jedoch nicht zur Alteration führt, ist dieses Ereignis mit Mutation oder Deletion des zweiten Allels in der Krebsentstehung gekoppelt, beschrieben als *two hit hypothesis* (Knudson 1971). Dabei wurde gezeigt, dass epigenetische Inaktivierung einen relativ frühen Prozess in der Tumorigenese darstellt. Je nach betroffenem Gen können genetische Veränderungen und Mutationen daraus resultieren, so z.B. wenn ein DNA Reparaturgen epigenetisch inaktiviert ist (Baylin and Ohm 2006). Andererseits kann ebenso eine Mutation in einem Gen, das in einen bestimmten Signalweg involviert ist, oder auch in die Regulation der Methylierungsprozesse, grundlegende Veränderungen und vermehrte epigenetische Inaktivierung in der Zelle bewirken, die dann zur Tumorausbildung führen.

1.4.1.2 Tumorrelevante Kandidatengene

Ein häufig epigenetisch inaktiviertes Gen ist *CDKN2A*, dessen Genprodukt $p16^{\text{INK4A}}$ einen Inhibitor der CDK4 (*cyclin dependent kinase 4*) darstellt. Damit ist $p16^{\text{INK4A}}$ in der Lage, die Proliferation von Zellen im Übergang von der G_1 zur S-Phase zu inhibieren, den die CDK4 vermittelt (Schulz 2005). Die Inaktivierung von $p16^{\text{INK4A}}$ bewirkt somit eine unkontrollierte Proliferation der Zellen.

MSH2 (*mutS homologue 2*) und *MLH1* (*mutL homologue 1*) spielen in der DNA *mismatch* Reparatur eine entscheidende Rolle. Für die Erkennung von einzelnen Basenaustauschen sind die Proteine *MSH2* und *MSH6* (*mutS homologue 6*) und für die Erkennung von Insertions/Deletionsloops die Proteine *MSH2* und *MSH3* (*mutS homologue 3*) verantwortlich. In beiden Fällen werden *MLH1* und *PMS2* (*postmeiotic segregation increased 2*) rekrutiert, die Fehlerstelle wird repariert. Der Template DNA Strang wird wahrscheinlich dadurch erkannt, dass dieser zunächst methyliert vorliegt, so dass der fehlerhafte Tochterstrang repariert wird (Schulz 2005). Werden die Promotoren der Gene *MSH2* oder *MLH1* epigenetisch inaktiviert, so resultiert dies in einer verminderten Expression und Defekten in der DNA *mismatch* Reparatur.

ER α (*estrogen receptor α*) ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der durch Bindung von Östrogenen aktiviert und in den Kern transloziert wird. *ER α* bindet über Zinkfingermotivdomänen als Dimer an bestimmte DNA Abschnitte, die *estrogen-responsive elements*. Zwei *activation function* Domänen in *ER α* sind Transaktivatoren, wobei an AF2 der Ligand bindet, wovon auch die Aktivität von AF2 abhängt. Es folgt die Bindung von Koaktivatoren und die Initiation der Transkription. Ein weiterer Wirkmechanismus von *ER α* besteht in der Bindung und Modulation weiterer Transkriptionsfaktoren. *ER α* vermittelt und steuert hauptsächlich die Proliferation in reproduktiven weiblichen Geweben, wobei *ER α* auch in anderen Geweben exprimiert wird und hier wahrscheinlich eine andere Funktion vorliegt. Mit Tamoxifen kann die proliferative Wirkung von Östrogen in z.B. Brusttumoren inhibiert und damit das Tumorstromwachstum verhindert werden (Schulz 2005). Die epigenetische Inaktivierung

spielt hier insofern eine Rolle, als dass aus der Demethylierung der Promotoren des ER Gens eine verstärkte Expression resultieren kann, die zu einer stärkeren Stimulation der Proliferation und damit der Krebsentstehung führen kann.

