

## 4 Diskussion

### 4.1 Epigenetische Inaktivierung

#### 4.1.1 Epigenetische Inaktivierung tumorrelevanter Gene in Weichteilsarkomen

Um die Rolle der Gene *MSH2*, *MLH1*, *p16*, *ERα* und *RASSF1A* in der Entwicklung von Weichteilsarkomen zu analysieren, wurden die Promotoren dieser Gene auf epigenetische Inaktivierung durch Methylierung in 84 Weichteilsarkomproben, darunter 22 Liposarkome, 18 Leiomyosarkome, 18 Maligne fibröse Histiocytozytome (MFH), 6 Rhabdomyosarkome, 6 neurogene Sarkome, 6 synoviale Sarkome, 3 Fibrosarkome, 3 maligne Hemangiopericytome, 1 malignes Mesotheliom und ein nicht klassifiziertes Sarkom, untersucht. Dabei wurden die Promoterregionen der Gene *p16*, *ERα* und *RASSF1A* mit MSP und die der Gene *MSH2* und *MLH1* mittels COBRA analysiert. Die Methylierungsfrequenzen lagen bei *MSH2* bei 0%, bei *MLH1* bei 9% *p16* bei 27%, bei *ERα* bei 76% und bei *RASSF1A* bei 20%, während in Normalgewebe bei *MSH2*, *MLH1* und *RASSF1A* keine Methylierung auftrat. Der Promoter von *p16* war jedoch in 22% der Normalgewebeproben methyliert und der des Gens *ERα* in 50% der Normalgewebe. Die niedrigen Methylierungshäufigkeiten der Promotoren der DNA Reparaturgene *MSH2* und *MLH1* deuten darauf hin, dass die epigenetische Inaktivierung dieser Gene keine entscheidende Bedeutung in der Weichteilsarkomentstehung hat. Das hier verwendete Probenmaterial war bereits in Western Blot Analysen auf die Expression von *MSH2* und *MLH1* untersucht worden, wobei bei 9 bzw. 7 der Weichteilsarkomproben eine reduzierte Expression von *MSH2* bzw. *MLH1* gezeigt wurde (Taubert *et al.* 2003). Die Abnahme der Expression dieser DNA Reparaturgene war mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert (Taubert *et al.* 2003). Keine der Proben, die im Western Blot eine verminderte Expression von *MLH1* aufwiesen, zeigten jedoch eine Methylierung der Promoterregion, so dass die verminderte Expression andere Ursachen haben musste, wie z.B. die posttranskriptionelle Inaktivierung oder Veränderungen der p53 Stabilität (Taubert *et al.* 2003). Sieben der Primärtumore, bei denen eine verminderte Expression von *MSH2* gefunden wurde, wurden auch auf Promoterhypermethylierung untersucht, es konnte jedoch keine Methylierung detektiert werden, so dass auch in diesem Falle ein anderer Mechanismus greifen muss. Kawaguchi *et al.* beschrieben eine verminderte Expression von *MLH1* und *MSH2* in 18% bzw. 8% der untersuchten Weichteilsarkome und zeigten eine Assoziation dieses Expressionsverlustes mit einer verstärkten Instabilität von Mikrosatelliten (Kawaguchi *et al.* 2005). In ASPS (*alveolar soft part sarcoma*) konnte ebenfalls keine epigenetische Inaktivierung der Promotoren von *MSH2* und *MLH1* gefunden werden, obwohl in einigen Fällen die Expression herabreguliert war (Saito *et al.* 2003). In dieser Studie resultierte der Expressionsverlust jedoch aus Mutationen in *MSH2* oder *MLH1* (Saito *et al.* 2003). In anderen Tumorarten, wie kolorektalen Tumoren und anderen Karzinomen, ist die Hypermethylierung von *MLH1* jedoch ein

häufiges Ereignis (Herman *et al.* 1998; Esteller *et al.* 2001; Grady *et al.* 2001). Die höhere Methylierungsfrequenz des Promoters von *p16* von 27% relativiert sich mit der Betrachtung des Methylierungsstatus in den Normalgewebeproben, der bei 22% lag. Die Methylierungsfrequenz bei *p16* entspricht in etwa der Rate der Inaktivierung, die in 14 von 42 (33%) der Weichteilsarkome in einer immunohistochemischen Analyse gefunden worden waren (Meye *et al.* 1998). Eine in der Literatur beschriebene Untersuchung in Leiomyosarkomen zeigte eine Hypermethylierung des *p16* Promoters in 22% der Fälle, während die Verminderung der Expression in 32% der Fälle zu verzeichnen war (Kawaguchi *et al.* 2003). Nur 53% der Proben, bei denen eine Herabregulation der Expression von *p16* zu verzeichnen war, trugen auch eine epigenetische Inaktivierung (Kawaguchi *et al.* 2003). Die Methylierungsfrequenz in Leiomyosarkomen lag in dieser Studie mit 25% in der gleichen Größenordnung, wie der im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Wert. Eine Assoziation der Promoterhypermethylierung bei *p16* mit einer schlechteren Prognose, wie von (Kawaguchi *et al.* 2003) detektiert, konnte jedoch nicht verzeichnet werden. Verglichen mit Normalgewebekontrollen, die keine Methylierung des *RASSF1A* Promoters aufwiesen, ist die Methylierungsfrequenz von *RASSF1A* mit 20% im Weichteilsarkom relativ hoch. Bei der Tumorigenese von Weichteilsarkomen ist die Inaktivierung von *RASSF1A* durch Promoterhypermethylierung somit von Bedeutung. Besonders in Leiomyosarkomen war die Promoterregion von *RASSF1A* signifikant häufiger methyliert, verglichen mit z.B. MFHs bzw. Liposarkomen. Die Inaktivierung von *RASSF1A* könnte also einen größeren Einfluss bei der Entstehung von Leiomyosarkomen haben. Zusätzlich bestand eine Assoziation zwischen *RASSF1A* Promoter Hypermethylierung und einer schlechten Prognose für die Patienten. War der *RASSF1A* Promoter hypermethyliert, so betrug die mittlere Überlebenszeit nur 22 Monate, während bei unmethyliertem *RASSF1A* Promoter die mittlere Überlebenszeit 58 Monate betrug. Auch im *Cox`proportional hazard regression model* war das Risiko für Personen, deren *RASSF1A* Promoter hypermethyliert war, signifikant erhöht. Diese Resultate bestätigen, dass die Inaktivierung von *RASSF1A* ein entscheidender Parameter bei der Entstehung und Progression von Weichteilsarkomen ist. Zu beachten ist dabei jedoch, dass lediglich Patienten mit Tumoren des Stadiums 2 und 3 berücksichtigt wurden, da Patienten des Tumorstadiums 1 noch nicht verstorben waren und die, mit Tumoren des Stadiums 4, aufgrund sehr hoher Metastasierung sehr schnell verstarben. Die Methylierungsfrequenz des Promoters von *ERα* in Normalgeweben (50%) verglichen mit der in primären Weichteilsarkomen (76%), zeigt einen Anstieg in den Sarkomen. Zu beachten ist dabei jedoch, dass *ERα* in reproduktiven weiblichen Geweben die Proliferation der Zellen steuert und gewebsspezifisch exprimiert wird (Li *et al.* 2003). Zu erwarten gewesen wäre eher die Hochregulation der Expression durch Hypomethylierung in der Promoterregion. Li *et al.* konnten die Expression von *ER* in Weichteilsarkomen häufig in Liposarkomen und MFHs detektieren, jedoch nicht in Leiomyosarkomen und synovialen Sarkomen, während weder das Alter noch das Geschlecht Einfluss auf die Expression hatten (Li *et al.* 2003). Eine ausführliche Analyse, von Kawaguchi *et al.*, von Promotermethylierungsmustern in

Weichteilsarkomen ergab für *RASSF1A* eine Frequenz von 26%, wobei keine Unterschiede zwischen MFH (31%) und Leiomyosarkomen (31%) gefunden worden sind (Kawaguchi *et al.* 2006). Die Methylierungshäufigkeiten lagen für *p16* und *MLH1* bei je 9%, für *MSH2* bei 8% und es konnten keinerlei Signifikanzen bestimmter häufiger vorkommender Methylierungen zwischen den Tumorentitäten gefunden werden (Kawaguchi *et al.* 2006). Unterschiede zwischen der Studie von Kawaguchi *et al.* und der vorliegenden Arbeit können aus der Verschiedenheit des Probenmaterials resultieren sowie aus relativ niedrigen Stichprobenzahlen.

Bei der Untersuchung des Methylierungsstatus des Promoters von *RASSF1A* konnte ermittelt werden, dass 4 von 5 Weichteilsarkomzelllinien eine epigenetische Inaktivierung des Gens zeigten, so auch die Rhabdomyosarkomzelllinien RD und A204. Primärtumoren der Entität Rhabdomyosarkom jedoch waren in 6 Fällen nicht methyliert, was für eine fortschreitende Methylierung in Zellkultur spricht. Ist die Hypermethylierung des Promoters für die Herabregulation der Expression des entsprechenden Gens verantwortlich, so kann die Expression wiederhergestellt werden, indem die Zelllinie mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin, einem Inhibitor der DNA-Methyltransferasen, behandelt wird und die Expression in RT-PCR Analysen ermittelt wird (Dammann *et al.* 2000). Die Rhabdomyosarkomzelllinie RD wurde auf diesem Weg behandelt und die Reexpression von *RASSF1A* nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung wurde gezeigt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Hypermethylierung in der Promoterregion von *RASSF1A* tatsächlich zu einem Expressions- und Funktionsverlust führt. Dieses Ergebnis wurde bestärkt durch die Analyse der *RASSF1A* Expression in den primären Weichteilsarkomen, die immer in den Fällen, in denen eine Promoterhypermethylierung detektiert worden war, auch eine Herabregulation der Expression zeigten (Siehe Primärtumore Nr. 54 oder 79 mit methyliertem Promoter verglichen zu Proben 35 und 76 mit unmethyliertem Promoter).

Die epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* in Weichteilsarkomen spielt eine entscheidende Rolle besonders bei Leiomyosarkomen, die Inaktivierung resultierte in einer Abnahme der Expression von *RASSF1A* und es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, deren Tumoren eine *RASSF1A* Promoterhypermethylierung aufwiesen, die Prognose schlechter ist.

#### **4.1.2 Epigenetische Inaktivierung der Gene *MST*, *WW45* und *LATS* in Weichteilsarkomen**

Die proapoptische Kinase *MST* wurde als Interaktionspartner von *RASSF1A* beschrieben (Khokhlatchev *et al.* 2002; Praskova *et al.* 2004). Es wurde auch gezeigt, dass *MST2* mit *WW45* interagiert und *LATS* zu phosphorylieren vermag (Chan *et al.* 2005). *MST*, *WW45* und *LATS* sollten somit in den gleichen Signalweg involviert sein wie *RASSF1A*. *RASSF1A* ist in Tumoren häufig epigenetisch inaktiviert (Dammann *et al.* 2005). So war es von Interesse, auch die epigenetische Inaktivierung der Promotoren der Gene *MST*, *WW45* und *LATS* zu untersuchen und auf sich ausschließende

Methylierungsereignisse zu analysieren. Dazu wurden die Promoterregionen dieser Gene in bis zu 60 Weichteilsarkomproben untersucht. Die Methylierungsfrequenz lag für *MST1* und *MST2* bei 37% bzw. 20% in 52 bzw. 60 analysierten Weichteilsarkomen. Dabei war auffällig, dass die Frequenz bei *MST2* im Vergleich zu *MST1* niedriger war, in Leiomyosarkomen war die Hypermethylierung des Promoters von *MST1* signifikant höher, verglichen mit *MST2* und auch die Promotermethylierung von *RASSF1A* war signifikant häufiger, verglichen mit der von *MST2*. Die Inaktivierung von *RASSF1A* und *MST2* könnten sich ausschließen. Das lässt den Rückschluss auf einen Zusammenhang im Wirkmechanismus zu. Die Analyse des Einflusses der Promoterhypermethylierung von *MST1* auf die Prognose für die Patienten mit Tumoren des Stadiums 2 und 3 ergab eine Assoziation. So ist die mittlere Überlebenszeit für Patienten mit methyliertem *MST1* Promoter mit 52 Monaten höher als bei Patienten, die keine Hypermethylierung tragen (Kaplan-Meier). Im *Cox`proportional hazard regression model* zeigte sich ein signifikant höheres Risiko für Patienten, deren Promoter nicht hypermethyliert vorlag. Da das Risiko für Patienten mit *RASSF1A* Methylierung erhöht und das für Patienten mit *MST1* Methylierung erniedrigt ist, könnte sich daraus auf eine antagonistische Wirkweise der beiden Proteine schließen lassen. Die Interaktion von *RASSF1A* mit *MST1* ist beschrieben (Khokhlathev *et al.* 2002). Praskova *et al.* postulierten, dass *RASSF1A* *MST1* gebunden im inaktiven Zustand hält (Praskova *et al.* 2004), das Fehlen von *RASSF1A* könnte zu Aktivierung von *MST1* führen. Eine Inaktivierung des *MST1* Promoters könnte die Expression von *MST1* erniedrigen und somit die gleiche Wirkung haben wie die Bindung durch *RASSF1A*. Für *WW45* konnte in 47 untersuchten Proben keine Methylierung gefunden werden. Aus der Literatur sind keinerlei Daten bekannt, die sich mit der epigenetischen Inaktivierung von *MST* und *WW45* befassen. Hisaoka *et al.* beschrieben sieben Weichteilsarkome mit reduzierter *LATS1* Expression und konnten in 6 der 7 Tumore eine Promoterhypermethylierung des *LATS1* Promoters zeigen (Hisaoka *et al.* 2002). Untersucht wurden dabei 50 Primärtumore, 1 MFH, 3 Liposarkome und 2 Leiomyosarkome waren epigenetisch inaktiviert (Hisaoka *et al.* 2002). Dies entspricht einer Rate von 12% (Hisaoka *et al.* 2002). Die Methylierungsfrequenz des Promoters von *LATS1*, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt wurde, entspricht mit 7% in etwa der Größenordnung, der von (Hisaoka *et al.* 2002) beschriebenen Rate. Die epigenetische Inaktivierung von *LATS1* hat für die Entwicklung von Weichteilsarkomen lediglich in einer geringeren Anzahl von Fällen entscheidenden Einfluss. Für den Promoter von *LATS2* wurde in keiner von 43 untersuchten Weichteilsarkomproben eine Hypermethylierung festgestellt. Dagegen wurden in 30 untersuchten Brusttumoren Methylierungshäufigkeiten von 57% für *LATS1* und 50% für *LATS2* detektiert, die signifikant mit der Abnahme der Expression einhergingen (Takahashi *et al.* 2005). Die epigenetische Inaktivierung von *LATS1* war dabei mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert (Takahashi *et al.* 2005). Die Analyse der epigenetischen Inaktivierung von *LATS* in anderen Tumorentitäten ist also von hohem Interesse.

### 4.1.3 Epigenetische Inaktivierung der Gene *MST*, *WW45* und *LATS* im Bronchialkarzinom

Untersucht wurden primäre Lungentumore, klassifiziert in Adenokarzinome, Plattenepithelzellkarzinome und großzellige Karzinome, die bereits auf die Promoterhypermethylierung des *RASSF1A* Promoters hin analysiert worden waren (Dammann *et al.* 2000). Wie im Weichteilsarkom war die Methylierungsfrequenz des Promoters von *MST1* (51%) höher verglichen mit der von *MST2* (21%). Der Promoter von *WW45* lag in den untersuchten Lungentumoren nicht epigenetisch inaktiviert vor. Der *LATS1* Promoter war mit 10% selten inaktiviert, wobei auffiel, dass es sich dabei fast ausschließlich um Adenokarzinome handelte. Mit 33% lag die Methylierungshäufigkeit des Promoters von *LATS2* in der Größenordnung der von *RASSF1A*. Signifikante Unterschiede der epigenetischen Inaktivierung in den unterschiedlichen Entitäten konnten nicht detektiert werden, auch ergaben sich keinerlei sich ausschließende Ereignisse, die Schlüsse auf funktionelle Zusammenhänge zulassen würden. Die epigenetische Inaktivierung von *MST1*, *RASSF1A* und *LATS2* wurde relativ häufig detektiert und kann bei der Entstehung von Lungenkrebs eine entscheidende Rolle spielen. Die Inaktivierung der *WW45* Expression stellt ein eher spätes Ereignis in der Tumorigenese dar, da sie in Primärtumoren nicht vorkommt, aber in 2 von 16 (13%) Lungenkrebszelllinien. In diesen Kleinzelllungenkrebszelllinien war ebenfalls der Methylierungszustand im *RASSF1A* Promoter zuvor analysiert worden und konnte in 100% der Fälle also in allen kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien detektiert werden (Dammann *et al.* 2000). Die *RASSF1A* Promoterhypermethylierung wurde damit als entscheidender und früher Parameter während der Tumorigenese von kleinzelligen Bronchialkarzinomen definiert (Dammann *et al.* 2000). 73% der untersuchten Zelllinien zeigten eine Hypermethylierung des Promoters von *MST1*, während die Methylierungsfrequenz für *MST2* und *LATS2* mit 35% bzw. 33% wesentlich geringer war. *LATS1* war in 47% der Fälle epigenetisch inaktiviert. Aus den Häufigkeiten auf die Rolle der Inaktivierung der Gene in der Tumorigenese geschlossen, könnte die Hypermethylierung des Promoters von *RASSF1A* als das früheste Ereignis einstufen werden, gefolgt von der Hypermethylierung der Promotoren von *MST1* und *LATS1*. Die epigenetische Inaktivierung von *MST2* und *LATS2* findet später in der Tumorentstehung statt, zumal eine Tendenz zu verzeichnen war, dass der Promoter von *MST2* nur dann methyliert vorlag, wenn auch der von *MST1* schon inaktiviert war. Sehr selten und ausschließlich in den kleinzelligen Lungenkrebszelllinien war der Promoter von *WW45* hypermethyliert. Das lässt den Schluss zu, dass diese Inaktivierung ein sehr spätes Ereignis in der Tumorentstehung ist oder möglicherweise eine Veränderung darstellt, die auf die Kultivierung der Zellen zurückzuführen sein könnte (Antequera *et al.* 1990).

## 4.2 Mutationsanalyse

### 4.2.1 *RASSF1A* Polymorphismus Codon 133

Der Promoter von *RASSF1A* liegt in Tumoren häufig epigenetisch inaktiviert vor (Dammann *et al.* 2005). Mutationen in *RASSF1A* wurden nur in einzelnen wenigen Fällen entdeckt, so z.B. die *missense* Mutationen Codon 129 (GAC-GAG; Asp-Glu) oder des Codons 135 (ATT-ACT; Ile-Thr) in kleinzelligen Bronchialkarzinomen, wobei die Expression durch Promotermethylierung jedoch aufgehoben war (Dammann *et al.* 2000). Unklar ist dabei, ob es sich um Polymorphismen handelt. Eine weitere Veränderung wurde in Codon 133 (GCT-TCT; Ala-Ser) detektiert (Burbee *et al.* 2001; Lo *et al.* 2001; Shivakumar *et al.* 2002). In einer Untersuchung von 178 Brustkrebstumoren wurde eine Assoziation zur Häufigkeit des Polymorphismus 133 gefunden (Schagdarsurengin *et al.* 2005). So trugen 21% von 141 Patienten mit Brustkarzinom und 24% von 37 Patienten mit Fibroadenom den Polymorphismus 133, während die Kontrollgruppe (n=70) nur zu 3% diesen Polymorphismus aufwies (Schagdarsurengin *et al.* 2005). Dies deutet auf einen funktionellen Einfluss dieses Polymorphismus hin, der bei der Krebsentstehung förderlich ist. Aus diesem Grunde wurden die Weichteilsarkomprimärtumore auf die Mutation im Codon 133 mittels SSCP analysiert. Von 69 untersuchten Primärtumoren trugen 8 (12%) den Polymorphismus im Codon 133, wobei die Häufigkeit bei Liposarkomen mit 27% zwar nicht signifikant, aber doch erhöht ist im Vergleich zu Leiomyosarkomen (6%). Die Methylierungshäufigkeiten nochmals betrachtet, zeigt sich, dass die Hypermethylierung des Promoters von *RASSF1A* bei Liposarkomen in 18% der Fälle und bei Leiomyosarkomen in 39% der Fälle auftrat. Es könnte angenommen werden, dass in Liposarkomen eher der Polymorphismus 133 in Prozesse der Krebsentstehung involviert ist, während in Leiomyosarkomen die epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* von Bedeutung ist. Die statistische Auswertung mit SPSS zeigte jedoch keine Assoziationen zwischen Promoterhypermethylierung und dem Auftreten des Polymorphismus im Codon 133. Schagdarsurengin *et al.* beschrieben für die untersuchte Kontrollgruppe eine Häufigkeit von 3% für das Auftreten des Polymorphismus des Codons 133 von *RASSF1A* (Schagdarsurengin *et al.* 2005). Mit 12% liegt der Wert bei Weichteilsarkompatienten höher und ein negativer Einfluss auf die Krebsentstehung bei Trägern des Polymorphismus ist zu verzeichnen.

### 4.2.2 Mutationsanalyse des Codons 600 von *B-RAF*

*B-RAF* ist eines von drei *RAF* Proteinen, die von aktivem *RAS* aus dem Zytoplasma rekrutiert und aktiviert werden. Aktiviertes *RAF* ist das erste Element der Protein-Phosphorylierungs-Kaskade, die zur Aktivierung von *MEK* und *ERK* führt (Schulz 2005). Einige Publikationen beschrieben eine negative Assoziation von Promoterhypermethylierung von *RASSF1A* mit Mutation des Codons 600 in *B-RAF*. So wurde gezeigt, dass sich die Promoterhypermethylierung von *RASSF1A* und die

Mutation des Codons 600 in *B-RAF* in papillärem Schilddrüsenkrebs ausschließen (Xing *et al.* 2004; Hoque *et al.* 2005). Eine ähnliche Assoziation wurde für Schilddrüsenkrebszelllinien gezeigt (Xing *et al.* 2004). Eine weitere negative Assoziation wurde auch für Gebärmutterkarzinome beschrieben (Kang *et al.* 2006). Da sich diese Ereignisse ausschließen, kann davon ausgegangen werden, dass beide Proteine, B-RAF und RASSF1A, im selben Signalweg eine Rolle spielen. In Melanoma wurde jedoch eine positive Assoziation beider Ereignisse gefunden, die Hypermethylierung des Promoters von *RASSF1A* trat bei gleichzeitiger Mutation von *B-RAF* gehäuft auf (Reifenberger *et al.* 2004). Hier wurden 84 Weichteilsarkome auf Mutation des Codons 600 in B-RAF untersucht, nur in vier Fällen (5%) konnte diese genetische Veränderung detektiert werden. Betroffen waren dabei ein Liposarkom, zwei Rhabdomyosarkome und ein MFH, wobei drei der Tumore keine Methylierung des *RASSF1A* Promoters trugen, ein Rhabdomyosarkom jedoch methyliert vorlag. Somit handelt es sich nicht um sich ausschließende Ereignisse, wobei die Stichprobenzahlen sehr gering sind. Zwei der Primärtumore mit *B-RAF* Mutation wurden auf hypermethylierten *MST1* Promoter untersucht und waren positiv. Die Mutation von *B-RAF* im Codon 600 ist selten in der Entstehung von Weichteilsarkomen und spielt eine untergeordnete Rolle.