1.4.2 Epigenetische Inaktivierung des Promoters von *RASSF1A*

RASSF1A ist ein epigenetisch inaktiviertes Tumorsuppressorgen. Wird der Promoter von *RASSF1A* hypermethyliert, so führt dies zum Expressionsverlust. Wird ein Allel epigenetisch inaktiviert und das andere zum Beispiel durch Deletion stillgelegt, kommt es zum vollständigen Funktionsverlust und die Veränderung der betroffenen Zelle zur Krebszelle erfolgt. Der Promoter des Gens *RASSF1A* wurde in zahlreichen Krebsentitäten analysiert und hohe Methylierungsfrequenzen wurden häufig detektiert (Dammann *et al.* 2005). Der Promoter des Transkriptes *RASSF1C* hingegen liegt nicht epigenetisch inaktiviert vor (Dammann *et al.* 2000). Die Methylierung des *RASSF1A* Promoters in Lungenkrebstumoren ist Gegenstand mehrerer Publikationen, Methylierungshäufigkeiten von 21% bis 71% wurden dabei beschrieben (Toyooka *et al.* 2001; Honorio *et al.* 2003; Dammann *et al.* 2005). So lag die Methylierungsfrequenz des Promoters von *RASSF1A* für nicht kleinzellige Lungenkarzinome bei 38%, während im kleinzelligen Lungenkarzinom eine Hypermethylierung in 79% der Fälle auftrat (Dammann *et al.* 2000; Dammann *et al.* 2001). In nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen konnte eine Korrelation zwischen einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten und der Hypermethylierung des *RASSF1A* Promoters festgestellt werden (Burbee *et al.* 2001; Kim *et al.* 2003). In Blasenkrebs lagen 35% bis 60% der untersuchten Primärtumore epigenetisch inaktiviert vor und die epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* war mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert (Lee *et al.* 2001; Maruyama *et al.* 2001; Chan *et al.* 2003; Dulaimi *et al.* 2004). Eine negative Korrelation zwischen Tumorstadium und Hypermethylierung des Promoters von *RASSF1A* wurde auch bei Speiseröhrenkrebs detektiert, wobei 52% der Tumore hypermethyliert vorlagen (Kuroki *et al.* 2003). *RASSF1A* wird häufig in Brustkrebs epigenetisch inaktiviert und Frequenzen von 23% bzw. 84% wurden bei der Untersuchung von Tumoren ermittelt (Fackler *et al.* 2003; Muller *et al.* 2003). In kolorektalen Tumoren konnte eine Assoziation zwischen *RASSF1A* Promotermethylierung und *K-RAS* Mutation gezeigt werden (van Engeland *et al.* 2002). Dabei lagen in Proben, die eine Hypermethylierung des *RASSF1A* Promoters aufwiesen, signifikant weniger häufig Mutationen in *K-RAS* vor (van Engeland *et al.* 2002). Dammann *et al.* zeigten ebenfalls eine inverse Korrelation zwischen Inaktivierung von *RASSF1A* und dem Vorkommen von Mutationen in *K-RAS* im Pankreaskarzinom (Dammann *et al.* 2003). Im Melanom wurde die Inaktivierung von *RASSF1A* mit einer zusätzlichen Mutation in den Genen *B-RAF* und *N-Ras* korreliert; ein synergistischer Effekt wurde postuliert (Reifenberger *et al.* 2004). In Schilddrüsenkrebs hingegen wurde eine inverse Korrelation zwischen Inaktivierung von *RASSF1A* und Mutation in *B-RAF* detektiert (Xing *et al.* 2004). Die genannten Methylierungshäufigkeiten stellen Beispiele dar. *RASSF1A* ist in sehr vielen

Tumoren inaktiviert und häufig besteht eine Korrelation zwischen dieser Hypermethylierung und einer schlechteren Prognose für Patienten sowie einem fortgeschrittenen Tumorstadium (Dammann *et al.* 2005). Die Detektion der epigenetischen Inaktivierung von *RASSF1A* gelingt immer häufiger auch aus Körperflüssigkeiten, wie Plasma, Urin, Brustwarzenaspirat oder Sputum (Chan *et al.* 2003; Honorio *et al.* 2003; Muller *et al.* 2003; Krassenstein *et al.* 2004). Diese Analysemethoden können von Bedeutung für eine schnelle Diagnose und damit für die Behandlung der Patienten sein.

1.5 Ziele der Arbeit

Die Reexpression von *RASSF1A* in der Tumorzelllinie A549 bewirkt eine Abnahme der Proliferation der Zellen (Dammann *et al.* 2000), induziert Apoptose und liegt in Zellen kolokalisiert zu Tubulin vor (Agathangelou *et al.* 2005). Im Rahmen dieser Arbeit sollte diese Proliferationshemmung und die Apoptoseinduktion durch den Tumorsuppressors *RASSF1A* näher untersucht werden. Durch gezielte Mutagenesen sollten Mutationen und Deletionen eingebracht werden und die funktionellen Veränderungen nach stabiler und transients Transfektion in humaner Zellkultur analysiert werden. Die Auswahl der zu mutagenisierenden Codons sollte aus funktionellen Gesichtspunkten erfolgen, aber auch bekannte Polymorphismen in *RASSF1A* sollten berücksichtigt werden. Es war von Interesse, funktionelle Veränderungen, hervorgerufen durch Mutationen oder Deletionen ausfindig zu machen, um Rückschlüsse auf funktionelle Einheiten von *RASSF1A*, die in Proliferation und Apoptosemechanismen entscheidend regulieren, zu identifizieren. Das Migrationsverhalten von Krebszellen ist von großer Bedeutung bei Metastasierungsprozessen. Die Auswirkungen der Reexpression von *RASSF1A* und veränderter Formen auf das Migrationsverhalten von A549 Zellen sollte analysiert werden. Die Veränderung der Lokalisation von *RASSF1A* nach Mutation und Deletion sollte zusätzlich untersucht werden. Die Domäne von *RASSF1A*, die für die Interaktion mit MST verantwortlich ist, sollte identifiziert werden, sowie Auswirkungen der Deletion eben dieser Domäne in *RASSF1A* auf Zellen. Dabei waren Proliferation, Apoptoseinduktion, die Lokalisation und Migrationsfähigkeit auch hier von Interesse.

Weiterhin war es Ziel, die epigenetische Inaktivierung durch Promoterhypermethylierung von verschiedenen tumorrelevanten Genen in primären Weichteilsarkomen zu untersuchen, um deren Rolle in der Weichteilsarkomentstehung genauer zu charakterisieren. Eingebunden wurden dabei die Gene *p16^{INK4A}*, *MSH2*, *MLH1*, *ER α* und *RASSF1A*. Um genauere Einblicke in den Mechanismus des *RASSF1A* Signalweges zu erlangen und den Einfluss epigenetischer Inaktivierung der Gene *MST1*, *MST2*, *WW45*, *LATS1* und *LATS2* auf die Tumorentstehung zu erhalten, sollte der Methylierungsstatus dieser Gene in Weichteilsarkomen und Lungenkarzinomen bestimmt werden.