#### 4.2.3 Mutationsanalyse des Codons 12 von *K-RAS*

*K-RAS* ist ein Mitglied der RAS Familie der monomeren G-Proteine (Friday and Adjei 2005). Es liegt in der Zelle membranassoziiert vor und vermittelt die Signalweitergabe von den Rezeptorthyrosinkinasen zu den Effektoren, wie z.B. RAF, Phosphoinositol-3-Kinase und RalGEFs (Friday and Adjei 2005). Zelluläre Prozesse, wie Differenzierung, Zellwachstum und Überleben werden über *K-RAS* reguliert (Friday and Adjei 2005). Mutationen in RAS treten in 30% aller Krebsfälle auf. *K-RAS* ist dabei recht häufig betroffen, besonders in Pankreaskrebs, bei dem Mutationshäufigkeiten von bis zu 90% detektiert wurden (Dergham *et al.* 1997; Wang *et al.* 2002). Die Bedeutung der Mutation des Codons 12 des Gens *K-RAS* bei der Krebsentstehung von Weichteilsarkomen sollte untersucht werden. Dazu wurden 34 primäre Weichteilsarkome und 4 Weichteilsarkomzelllinien auf Mutation des Codons 12 in *K-RAS* mittels SSCP untersucht. Es wurde in keinem der Fälle eine Mutation gefunden. In einigen Tumorarten wurde eine Assoziation zwischen *K-RAS* Mutation und Methylierung des *RASSF1A* Promoters belegt, so z.B. im Pankreaskarzinom (Dammann *et al.* 2003). Dabei zeigte sich in Adenokarzinomen des Pankreas eine signifikante negative Korrelation zwischen *K-RAS* Mutation und Hypermethylierung des *RASSF1A* Promoters (Dammann *et al.* 2003). Dass *RASSF1A* und *K-RAS* in die selben Signaltransduktionswege involviert zu sein scheinen, zeigt nicht nur diese negative Korrelation, sondern auch Interaktionsstudien, die die direkte Interaktion beider Proteine, bzw. über das *K-RAS* bindende zu *RASSF1A* homologe Protein *NORE1* darstellten (Ortiz-Vega *et al.* 2002; Vos *et al.* 2004). In nichtkleinzelligen Lungenkrebstumoren wurde wiederum keine Korrelation von *K-RAS* Mutation zur

*RASSF1A* Hypermethylierung gefunden (Ramirez *et al.* 2003). Mutationen im Gen *K-RAS* sind somit in einigen Tumorarten häufiger und von Bedeutung, während in der Entstehung anderer Tumorarten, wie z.B. bei Weichteilsarkomen andere Mechanismen wirken.

### 4.3 Funktion von RASSF1

Der Tumorsuppressor RASSF1A liegt in zahlreichen Tumorentitäten epigenetisch inaktiviert vor (Dammann *et al.* 2005). Die Reexpression von RASSF1A in der Lungenkrebszelllinie A549 führt zur Hemmung der Proliferation und in Nacktmäusen zeigen Tumore, die RASSF1A reexprimieren ein stark reduziertes Tumorstadium (Dammann *et al.* 2000; Burbee *et al.* 2001; Kuzmin *et al.* 2002; Rong *et al.* 2004). Anhaltspunkte zur Funktion von RASSF1A liegen bereits vor, doch die genaue Funktionsweise und betroffene Signalkaskaden gilt es nach wie vor aufzuklären. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit die Transkripte RASSF1A, RASSF1C und RASSF1F und mutierte Formen von RASSF1A und RASSF1C eingesetzt, um funktionelle Aussagen treffen zu können.

Es wurden zunächst drei Transkripte des Gens *RASSF1* untersucht, RASSF1A, RASSF1C und RASSF1F. RASSF1A und RASSF1F werden vom Promoter A, RASSF1C vom Promoter C transkribiert. RASSF1C fehlt die C1 Domäne des N-Terminus von RASSF1A, während RASSF1F lediglich genau diese Domäne codiert. In Lungentumoren wurde häufig eine Hypermethylierung des Promoters A, jedoch nie eine epigenetische Inaktivierung des Promoters C detektiert (Dammann *et al.* 2000). Daraus kann geschlossen werden, dass die Inaktivierung von RASSF1A, nicht aber die von RASSF1C zur Krebsentstehung beiträgt. Die Auswirkung der Reexpression von RASSF1A, RASSF1F und der Überexpression von RASSF1C wurde in der Kleinzelllungenkrebszelllinie A549 untersucht. Proliferation, Koloniebildung und Migration wurden dabei in stabil transfizierten Zellen analysiert, während die Induktion von Apoptose sowie die Lokalisation in transient exprimierenden Zellen untersucht wurden. In HEK293 wurden Lokalisationsuntersuchungen und Interaktionsuntersuchungen nach transients Expression durchgeführt.

Zur Analyse der Funktion von RASSF1A wurden gerichtete Mutagenesen in der Sequenz erzeugt, die einzelne Aminosäuren veränderten bzw. ganze Domänen deletiert. Ausgewählt wurden die Aminosäuren nach Aspekten der Funktion. So wurden z.B. Aminosäuren ausgetauscht, die in der C1 Domäne essentiell für die Komplexierung von Zink sein könnten, wie die Histidine der Codons 52 und 90. Die Mutation des Codons 53 war in der Literatur (Burbee *et al.* 2001) als Polymorphismus beschrieben und funktionelle Auswirkungen galt es zu analysieren. Die Mutagenesen der Codons 131, 132, 133 und 203 betreffen Phosphorylierungsstellen (Serin 131 und Serin 203) bzw. umgebende Aminosäuren, die die Phosphorylierung beeinträchtigen können. Die Phosphorylierung des Serins 131 wurde *in vitro* beschrieben (Shivakumar *et al.* 2002), die Folgen einer Mutation des Serins beziehungsweise der benachbarten Aminosäure



auf die Proliferation und andere funktionelle Aspekte sollte untersucht werden. Bei der Veränderung im Codon 133 handelt es sich um einen natürlich vorkommenden Polymorphismus, von dem gezeigt wurde, dass er, verglichen mit einer Kontrollpopulation, signifikant häufiger in Brustkrebspatienten vorkommt (Schagdarsuregin *et al.* 2005). Die funktionellen Auswirkungen sind jedoch noch unbekannt. Die Phosphorylierungsstelle Codon 203 in *RASSF1A* wurde von Matthias Rastetter im Rahmen seiner Promotionsarbeit in der AG Tumorgenetik entdeckt (Rastetter 2006). Von Interesse ist auch in diesem Fall, zu welchen funktionellen Veränderungen die Phosphorylierung führt. Mutationen in der RA Domäne könnten zur Veränderung der Interaktion von RASSF1A mit RAS führen. Die Polymorphismen der Codons 246 und 257 von *RASSF1A* wurden in Brustkrebstumoren gefunden (Agathangelou *et al.* 2001). Die Mutagenesen wurden in dem Vektor pCMV-Tag1 durchgeführt, nach transienter und stabiler Transfektion in humanen Zellen kommt es zur Expression des enthaltenen Konstruktes. Die Lokalisation von RASSF1A, RASSF1C und den mutierten bzw. deletierten Varianten wurde durch Expression als YFP-Fusionsprotein analysiert. Die Generierung stabil exprimierender Zellen erfolgte in der Lungenkrebszelllinie A549, die aufgrund einer Promoterhypermethylierung nur eine sehr schwache endogene Expression von RASSF1A aufweist. Die stabilen Klone wurden für die Analyse der Proliferation, der Koloniebildung und der Migration eingesetzt. In A549 liegt keine Hypermethylierung der Promotoren der Gene *MST*, *WW45* und *LATS* vor. Versuche, die Rhabdomyosarkomzelllinie RD stabil zu transfizieren schlugen fehl. Die Klone exprimierten die jeweiligen Transkripte nur über wenige Zellkulturpassagen. Die Apoptose- sowie die Lokalisationsuntersuchungen erfolgten nach transienter Expression in HEK293 und A549. Die Fusionsproteine für die Interaktionsstudien wurden in HEK293 exprimiert. HEK293 exprimiert endogenes RASSF1A, der Promoter liegt nicht hypermethyliert vor.

#### **4.3.1 Funktionelle Unterschiede der Transkripte RASSF1A, RASSF1C und RASSF1F**

Die Transkripte RASSF1A und RASSF1F werden vom Promoter A des Genes RASSF1, das Transkript RASSF1C vom Promoter C abgelesen, lediglich die epigenetische Inaktivierung des Promoters A spielt jedoch in der Krebsentstehung eine Rolle, der Promoter C liegt nicht hypermethyliert vor. Der Unterschied der Transkripte RASSF1A und RASSF1C liegt im N-Terminus, der in RASSF1A für eine C1/Diacylglycerol-Bindedomäne codiert, die im Transkript RASSF1C fehlt (Dammann *et al.* 2000). Beide Proteine tragen C-Terminus die Ras Assoziationsdomäne und in der Proteinmitte die ATM Domäne. Da RASSF1C in Gegensatz zu RASSF1A kein Tumorsuppressor ist, kann davon ausgegangen werden, dass die in RASSF1C fehlende C1 Domäne des Proteins RASSF1A die tumorsuppressive Funktion auslösen müsste. Das Transkript RASSF1F beinhaltet lediglich diese C1 Domäne, die RA und die ATM Domäne fehlen, wodurch eine mögliche Aktivierung über Ras bzw. Ras-NORE1 nicht

stattfinden könnte. Die Signalvermittlung über die im C-Terminus gelegene SARAH Domäne kann nur bei RASSF1A bzw. bei RASSF1C erfolgen.

Das Wachstum von stabil transfizierten A549 Klonen, die RASSF1A bzw. RASSF1F reexprimieren oder RASSF1C überexprimieren, untereinander verglichen, zeigt sich, dass die Proliferation bei Reexpression von RASSF1A und RASSF1F vermindert ist, verglichen mit der Vektorkontrolle und Zellen, die RASSF1C überexprimieren. Ein ähnlichen Ergebnis erbrachte der Koloniebildungstest im weichen Agar, also ohne Zell-Zell-Kontakte, bei dem die Koloniegrößen von RASSF1C exprimierenden Zellen mit denen der Vektorkontrolle vergleichbar waren, während bei Reexpression von RASSF1A oder RASSF1F eine verminderte Koloniegröße festgestellt wurde. Die Abnahme der Proliferation und der Koloniebildung war bereits von Dammann *et al.* beschrieben worden (Dammann *et al.* 2000) und konnte hier in A549 bestätigt werden. Die verminderte Proliferation und Koloniebildung der RASSF1A bildenden Zellen könnte aus einer verstärkten Apoptoserate dieser Zellen resultieren, da die TUNEL Experimente eine erhöhte Apoptoserate der RASSF1A exprimierenden Zellen nach transients Transfektion zeigten. In der Literatur wurden verschiedene Zelllinien bzw. deren Reaktion auf die RASSF1A Reexpression beschrieben. Apoptose wurde in NIH 3T3, in MCF7 und 293T Zellen induziert, nachdem RASSF1A exprimiert wurde (Vos *et al.* 2000; Rong *et al.* 2004). In der Zelllinie WM9, die RASSF1A endogen exprimiert, wurde die Apoptose nach Zugabe von Interferon induziert, während dies in den Zelllinien ACHN, SK-RC-45RCC und A375 nur bei gleichzeitiger Behandlung mit Methyltransferasehemmern und einhergehender Reexpression von RASSF1A zu beobachten war (Reu *et al.* 2006). Die Induktion der Apoptose durch RASSF1A scheint abhängig von genomischen Veränderungen der Zelllinien zu sein. Möglich wäre die Vermutung, dass die Reexpression von RASSF1A nur dann apoptotische Reaktionen auslöst, wenn die Inaktivierung von RASSF1A entscheidend zu Tumorigenese der jeweiligen Zelllinie beigetragen hat. Die Apoptoserate bei Überexpression von RASSF1C lag wesentlich niedriger, als die bei Überexpression von RASSF1A. Obwohl auch die Expression von RASSF1F zu einer reduzierten Proliferation und kleineren Kolonien im weichen Agar führte, war die Induktion der Apoptose nach transients Transfektion jedoch wesentlich geringer. Eine mögliche Erklärung bietet die fehlende SARAH Domäne, die die Interaktion mit der proapoptotischen Kinase MST vermittelt. Doch diese Domäne ist auch bei RASSF1C vorhanden, so dass zusätzlich zur SARAH Domäne auch die C1 Domäne in der Vermittlung der Apoptose eine Rolle spielen sollte. Hefe-2-Hybrid Daten der Gruppe AG Tumorgenetik konnten zeigen, dass MST1 stärker an RASSF1A als an RASSF1C bindet (Daten nicht gezeigt). RASSF1A interagiert über den N-Terminus mit dem Protein NORE1 (*novel RAS effector 1*, RASSF5) (Ortiz-Vega *et al.* 2002). Es wäre vorstellbar, dass auch RASSF1F mit NORE1 interagiert oder mit RASSF1A homodimerisiert und so regulatorisch in die Signalvermittlung involviert sein könnte und die Hemmung der Proliferation vermitteln könnte.

Es wurde bereits beschrieben, dass bei Überexpression von RASSF1A Zellen schwächer migrieren und die Herabregulation der Expression durch si-RNA zur Verstärkung der Migrationsfähigkeit führt (Dallol *et al.* 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Migrationsgeschwindigkeit von RASSF1A stabil exprimierenden Zellen und der Vektorkontrollzellen untersucht. Die Migrationsfähigkeit RASSF1A exprimierender Zellen war auch in diesen Experimenten reduziert, verglichen mit der Vektorkontrolle. Auf die Tumorigenese bezogen, ist die Migrationsfähigkeit von Krebszellen von enormer Bedeutung, da Zellen die stärker durch eine künstliche Kollagenmatrix migrieren, im menschlichen Körper auch schneller metastasieren könnten. Die Metastasierung von Tumoren ist ein entscheidender Parameter für den Verlauf und die Prognose einer Krebserkrankung. Das Fehlen von RASSF1A würde somit zur schnelleren Metastasierung und schlechteren Verlauf der Krebserkrankung beitragen.

RASSF1A liegt als GFP-Fusionsprotein zytoskelettassoziiert vor und ist während der Mitose an den Spindelpolen und Spindelfasern kolokalisiert (Liu *et al.* 2003; Dallol *et al.* 2004; Rong *et al.* 2004; Vos *et al.* 2004). Auch das Protein RASSF1C ist kolokalisiert zu Mikrotubuli, wobei hier eine Tendenz zur stärkeren Lokalisation an Centrosome zu erkennen war. Da die Tubulinassoziation für die Domänen ATM und RA beschrieben ist (Liu *et al.* 2003; Rong *et al.* 2004), ist es nicht verwunderlich, dass RASSF1F, das lediglich die C1 Domäne trägt, keine Tubulinassoziation aufweist. Wird es als YFP-Protein überexprimiert bilden sich vakuolenartige Bereiche im Zytoplasma, die das fluoreszierende Protein enthalten. RASSF1A und RASSF1C stabilisieren zum einen Zytoskelettstrukturen in A549 Zellen und zum anderen Spindelpolfasern in mitotischen HEK293 Zellen, werden diese mit Nocodazol behandelt. Der stabilisierende Effekt war von Rong *et al.* Für die Überexpression von GFP-RASSF1A in MCF-7 Zellen und in MEFs bereits beschrieben (Liu *et al.* 2003; Rong *et al.* 2004). Beide Proteine RASSF1A und RASSF1C sind tubulinassoziiert, die Lokalisation bedingt also keine funktionellen Unterschiede. Dabei ist jedoch zu vermerken, dass RASSF1C verstärkt zu den Centrosomen kolokalisiert vorliegt und sich daraus ein Funktionsunterschied ergeben könnte. Die Mitoserate nach Expression von YFP-RASSF1A in HEK293 ist wesentlich höher, verglichen zur Mitoserate nach Expression von YFP-RASSF1C (Daten nicht gezeigt). Diese Tatsache spricht für einen Arrest in der Prometaphase bei Überexpression von RASSF1A. Dies würde eventuell dem von (Rong *et al.* 2004) beschriebenen Arrest in der G<sub>2</sub>-M-Phase entsprechen, der dort nach 72 h Überexpression verzeichnet wurde. RASSF1A könnte so einen Arrest induzieren, nicht aber RASSF1C. Auch Song *et al.* konnten einen Arrest der Mitose im Übergang von der G<sub>2</sub> zur M-Phase detektieren und führten dies auf die Interaktion von RASSF1A mit CDC20 zurück (Song *et al.* 2005). Es wurde in diesem Zusammenhang sogar von RASSF1A als neuem Hüter der Mitose gesprochen (Mathe 2004). In Präzipitationsexperimenten wurde die Interaktion von RASSF1A mit CDC20 im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert, konnte aber nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Endogenes RASSF1 könnte in wesentlich weniger Kopien in Zellen

natürlich vorkommen, oder sogar lediglich in bestimmten Zellzyklusphasen exprimiert oder aktiviert werden. Die YFP-Fusionsproteine liegen jedoch stark überexprimiert in den Zellen vor. Die Analyse von endogenem RASSF1 gestaltet sich recht schwierig, da zuverlässige Antikörper noch nicht auf dem Markt sind.

Paclitaxel verhindert in mitotischen Zellen den Abbau der Spindeln, so dass die Zelle in der Mitose arretiert wird (Jordan *et al.* 1993). Werden stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1F exprimierende A549 Zellen einer Behandlung mit Paclitaxel unterzogen, so zeigen die RASSF1F exprimierenden Zellen eine deutlich höhere apoptotische Rate verglichen mit RASSF1C, das wiederum höhere Apoptoseraten aufweist als RASSF1A exprimierende Zellen. Wird RASSF1A exprimiert, so gehen weniger Zellen in Apoptose, woraus geschlossen werden kann, dass RASSF1A den Tubulinabbau fördern könnte oder in die Signalvermittlung zur Induktion von Apoptose eingreift. Möglich ist auch, dass die sehr stabile Bindung von RASSF1A an die Mikrotubuli ein Angreifen von Paclitaxel verhindert, eine Kompetition könnte vorliegen. Liu *et al.* beschrieben, dass die Mitosen in COS Zellen nach Überexpression von GFP-RASSF1A denen von Paclitaxel behandelten Zellen ähneln und dass eine ähnliche Wirkweise denkbar sei (Liu *et al.* 2003). Paclitaxel wird als Chemotherapeutikum in der Behandlung von z.B. Brustkrebs und bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen eingesetzt. Der RASSF1 Expressionstatus in einem Tumor könnte also Folgen für die Wirksamkeit der Chemotherapie haben.

Die Interaktion von RASSF1A mit der proapoptischen Kinase MST1 wurde bereits beschrieben (Khokhlathev *et al.* 2002). RASSF1A interagiert ebenfalls mit MST2 und auch RASSF1C interagiert sowohl mit MST1 als auch mit MST2. Diese Interaktion erfolgt über die SARAH Proteininteraktionsdomäne. Beide Proteine könnten also in von MST vermittelten Mechanismen der Apoptoseregulation eingebunden sein. Da jedoch lediglich RASSF1A als Tumorsuppressor gilt, sollte die C1 Domäne in diesem Regulationsprozess eine gesonderte Rolle wahrnehmen. RASSF1F besitzt keine SARAH Domäne, so dass eine Interaktion mit MST nicht möglich ist.

#### **4.3.2 Funktion der C1 Domäne von RASSF1A**

In funktionellen Untersuchungen sollten die Proteine RASSF1A, RASSF1C, das keine C1 Domäne besitzt und in der C1 Domäne mutagenisierte Formen von RASSF1A auf unterschiedliche Auswirkungen nach stabiler Expression in A549 und transienter Expression in HEK293 hin, analysiert werden. Die C1 Domäne von RASSF1A (Aminosäuren 51-101) ist homolog zu der der Protein Kinasen C, bei denen eine Bindung von Diacylglycerol die Translokation der PKC zur Zellmembran bewirkt (Newton 1995). Enthalten ist ein Zinkfingermotiv, das für die Komplexierung von Zink verantwortlich ist und Einfluss auf die Fähigkeit Phorbolster zu binden hat (Ahmed *et al.* 1991). Einige funktionelle Daten, die C1 Domäne betreffend sind bereits bekannt, so z.B. die Tatsache, dass die Mutation des Codons 65 (C zu R) dazu führt, dass das Protein nicht mehr tubulinassoziiert vorliegt (Dallol *et al.* 2004), woraus sich aber der

Widerspruch ergibt, dass RASSF1C, das keine C1 Domäne trägt, auch tubulinassoziiert vorliegt und die Tubulinassoziation der ATM-RA Domäne zugeordnet wird (Liu *et al.* 2003; Rong *et al.* 2004). Die Homodimerisierung von RASSF1A mit NORE1 erfolgt über den N-Terminus von RASSF1A (AS1-119), (Ortiz-Vega *et al.* 2002), die indirekte Bindung von RASSF1A an RAS über den Interaktionspartner NORE1 sollte bei nicht funktioneller C1 Domäne eingeschränkt oder verhindert sein. Ebenfalls über den N-Terminus interagiert RASSF1A mit CDC20 und inhibiert damit die Wirkung des APC-CDC20 Komplexes und damit den Übergang von der Prometaphase zur Mitose (Song *et al.* 2004). Die Mutation des Codons 65 (C zu R) bewirkt zusätzlich, dass RASSF1A nicht mit MAP1/MOAP1 interagieren kann, woraus folgt, dass Bax nicht aktiviert werden kann, woraus wiederum die verminderte Fähigkeit Apoptose zu induzieren resultiert (Vos *et al.* 2006).

Die C1 Domäne von RASSF1A besitzt auch Ähnlichkeit zur LIM (*Zinc-binding domain present in LIN-11, ISL1, MEC-3*) Domäne, die z.B die Interaktion von LATS mit Ajuba bzw. Zyxin vermittelt und ebenfalls ein Zinkfingermotiv darstellt (Hirota *et al.* 2000; Abe *et al.* 2006). Die Interaktion von LATS mit MST bzw. WW45 konnte nicht gezeigt werden (Chan *et al.* 2005), könnte jedoch durch RASSF1A vermittelt werden. Im Drosophila Signalweg interagieren Sav, Hippo und Warts direkt miteinander (Tapon *et al.* 2002; Harvey *et al.* 2003; Wu *et al.* 2003). Zwei Interaktionspartner von LATS1 bzw. LATS2, Ajuba und Zyxin, besitzen LIM Domänen (Hirota *et al.* 2000; Abe *et al.* 2006). In Ajuba ist eine LIM Domäne für die Interaktion mit LATS2 und in Zyxin sind zwei von drei vorhandenen LIM Domänen für die Bindung von LATS1 essenziell (Hirota *et al.* 2000; Abe *et al.* 2006). Beim Vergleich der C1 Domäne von RASSF1A mit den LIM Domänen der LATS Interaktionsproteine (Abbildung 43), zeigt sich, dass Homologie besteht und es denkbar wäre, dass auch RASSF1A mit LATS zu interagieren vermag. Bei der LIM Domäne handelt es sich um eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne bestehend aus zwei Zinkfingermotiven (Kadmas and Beckerle 2004).

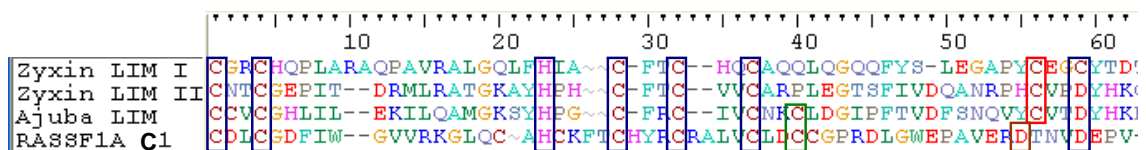


Abbildung 43. Vergleich der LIM Domänen der LATS bindenden Proteine Zyxin (LIM I und LIM II, die beide essentiell für die LATS Bindung sind und Ajuba (LIM) mit der C1 Domäne von RASSF1A. Die Zinkfinger motive der LIM Domänen und der C1 Domäne bestehen aus Cysteinen und Histidinen (blaue Balken) in bestimmten 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.

Folgende Struktur wurde für die LIM Domäne postuliert:  $\mathbf{CX}_2\mathbf{CX}_{15-23}(\mathbf{H}/\mathbf{C})(\mathbf{X})_{2/4}(\mathbf{C}/\mathbf{H}/\mathbf{E})(\mathbf{X})_2\mathbf{CX}_2\mathbf{C}(\mathbf{X})_{14-21}(\mathbf{C}/\mathbf{H})(\mathbf{X})_{2/1/3}(\mathbf{C}/\mathbf{H}/\mathbf{D}/\mathbf{E})\mathbf{X}$  (Kadmas and Beckerle 2004). Auffallend bei der RASSF1A Sequenz ist das Fehlen der 7. komplexierenden Aminosäure (Position 56, Abbildung 43), es ist weder ein Cystein noch ein Histidin in dieser Position vorhanden. Die komplexierende Funktion könnte

das Aspartat an Position 55 übernehmen. Ein funktioneller Zusammenhang zu RASSF1 ist denkbar, da auch LATS1 und LATS2 während der Mitose am Centrosom und am Spindelapparat lokalisiert vorliegen und Prozesse der Mitose z.B. durch Rekrutieren von  $\gamma$ -Tubulin durch den LATS2-Ajuba Komplex, regulieren sollen (Hirota *et al.* 2000; Abe *et al.* 2006). Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Interaktionspartner von RASSF1 MST, LATS phosphoryliert, aber MST und LATS binden einander nicht (Chan *et al.* 2005).

Die Analyse der stabil transfizierten A549 Klone im Rahmen der vorliegenden Arbeit, die eine RASSF1A Variante exprimierten, die eine Mutation in der C1 Domäne von RASSF1A trugen, zeigte, dass diese Veränderung die proliferationshemmende Wirkung, die RASSF1A verglichen zu RASSF1C bewirkt, aufhebt. Die Klone mit den Mutationen in den Codons 52 und 53 wuchsen schneller als RASSF1C transfizierte Klone. Kein Unterschied war zu verzeichnen zwischen den Ansätzen, die 0,6  $\mu$ M bzw. 5  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M Zinkionen enthielten. Mögliche Ursache ist, dass 0,6  $\mu$ M Zinkionen schon ausreichend waren, um eine Besetzung der Zinkfinger zu gewährleisten. Ein leichter Anstieg der Proliferation wurde auch im weichen Agar deutlich, wo die mittlere Koloniegröße nach Mutation im Codon 53 höher war, als im Ansatz RASSF1A, aber niedriger verglichen mit RASSF1C. Eine Erklärung bietet der Zusammenhang zur Apoptoserate. Die Apoptoserate nach transienter Expression von RASSF1A lag mit 21% deutlich höher im Vergleich zu RASSF1AMut53, die mit 15% niedriger als die Vektorkontrolle lag. Das heißt, die Fähigkeit, Apoptose zu induzieren ist vermindert, so dass eine Verstärkung der Proliferation resultierte. Diese Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Daten über die Interaktion von MAP1/MOAP1 mit RASSF1A überein. Gezeigt wurde dabei, dass nach Mutation des Codons 65 RASSF1A nicht mehr mit MAP1/MOAP1 interagiert, so dass dieses nicht aktiviert wird und die über Bax induzierte Apoptose nicht ausgelöst werden kann (Vos *et al.* 2006). Eine Mutation im Codon 53 könnte eine ähnliche Folge haben, da es in der gleichen Proteininteraktionsdomäne lokalisiert vorliegt. Auch die Interaktion von RASSF1A mit CDC20 soll über den N-Terminus von RASSF1A erfolgen (Song and Lim 2004). In diesem Falle könnte nach Mutation in der C1 Domäne die Bindung abgeschwächt sein und somit kein durch APC vermittelter Mitosearrest erfolgen, resultierend in einer beobachteten, verstärkten Proliferation.

Die Interaktion von RASSF1A mit dem Homologen NORE1 erfolgt ebenso über den N-Terminus von RASSF1A (Ortiz-Vega *et al.* 2002). Es wurde von Ortiz-Vega *et al.* postuliert, dass die Aktivierung von RASSF1A nur über die Interaktion mit NORE1 erfolgen kann (Ortiz-Vega *et al.* 2002). In einem solchen Falle, könnten Veränderungen im N-Terminus von RASSF1A auch zur Verhinderung der upstream Aktivierung durch RAS führen.

### 4.3.3 Funktion der ATM Domäne von RASSF1

Die Funktion der ATM Domäne des Proteins RASSF1A sollte im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden. Dazu wurde das Serin an Position 131 sowie die Codons 132 und 133 in unmittelbarer Nähe mutagenisiert, um mögliche Auswirkungen auf Proliferation, Migration, Koloniebildung und Lokalisation nach Einfügen dieser Veränderungen zu analysieren.

ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) ist ein Mitglied der *Phosphatidylinositol 3-Kinase like* Familie von Serin/Threonin Proteinkinase (Ball and Xiao 2005). Die ATM wird in Folge der Entstehung von DNA Doppelstrangbrüchen aktiviert und bewirkt einen Stop der Zellzyklusprogression (Ball and Xiao 2005). Die Reparatur der DNA bzw., wenn dies nicht möglich ist, die Apoptose wird initiiert (Ball and Xiao 2005; Myers and Cortez 2006). RASSF1A und RASSF1C beinhalten eine putative ATM Phosphorylierungssequenz, die homolog zu folgender Sequenz ist: (P/L/I/M)X(L/I/D/E)SQ (Kim *et al.* 1999). Im Protein RASSF1A handelt es sich bei den Aminosäuren W125 bis K138, also der Sequenz WETP**DLSQ**AIEQK um eine ATM Phosphorylierungssequenz, wobei das Serin an Position 131 phosphoryliert werden könnte. In weiteren Arbeiten wurde jedoch die Sequenz LSQE als effizienteste Phosphorylierungsstelle definiert und für die gesamte Region folgende Aminosäureabfolge als die am besten phosphorylierte bestimmt: G(L/F/M)/A/(Q/F/M)/(M/F)/(Q/P)/L/S/Q/(E/Q)/(V/G/P)/F/A (O'Neill *et al.* 2000). Nach dieser Sequenz geurteilt, gehört die ATM Phosphorylierungsstelle in RASSF1A nicht zu den am effektivsten phosphorylierten Domänen. Die Phosphorylierung an Position 131 wurde von Shivakumar *et al.* jedoch lediglich *in vitro* beschrieben (Shivakumar *et al.* 2002). Die Mutationen S131F und A133S führten zur deutlichen Reduzierung des Phosphorylierungssignals im Western Blot; ein Einfluss der Mutation an den Positionen 131 und 133 auf die Fähigkeit von RASSF1A, den G<sub>1</sub> Zellzyklusarrest zu induzieren, konnte nicht festgestellt werden (Shivakumar *et al.* 2002). Interessanterweise war trotz Mutation des Serins 131 das Phosphorylierungssignal nicht vollständig gelöscht, woraus der Schluss gezogen werden kann, dass eine weitere Phosphorylierungsstelle in RASSF1A existiert. Die Veränderung der Aminosäure an Position 133 verhinderte ebenfalls die Phosphorylierung an Position 131. Dabei wurde das Alanin durch Serin ersetzt, dieser Austausch entspricht dem, der als Polymorphismus signifikant häufiger in Brustkrebspatienten verglichen mit Normalkontrollen gefunden wurde (Schagdarsurengin *et al.* 2005). Die Phosphorylierung an Position 131 könnte also Einfluss z.B. auf das Wachstum der Tumorzellen haben und die Krebsentstehung in Menschen fördern, die diesen Polymorphismus tragen. RASSF1A<sup>S131F</sup> ist wie RASSF1A an Tubulin assoziiert und hat ebenso die Fähigkeit, die Tubulinstrukturen bei Nocodazolbehandlung zu stabilisieren (Vos *et al.* 2004). Die Assoziation an Tubulin ist also nicht durch die Phosphorylierung an Position 131 gesteuert, ebenso wenig, wie die Arretierung des Zellzyklus. Einfluss könnte die Mutation an Position 131 auf Prozesse der Proliferation und/oder die Apoptose haben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Mutationen an den Positionen 131, 132 und 133 in RASSF1A eingefügt und der Einfluss auf Proliferation, Apoptose und Lokalisation des Proteins untersucht. In allen drei veränderten Varianten konnte festgestellt werden, dass die proliferationshemmende Wirkung von RASSF1A aufgehoben wurde. RASSF1AMut133 wurde in drei verschiedenen stabil transfizierten Klonen analysiert, das Proliferationsverhalten war vergleichbar mit dem von RASSF1C. Unterstützt wurde dieses Ergebnis von der Aussage aus dem Koloniebildungstest im weichen Agar, der eine dreifach vergrößerte Koloniegröße ergab, wenn RASSF1A im Codon 133 mutiert vorlag. Diese Erhöhung der Proliferation und Koloniebildung bei Expression von RASSF1AMut133, die dazu führen könnte, dass Position 131 nicht phosphoryliert wird, könnte Ursache für die erhöhte Krebsanfälligkeit für Menschen sein, die den Polymorphismus tragen. In diesen Patienten könnte der Ausfall des 2. Allels, wenn das erste den Polymorphismus trägt, zum verstärkten und schnelleren Wachstum der Krebszellen führen. Diese Daten werden gestützt durch Ergebnisse aus Migrationsexperimenten, die nach Analyse zweier Klone, die RASSF1AMut133 stabil exprimierten und eines RASSF1A exprimierenden Klones einen Anstieg der Migrationsgeschwindigkeit nach Mutation des Codons 133 zeigten. Somit könnte nicht nur die Proliferationsrate sondern auch die Fähigkeit der Migration in Patienten, die den Polymorphismus 133 tragen, erhöht sein, wodurch die Tumorigenese und die Metastasierung gefördert sein könnten.

Weiterhin wurde die Fähigkeit von RASSF1A und den mutagenisierten Formen RASSF1AMut131 und RASSF1AMut133, nach transienter Expression in A549 Apoptose zu induzieren, analysiert. Wird die Apoptoserate nach transienter Expression von RASSF1A als Flag-Fusionsprotein bzw. RASSF1AMut131 in A549 analysiert, so ist die Fähigkeit, Apoptose zu induzieren nach Mutation des Codons 131 verringert verglichen mit RASSF1A. Auch bei Vergleich nach transienter Expression von YFP-RASSF1A oder YFP-RASSF1AMut133 zeigt sich ein ähnlicher Effekt: die Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, ist bei RASSF1AMut133 weit niedriger als bei YFP-RASSF1A, in etwa der Höhe der Vektorkontrolle. Dies lässt den Schluss zu, dass die Phosphorylierung an Position 131 oder eine mögliche Phosphorylierung der Position 133 einen Beitrag zur apoptotischen Signalvermittlung über RASSF1A leistet. Da die Interaktion von CDC20 und MAP1/MOAP1 über die C1 Domäne erfolgt (Song and Lim 2004; Baksh *et al.* 2005) und die Interaktion mit MST über die SARAH Domäne (Khokhlatchev *et al.* 2002), sollte die ATM Domäne in diesen Fällen keinen Einfluss auf diese beschriebenen Apoptosemechanismen haben. Eine konformationelle Veränderung aufgrund einer möglichen Phosphorylierung könnte jedoch die Interaktion mit diesen Proteinen verhindern. Die Verringerung der Apoptose nach Mutation des Codons 133 des Proteins RASSF1A würde mit dem verstärkten Auftreten von Krebs in Patienten mit 133 Polymorphismus einhergehen, die Krebsentstehung oder Krebsentwicklung würde nicht durch den Übergang in Apoptose aufgehalten, sondern eine Zunahme der Proliferation könnte die Folge sein. Nach Paclitaxel Behandlung von stabil transfizierten A549 Zellen, die Flag-RASSF1A bzw. Flag-RASSF1AMut133



exprimieren, ist bei beiden die Apoptoserate wesentlich höher im Vergleich zur Vektorkontrolle. Es ist nur eine leichte Abnahme nach Mutation des Codons 133 zu verzeichnen. Paclitaxel wird als Chemotherapeutikum eingesetzt und inhibiert den Tubulinabbau der Spindelfasern während der Mitose. Somit kann es gezielt, schnell proliferierende Zellen inhibieren, obwohl auch Nichtkrebszellen betroffen sind. Wird nun zusätzlich RASSF1A bzw. RASSF1AMut133 exprimiert, so gehen die Zellen in höheren Anteilen in Apoptose, während bei der Vektorkontrolle die Apoptoserate geringer ist. In diesem Fall hat also die Mutation des Codons 133 kaum einen Einfluss auf apoptotische Prozesse in Folge von Paclitaxelbehandlung.

Die Lokalisation wurde untersucht, indem RASSF1AMut133 in Hek293 als YFP Fusionsprotein überexprimiert wurde. Es konnte, wie schon beschrieben (Vos *et al.* 2004), die gleiche Lokalisation an Tubulinstrukturen festgestellt werden wie bei YFP-RASSF1A. Auch die Tubulin stabilisierende Wirkung bleibt erhalten. Die Mutation des Codons 133 hat somit keinen Einfluss auf die Lokalisation von RASSF1A.

Die Veränderung der Erkennungssequenz zur Phosphorylierung des Serins 131 durch eine Mutation des Codons 133 kann dazu führen, dass entweder Serin 131 oder Serin 133 durch Kinasen, wie die ATM Kinase erkannt und phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung an dieser Position hat entscheidenden Einfluss auf die Proliferation und das Wachstum von A549 und führte zur Abnahme der Apoptose und ist somit entscheidend für die regulatorische Funktion von RASSF1A.

#### 4.3.4 Funktion der RA Domäne von RASSF1

Die RA Domäne von RASSF1A wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum einen durch Mutagenese der Codons 203, 246 und 257 und deren funktionelle Auswirkungen auf die Proliferation, Koloniebildung und Apoptose in A549 untersucht und zum anderen war die Interaktion von RASSF1A mit K-RAS *in vitro* Gegenstand von Experimenten.

Die RAS Assoziations Domäne ist die namensgebende Domäne des Proteins RASSF1A und über die Bindung an RAS könnte die Funktion von RASSF1 gesteuert werden. Die dazu vorliegenden Ergebnisse aus der Literatur sind jedoch widersprüchlich. So veröffentlichten Vos *et al.*, dass K-RAS mit RASSF1A koimmunopräzipitiert wurden, die beiden Proteine also interagieren (Vos *et al.* 2004). Dagegen konnten (Ortiz-Vega *et al.* 2002) keine Bindung von RASSF1A oder RASSF1C mit RAS im Hefe-2-Hybrid System nachweisen, wohl aber die Bindung von RASSF1A mit NORE1, welches wiederum Ras bindet (Ortiz-Vega *et al.* 2002). Somit wurde postuliert, dass RASSF1A über seinen N-Terminus mit NORE1 interagiert und so indirekt von RAS aktiviert oder reguliert werden könnte (Ortiz-Vega *et al.* 2002). RASSF1C, dessen N-Terminus verschieden zu dem von RASSF1A ist, vermag nicht mit NORE1 zu interagieren (Ortiz-Vega *et al.* 2002). Eine weitere Publikation beschreibt, dass keine Bindung von H-RAS und K-RAS in der aktivierten Variante (G12V) mit RASSF1A stattfindet (Khokhlathev *et al.* 2002). Im Pankreaskarzinom konnte eine negative Assoziation von

Mutation im *K-RAS* Gen und Hypermethylierung des Promoters von *RASSF1A* gezeigt werden (Dammann *et al.* 2003). Eine Rolle beider Proteine im gleichen Signalweg kann daraus geschlossen werden, während jedoch in anderen Tumorentitäten, wie Lungenkrebs, keine Assoziation beider zur Krebsentstehung führender Prozesse festgestellt wurde (Ramirez *et al.* 2003).

Die Interaktion von *RASSF1A* mit *K-RAS* wurde in der vorliegenden Arbeit *in vitro* untersucht und eine Bindung beider Proteine konnte gezeigt werden. *In vitro* Systeme sind jedoch nicht zu 100% aussagefähig, da schon die Expression von *K-RAS* in *E.Coli* zur veränderten Bildung des Proteins führen kann. Zum einen können posttranskriptionelle Veränderungen nicht wie in humanen Zellen vorgenommen werden und zum anderen kann das Bindeverhalten bei Expression als Fusionsprotein durch den großen Fusionsproteinanteil verändert sein. *RASSF1A* wurde ebenfalls *in vitro* hergestellt, wobei ein Reticulozytenlysat eingesetzt wurde. *RASSF1A* könnte somit durch Bindung an *K-RAS* aktiviert werden und an der Signalvermittlung ins Zellinnere beteiligt sein.

Die Rolle der RA Domäne wurde ebenfalls durch stabile Expression von *RASSF1A* und mutierter Varianten in A549 untersucht. Verändert wurde *RASSF1A* in den Codons 203, 246 und 257. Bei der Aminosäure an Position 203 des Proteins *RASSF1A* handelt es sich um eine Phosphorylierungsstelle (Rastetter 2006), die die Funktion des Proteins je nach Phosphorylierungsgrad steuern könnte. Drei verschiedene Klone, die *RASSF1AMut203* exprimierten, wurden auf Veränderungen im Proliferationsverhalten mit *RASSF1A* exprimierenden Zellen verglichen. Es wurde gezeigt, dass der proliferationsinhibierende Effekt von *RASSF1A* nach Mutation des Codons 203 zum Teil sehr stark abgeschwächt war. In einigen Ansätzen war die Proliferation stark erhöht, verglichen mit der Vektorkontrolle und *RASSF1C* exprimierende Zellen. Im Gegensatz zu den Wachstumskurven, bei denen die Mutation des Codons 203 eine schnellere Proliferation, verglichen mit *RASSF1A* exprimierenden Zellen, bewirkte, konnte im weichen Agar keine verstärkte Koloniebildung festgestellt werden. So betrug die mittlere Koloniegröße bei *RASSF1AMut203* 35 µm. Diese entspricht in etwa der mittleren Koloniegröße des Ansatzes *RASSF1A*. In Migrationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Fähigkeit der Zellen, durch eine künstliche Kollagenmatrix zu migrieren, sehr stark verringert, werden die Ansätze *RASSF1A* und *RASSF1AMut203* verglichen. Die Punktmutation an Position 203 könnte für die Funktion von *RASSF1A* von Bedeutung sein.

Die Apoptoserate wurde nach transientscher Expression von *RASSF1A*, *RASSF1AMut203*, *RASSF1AMut246* und *RASSF1AMut257* in A549 ermittelt. Im Vergleich der Apoptoseraten von Flag-markiertem *RASSF1A*, *RASSF1AMut246* und *RASSF1AMut257* zeigt sich keine Veränderung. Die Mutation des Codons 203 jedoch bewirkte nach transientscher Transfektion als YFP Protein eine Zunahme der Apoptoserate um ca. ein Drittel verglichen mit YFP-*RASSF1A*. Die Phosphorylierungsstelle an Position 203, nicht jedoch die Aminosäuren an den Positionen 246 und 257, ist somit

entscheidend bei der Funktion von RASSF1A in apoptotischen Prozessen. Die in der Literatur beschriebenen apoptotischen Signalwege, in die RASSF1A involviert ist, bedingen eine Bindung an den N-Terminus oder eine Bindung über die SARAH Domäne (Khokhlatchev *et al.* 2002; Baksh *et al.* 2005). Dass die Mutagenese in der RA Domäne also keinen Einfluss hat, wäre zu erwarten. Die Zunahme der Apoptose nach Mutation des Codons 203 könnte auf Aktivierung des Proteins und konformationelle Veränderungen zurückzuführen sein. Die Apoptoserate war jedoch nach Behandlung mit Paclitaxel im Ansatz RASSF1AMut203 stark verringert, verglichen mit der in stabil RASSF1A exprimierenden A549 Zellen. Paclitaxel stabilisiert Tubulinstrukturen und arretiert somit die Mitose. Die Zellen gingen verstärkt in Apoptose, wurde RASSF1A exprimiert, jedoch weniger häufig, wurde die im Codon 203 mutierte Variante gebildet. Eine Schalterfunktion je nach Aktivierungszustand, d.h. je nachdem, ob das Serin 203 phosphoryliert vorliegt oder nicht, könnte angenommen werden, die die Funktion von RASSF1A in Richtung Proliferation oder Apoptose lenkt.

Die Lokalisation von RASSF1AMut203 wurde analysiert. Keine Veränderung wurde beobachtet, wird die Lokalisation von YFP-RASSF1AMut203 und YFP-RASSF1A verglichen. Auch nach Mutation des Codons 203 lag das Protein tubulinassoziiert vor. Interessanterweise schienen jedoch mehr Mitosen in fortgeschrittenen Stadien zu sein, war die Position 203 punktmutiert verglichen mit RASSF1A (Daten nicht gezeigt). Die mikrotubulistabilisierende Wirkung nach Nocodazolbehandlung war bei YFP-RASSF1AMut203 nicht beeinträchtigt.

Das Serin an Position 203 wird phosphoryliert (Rastetter 2006). Dies konnte in einem Western Blot mit Hilfe eines phospho-serinspezifischen Antikörpers *in vivo* bestätigt werden. Die Phosphorylierung wurde nach Mutation des Codons 203 sehr stark abgeschwächt, jedoch nicht völlig gelöscht. Die für die ATM Domäne beschriebene Phosphorylierungsstelle des Codons 131 könnte für das verbleibende Signal verantwortlich sein. Eine weitere Mutagenese an dieser Position sollte durchgeführt werden, um das vollständige Löschen des Signals zu bewirken und zu untersuchen. Da aber auch GST allein eine leichte Färbung nach Markierung mit dem phosphoserinspezifischen Antikörper aufweist, könnte das verbleibende Signal bei GST-RASSF1AMut203 auch durch Markierung des GST Fusionsproteins hervorgerufen worden sein. Interessant wäre es, auf einen Zusammenhang zwischen Zellzyklusphase und Aktivierung durch Phosphorylierung von RASSF1A an Position 203 zu untersuchen. Die Phosphorylierungsstelle Serin 203 in RASSF1A könnte entscheidend für die Regulation von Prozessen der Proliferation und Apoptose sein.

#### 4.3.5 Funktion der SARAH Domäne von RASSF1

Der Tumorsuppressor RASSF1A interagiert mit der proapoptischen Kinase MST. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass diese Interaktion über die SARAH Domäne des Proteins RASSF1A erfolgt. Welche funktionellen Auswirkungen die Deletion der SARAH Domäne von RASSF1A auf die Proliferation, die Koloniebildung,

das Migrationsverhalten, die Apoptose und die Lokalisation in Zellen hat wurde weiterführend untersucht.

Die Aminosäuren 290 bis 373 des Proteins RASSF1A codieren für eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die SARAH genannt wird und aus *in silicio* Analysen definiert wurde (Scheel and Hofmann 2003). SARAH steht für Sav-RASSF1A-Hpo, wobei es sich bei dem Drosophila Protein Salvador (Sav) um das Homolog zum humanen WW45 und bei Hippo (Hpo) um das Homolog zum humanen MST handelt (Scheel and Hofmann 2003). Auch in Drosophila existiert ein Homolog zu RASSF1A, das 89,6 kDa große Protein LD40758p. Alle drei Proteine also Sav, RASSF1A und Hpo tragen die SARAH Domäne ebenso wie die humanen Homologe zu Sav WW45 und zu Hpo MST1 und MST2. Die SARAH Domäne von RASSF1A umspannt dessen C-Terminus, der identisch zu RASSF1C ist, beide Proteine können also in den Signalweg involviert sein, durch ihre verschiedenen N-Termini jedoch möglicherweise verschiedene funktionelle Aspekte vermitteln. MST1 wurde in einem Hefe-2-Hybrid Screen als Bindungspartner von RASSF1A und NORE1 beschrieben, die Bindung erfolgt über die C-Termini von RASSF1A, NORE1 und MST (Khokhlatchev *et al.* 2002). Die Interaktion wurde *in vivo* bestätigt und eine Trimerisierung mit HaRasG12V wurde gezeigt (Khokhlatchev *et al.* 2002). Da es sich bei MST um eine proapoptotische Serin/Threonin Proteinkinase handelt, wurde ein neuer proapoptotischer Ras regulierter *Pathway*, der über RASSF1A führt, postuliert (Khokhlatchev *et al.* 2002). In Drosophila interagieren sowohl Hpo (MST) als auch Wts (Warts, homolog zum humanen LATS) mit Sav und Hpo vermag Wts zu phosphorylieren, was zum Zellzyklusarrest und zur Induktion von Apoptose führt (Tapon *et al.* 2002; Harvey *et al.* 2003; Hay and Guo 2003; Wu *et al.* 2003). Die humanen Proteine WW45 und MST2 interagieren ebenfalls und MST1 und MST2 phosphorylieren LATS1 und LATS2, eine Bindung zwischen WW45 oder MST mit LATS konnte jedoch nicht gezeigt werden (Chan *et al.* 2005). RASSF1 könnte als regulatorisches Element fungieren, das eine weitere Feinregulierung zwischen apoptotischen und Prozessen des Zellzyklus steuern könnte. Eine Möglichkeit besteht dabei in der Bindung von LATS durch die RASSF1A Domäne C1, die der LIM Domäne ähnelt, die wiederum für die Interaktion von LATS mit den Bindepartnern Ajuba und Zyxin verantwortlich ist (Hirota *et al.* 2000; Abe *et al.* 2006). LATS ist centrosomlokalisiert und es wurde gezeigt, dass LATS und Ajuba die Organisation der Spindelmikrotubuli regulieren, indem  $\gamma$ -Tubulin zu den Centrosomen rekrutiert wird (Abe *et al.* 2006). Da RASSF1A ebenfalls centrosom- bzw. spindelkolokalisiert in der Zelle vorliegt und die Interaktion mit  $\gamma$ -Tubulin gezeigt wurde (Liu *et al.* 2003), ist ein Zusammenspiel zwischen RASSF1A und LATS über die regulatorischen Einflüsse von RAS, MST und WW45 denkbar. LATS könnte durch die Bindung an RASSF1A, das auch MST bindet, zu MST rekrutiert werden und somit die Phosphorylierung von LATS durch MST1 ermöglichen.

Die Deletion der SARAH Domäne des Proteins RASSF1A sollte eine Bindung der Proteine WW45 und MST verhindern und die über diese Interaktion regulierten Prozesse in der Zelle aufheben. Die Veränderung, die eine solche Deletion der SARAH

Domäne von RASSF1 in humanen Zellen hervorruft, wurde durch stabile Transfektion in A549 untersucht und mit der Reexpression von Wildtyp RASSF1A verglichen. Verglichen mit der Proliferation von RASSF1A exprimierenden A549 Zellen, zeigt sich in RASSF1ADelSARAH exprimierenden Zellen zunächst kein Unterschied, die Proliferation nach Reexpression von RASSF1A verändert sich nicht, wird die SARAH Domäne deletiert. Diese Ergebnisse werden durch die Analyse der Koloniebildung im weichen Agar gestützt, wobei die SARAH deletierte RASSF1A Form, in A549 stabil exprimiert, sogar noch kleinere durchschnittliche Koloniegrößen aufwies, verglichen mit wtRASSF1A exprimierenden Zellen. Zunächst scheint es also kaum Unterschiede hervorzurufen, wird die SARAH Domäne deletiert. Wird jedoch die Migrationsfähigkeit der verschiedenen Ansätze betrachtet, so ist die Fähigkeit von RASSF1ADelSARAH exprimierenden Zellen, durch eine künstliche Kollagenmatrix zu migrieren, wesentlich verringert, verglichen mit Zellen, die RASSF1A exprimieren. Die Deletion der SARAH Domäne von RASSF1A verstärkt dessen antiproliferativen Effekt. Die Deletion der SARAH Domäne verhindert die Bindung von MST, dass durch Phosphorylierung LATS aktivieren sollte (Chan *et al.* 2005). In *Drosophila* bewirkte die Phosphorylierung von Wts, dem LATS Homolog, durch Hpo, dem MST Homolog, die Induktion der Apoptose und den Zellzyklusarrest (Udan *et al.* 2003). Die Bindung durch RASSF1A hat also einen negativen regulatorischen Effekt.

YFP-RASSF1A induziert Apoptose in transient transfizierten A549 Zellen. Die Induktion der Apoptose von YFP-RASSF1A wird verstärkt, ist die SARAH Domäne deletiert, ein größerer Prozentsatz der Zellen geht in die Apoptose. Diese höhere Apoptoserate der Zellen bei Expression von RASSF1ADelSARAH könnte die verlangsamte Proliferation und die reduzierte Koloniebildung verglichen mit RASSF1A bzw. der Vektorkontrolle erklären. Ein verstärkter Eintritt in die Apoptose der RASSF1ADelSARAH exprimierenden Zellen könnte ebenso für die verlangsamte Migration, verglichen mit RASSF1A exprimierenden Zellen, mitverantwortlich sein.

Praskova *et al.* postulierten die Funktion von RASSF1A als Protein, dass MST gebunden und somit im inaktiven Zustand hält (Praskova *et al.* 2004). Ein Fehlen von RASSF1A, dass in der Tumorigenese zahlreicher Tumorentitäten eine entscheidende Rolle spielt (Dammann *et al.* 2005), würde somit MST freisetzen. In diesem Fall würde MST aktiviert, wenn RASSF1A fehlt, und proapoptotisch wirken. Die Reexpression von RASSF1A in Tumorzellen, in denen die endogene Expression von RASSF1A durch Promoterhypermethylierung stark herabreguliert ist, bewirkt jedoch eine verminderte Proliferation. Die Reexpression würde somit dazu führen, dass MST gebunden wird und seine proapoptotische Wirkung nicht entfalten könnte. In diesem Fall müsste die Proliferationsrate erhöht werden und nicht, wie beobachtet, reduziert. Die Erhöhung der Apoptoserate nach transienter Transfektion von YFP-RASSF1A und YFP-RASSF1ADelSARAH bei der SARAH deletierten Variante spricht ebenfalls dagegen, dass RASSF1A MST im inaktiven Zustand hält, da in diesem Falle die Apoptoserate erniedrigt sein müsste. Zu beachten ist jedoch, dass die Apoptoseraten nach Überexpression eines YFP Fusionsproteins ermittelt wurden und sowohl die verstärkte

Überexpression, als auch die Veränderung durch die Fusion an YFP Auswirkungen auf die Funktion und die Regulation von RASSF1A haben kann. Da aber beide Proteine in gleichen Bedingungen analysiert wurden kann die Veränderung nach Deletion der SARAH Domäne von Bedeutung sein. RASSF1A wird einen regulatorischen Einfluß auf den MST/LATS Signalweg haben, vielleicht als Adaptorprotein, das MST in die Nähe von LATS rekrutiert und dessen Phosphorylierung vermittelt (Abbildung 44). Die Bindung von RASSF1A und LATS könnte über die LIM ähnliche C1 Domäne des Proteins RASSF1A erfolgen (Abbildung 44). Die Entscheidung ob Zellzyklusarrest, Apoptose oder Fortlauf des Zellzyklus könnte wiederum vom Aktivierungszustand des Proteins RASSF1A z.B von der Phosphorylierung an den Serinen 131 bzw. 203 abhängig sein.

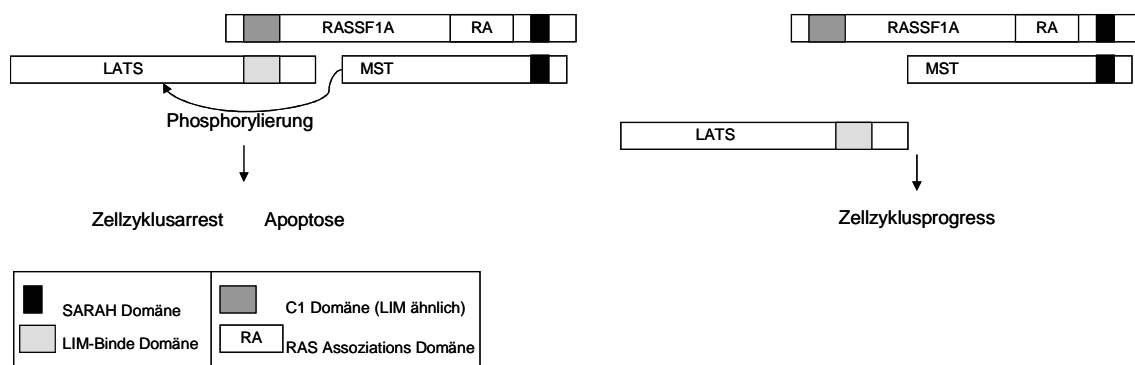


Abbildung 44. Mögliche regulatorische Funktion von RASSF1A durch Bindung von MST und LATS. RASSF1A könnte über die Interaktion mit MST und LATS an der Entscheidung, ob die Zelle proliferiert, arretiert bzw. in die Apoptose geht, beteiligt sein.

Die Aktivierung von LATS könnte entscheidend für das Fortschreiten der Mitose sein. Im entsprechenden Drosophila Siganltransduktionsweg bewirkt die Phosphorylierung des Proteins Wts (Homolog von LATS) durch Hpo den Zellzyklusarrest und die Induktion der Apoptose (Udan *et al.* 2003; Chan *et al.* 2005). Es wurde die Bindung von MST2 an WW45 beschrieben, obwohl diese nicht essentiell für die Phosphorylierung von LATS war (Chan *et al.* 2005). Auch eine Interaktion von LATS mit MST konnte nicht gezeigt werden, obwohl MST LATS phosphoryliert (Chan *et al.* 2005). Die Bindung von MST an RASSF1A und eine mögliche Interaktion von RASSF1A mit LATS könnte also Einfluss auf die Phosphorylierung von LATS haben (Abbildung 44).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte *in vivo* gezeigt werden, dass RASSF1A sowohl mit MST1, als auch mit MST2 interagiert. Dazu wurden jeweils beide Proteine als getagte Fusionsproteine in HEK293 exprimiert und RASSF1A wurde präzipitiert. Eine Kopräzipitation erfolgte mit MST1 und MST2. War jedoch die SARAH Domäne des Proteins RASSF1A deletiert, so erfolgten keine Bindung und damit keine Kopräzipitation mit MST1 und MST2. Auch RASSF1C interagiert mit MST1 und MST2 über die C-terminale SARAH Domäne, wobei die Bindung ineffizienter als die von RASSF1A erfolgt. Keinen Einfluss auf die Bindung mit MST1 hatte die Mutation des Serins 203 in RASSF1A. Es konnte keine Interaktion für WW45 und RASSF1A bzw.

RASSF1C gefunden werden, obwohl beide Proteine eine SARAH Domäne tragen. Dieses Ergebnis kann aber auch aus der veränderten Proteinstruktur durch den Flag bzw. den GST *Tag* resultieren, die die Bindungseigenschaften verändern können. Ebenso könnte die Bindung schwächer, verglichen mit der mit MST und somit nicht detektierbar sein. Die Interaktion von MST2 mit WW45 war bereits publiziert worden (Chan *et al.* 2005). Auch MST1 interagiert mit WW45. Da nur RASSF1A als Tumorsuppressor gilt und nicht RASSF1C, sollte tatsächlich eine regulatorische Funktion von der C1 Domäne des Proteins RASSF1A ausgehen, da RASSF1C ebenso MST1 und MST2 bindet.

Weiterhin war von Interesse, inwieweit die Deletion der SARAH Domäne Auswirkungen auf die Lokalisation des Proteins hat. Werden RASSF1A und RASSF1ADelSARAH als YFP Proteine exprimiert, so liegen beide fluoreszierende Proteine in A549 zytoskelettassoziiert vor und stabilisieren die Tubulinstrukturen gegenüber der Behandlung mit Nocodazol. Diese Stabilisierung kann jedoch auch aus der starken Überexpression der Proteine als YFP-Fusionsproteine resultieren. In A549 konnten nach Überexpression keinerlei Mitosen gefunden werden. Bei der Betrachtung von HEK293 nach transienter Transfektion, zeigen sich bei YFP-RASSF1A zahlreiche Mitosen, die Spindelpole und die Centrosomen sind markiert und eine Kolo-kalisation zu Tubulin konnte durch Kofärbung mit einem Tubulin Antikörper dargestellt werden, so wie bereits in der Literatur beschrieben (Liu *et al.* 2003; Dallol *et al.* 2004; Rong *et al.* 2004; Vos *et al.* 2004). Liegt jedoch eine Deletion der SARAH Domäne vor, so treten stark veränderte, mitotische Spindeln auf. YFP-RASSF1ADelSARAH ist nicht centrosomkolo-kalisiert, oft sind die Spindelfasern verstärkt und nur monopolar. Zu beobachten ist ebenfalls, dass die Chromosomen ungleichmäßig verteilt in der Zelle vorliegen. Da die Mitose abnormal verläuft, könnte eine Induktion der Apoptose resultieren. Diese Beobachtung stützt die erniedrigte Proliferation, die verminderte Koloniebildung und auch die verminderte Migrationsfähigkeit, da eine Teilung nicht ordnungsgemäß erfolgen kann, ist die SARAH Domäne deletiert. Dieses Ergebnis stützt ebenfalls die Annahme, dass über die Bindung von MST, die über die SARAH Domäne erfolgt, mitotische Prozesse reguliert werden. Dies könnte, wie schon erläutert über die Regulation von LATS erfolgen, das mit seinen Interaktionspartnern Ajuba und Zyxin in die Regulation der Spindelfaserorganisation involviert ist (Hirota *et al.* 2000; Abe *et al.* 2006).

#### 4.3.6 Einordnung der funktionellen Zusammenhänge

In der Literatur sind bereits einige Interaktionspartner von RASSF1A beschrieben und die Funktion in bestimmten Signalwegen ist dargelegt. So wurde z.B. die Interaktion von RASSF1A mit CDC20 und somit eine Rolle in der Kontrolle des Übergangs von Prometaphase in die Mitose durch negative Regulation des APC-CDC20 Komplexes beschrieben (Song and Lim 2004; Song *et al.* 2004). Die Interaktion von RASSF1A mit CDC20 konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, nach

Präzipitation aus Proteinextrakt humaner Zellen konnte kein CDC20 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer regulatorischer Mechanismus ist die Aktivierung von Bax über die Bindung von MAP1/MOAP1, das Interaktionspartner von RASSF1A ist (Baksh *et al.* 2005; Vos *et al.* 2006). RASSF1A und MAP1/MOAP1 binden die Rezeptoren TNF-R1 und TRAIL-R1, die nach Bindung von TNF bzw. Apo2L/TRAIL aktiviert wurden (Baksh *et al.* 2005). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Transfektion von MAP1/MOAP1, RASSF1A und aktivem K-RAS zur Induktion von Apoptose führt (Vos *et al.* 2006). Dieser Signalweg könnte für die apoptotische Reaktion der Zellen nach Transfektion verantwortlich sein. Nicht nur die Induktion der Apoptose durch extrazelluläre Faktoren spielt eine wichtige Rolle. Möglich wäre eine Kontrollfunktion von RASSF1A beim Übergang in die Mitose und der Spindelpolorganisation, die zur Entscheidung Apoptose oder Mitose führt.

Die Interaktion mit MST ist jedoch der vielversprechendste funktionelle Ansatz. Der aus *Drosophila* bekannte Mechanismus scheint evolutionär konserviert und somit von Bedeutung. Schlüssig ist auch die Lokalisation von RASSF1A an Tubulin und während der Mitose an Spindelpole und Spindel. Auch der von MST phosphorylierte Tumorsuppressor LATS ist centrosom- und spindelkolokalisiert und ist von Bedeutung für die Spindelorganisation (Hirota *et al.* 2000; Abe *et al.* 2006). Über die SARAH Domäne des Proteins RASSF1A erfolgt die Interaktion mit MST. Die Deletion der SARAH Domäne des Proteins RASSF1A führte zur Ausbildung abnormer Spindeln und zur ungleichmäßigen Verteilung der Chromosomen. Diese Tatsache spricht für eine Rolle von RASSF1A in Spindelorganisationsprozessen, ähnlich, wie die von LATS, so dass eine direkte oder indirekte Interaktion oder Aktivierung z.B. über MST, das LATS phosphoryliert, nahe liegt.

## 4.4 Einordnung der experimentellen Vorgehensweise

### 4.4.1 Methylierungsuntersuchungen

Die MSP (*methylation specific PCR*) ist eine sehr sensitive Methode, das heißt bereits wenige methylierte Promoterbereiche können zur Amplifikation ausreichend sein (Herman *et al.* 1996). Es wird so nicht quantitativ ausgewertet sondern nur qualitativ. Eine Bande bei der PCR, bei der das Primerpaar für eine methylierte Promoterregion eingesetzt wurde, wird so eingestuft, dass der Tumor methyliert für diese Promoterregion vorliegt. Die COBRA (*combined bisulfite restriction analysis*) ist zwar auch keine quantifizierbare Methode, aber weniger sensitiv verglichen mit MSP, so dass der Anteil methylierter Promoterregionen im Tumor wesentlich höher sein muss, um ein Schnittprodukt nach PCR aufzuweisen. Quantifizierbar wäre die COBRA z.B. durch den Einsatz markierter Primer. Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich eine qualitative Auswertung vorgenommen. Zusätzlich ist zu beachten, dass selten eine vollständige Methylierung der Tumorproben vorliegt, da der Tumor von normalen



Zellen, wie Blutzellen durchsetzt ist und zusätzlich bei der Operation auch benachbartes Normalgewebe mit entfernt wird, das dann Produkt bei der PCR unter Einsatz der unmethylierten Primer bedingt. Zusätzlich ist auch zu beobachten, dass in einem Tumor weitere klonale Veränderungen auftreten, das heißt, dass bereits nach Tumorentstehung die Einzelzellen des Tumors weiterreichend verändert werden, das aber auf verschiedene Art und Weise. Innerhalb eines Tumors kann so z.B. eine Zelle eine epigenetische Inaktivierung tragen, die in der benachbarten Region aber nicht auftritt. Dieses später in der Tumorigenese auftretende Ereignis würde ebenfalls zu Produkt bei der MSP mit methylierten und unmethylierten Primern hervorrufen.

#### 4.4.2 Funktionelle Untersuchungen

Experimente mit den stabil transfizierten A549 Klonen wurden in Mehrfachbestimmung und bei relevanten Veränderungen mit mehreren stabilen Klonen durchgeführt. Zu beachten ist aber nach wie vor, dass die Expression in den Klonen verschieden stark sein kann und klonspezifische Veränderungen durch Positionierungseffekte bei der Einlagerung des Konstruktes in das Genom, möglich sind. Auch wurde in diesem Fall nicht natives RASSF1 exprimiert, sondern eine Flag-getaggte Variante. Obwohl dieser *Tag* den Vorteil hat, sehr klein zu sein, kann es zur veränderten Faltung und Proteinbildung kommen und somit die Funktion von RASSF1 verändern. Bei der Zelllinie A549 handelt es sich um eine Lungenkrebszelllinie, die nicht nur eine Veränderung, wie die Hypermethylierung des RASSF1A Promoters aufweist, sondern weitere aus der Tumorigenese resultierende molekularbiologische Abweichungen, verglichen mit normalen Zellen, trägt. In Kultur unterliegen Zellen einer Veränderung, so dass die Expression bestimmter regulatorischer Proteine durch Methylierung des Promoters oder Mutation verstärkt oder abgeschwächt sein kann. Die Reexpression von RASSF1A bzw. die Überexpression von RASSF1C kann somit auch Einfluss auf andere regulatorische Elemente der Zelle haben, oder eine Aktivierung könnte erfolgen, weil ein *upstream activator* konstitutiv aktiv vorliegt. Aus diesen Gründen sollten diese hier vorliegenden Ergebnisse in anderen Zellen z. B. Weichteilsarkomzelllinien verifiziert werden.

Die Bestimmung der Apoptoserate und die Lokalisationsuntersuchungen wurden nach transienter Überexpression in A549 und HEK293 von YFP-Fusionsproteinen durchgeführt. Das gelb fluoreszierende Protein ist ein sehr großes Protein und die Faltung, ebenso wie die Bindeeigenschaften von den damit markierten Proteinen, können sich verändern und verfälschte Ergebnisse liefern. Zusätzlich kann die starke Überexpression zur Induktion von Apoptose oder Zellreaktionen führen, die bei Expression von endogenem Proteine nicht hervorgerufen worden wären. Aus diesem Grunde wurde immer die Vektorkontrolle mitgeführt ebenso wie RASSF1C, das keine tumorsuppressive Funktion hat, als Vergleich zur Wirkung von RASSF1A und dessen veränderten Varianten.

Die Interaktionsstudien wurden mit Flag, GST bzw. Flag und GST markierten Proteinen durchgeführt, auch hier können veränderte Faltung, Aktivierung und Prozessierung Gründe für verfälschte Ergebnisse sein. Sollten zukünftig gut funktionierende Antikörper entwickelt werden, könnten diese Experimente mit endogenem RASSF1 wiederholt und untersucht werden, um eine mögliche Veränderung durch die Fusionsmarkierung auszuschließen.

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Epigenetische Untersuchungen

Die Rolle der epigenetischen Inaktivierung von tumorrelevanten Genen, wie *p16*, *MSH2*, *MLH1* und *RASSF1A* und von den Genen *MST1*, *LATS1* und *WW45* wurde in primären Weichteilsarkomen, in primären, nichtkleinzelligen Bronchiolkarzinomen und kleinzelligen Bronchiolkarzinomzelllinien analysiert. Es zeigte sich, dass die Hypermethylierung der Promotoren von *MSH2* und *MLH1* ein seltenes Ereignis in der Weichteilsarkomentstehung ist, während die *RASSF1A* Promoterhypermethylierung, verglichen mit untersuchtem Normalgewebe mit 20% erhöht vorlag. Die Promoterhypermethylierung von *RASSF1A* war in Leiomyosarkomen signifikant ( $p < 0,015$ ) erhöht, verglichen mit der in MFHs. In der Weichteilsarkomzelllinie RD konnte nach Behandlung mit dem Methyltransferasehemmer 5-Aza-2'-Deoxycytidin die Reexpression von *RASSF1A* gezeigt werden. Die Promoterhypermethylierung ist also ursächlich für die Herabregulation der Expression verantwortlich. Auch konnte die verminderte Expression von *RASSF1A* in Weichteilsarkomen mit hypermethyliertem Promoter gezeigt werden. Für Patienten, deren Tumoren einen hypermethylierten *RASSF1A* Promoter aufwiesen, ist die Prognose schlechter, als für Patienten mit unmethyliertem *RASSF1A* Promoter. Patienten mit Hypermethylierung haben eine mittlere Überlebenszeit von 22 Monaten, während Patienten mit unmethyliertem *RASSF1A* Promoter eine mittlere Überlebenszeit von 58 Monaten aufwiesen ( $p = 0,0284$ ; Log-Rank-Test). Im *Cox proportional hazard regression model* ergab sich ein signifikant höheres Risiko für Patienten mit methyliertem *RASSF1A* Promoter ( $RR = 2,9$ ;  $p = 0,039$ ).

Die Promoterhypermethylierung der Gene *LATS1* (7%), *LATS2* (keine Methylierung) und *WW45* (keine Methylierung) stellt kein häufiges Ereignis in der Entstehung von Weichteilsarkomkrebs dar, während die Hypermethylierung von *MST1* mit 37% häufig auftrat. Der Promoter von *MST2* ist mit 20% relativ oft methyliert. Die Promoterhypermethylierung von *RASSF1A* und *MST1* ist in Leiomyosarkomen signifikant höher, als die von *MST2*. Die Expression von *MST1* in der Zelllinie SKLMS konnte nach Behandlung mit dem Methyltransferasehemmer 5-Aza-2'-Deoxycytidin verstärkt werden. Für Patienten, deren Tumoren einen methylierten *MST1* Promoter