

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 Bronchialkarzinomen und kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien 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

tragen, ist die Prognose positiver, verglichen mit Patienten, deren *MST1* Promoter unmethyliert vorliegt (*Cox`proportional hazard regression model*; RR=8,2; p=0,036).

Im Bronchialkarzinom ist die Promoterregion von *MST1* (53%) und *LATS2* (34%) sehr häufig methyliert, während die Promotoren von *MST2* (22%) und *LATS1* (13%) seltener hypermethyliert vorliegen. Auch in primären Bronchialkarzinomen wurde keinerlei Hypermethylierung des Promoters von *WW45* detektiert, lediglich in zwei kleinzelligen Lungenkrebszelllinien konnte dieses Ereignis detektiert werden. Die Hypermethylierung der Promotoren von *RASSF1A* und *MST1* sind somit als frühes und entscheidendes Ereignis in der Krebsentstehung einzustufen.

5.2 Funktionelle Analysen

Der Tumorsuppressor *RASSF1A* besitzt eine Ras Assoziationsdomäne und somit liegt die Interaktion mit RAS nahe. Die Analyse der Interaktion von *RASSF1A* mit K-RAS ist in der Literatur kontrovers beschrieben, im Rahmen dieser Arbeit konnte *in vitro* eine Interaktion von *RASSF1A* mit K-RAS gezeigt werden. *RASSF1A* könnte über eine Aktivierung durch K-RAS reguliert werden. Die Mutation in den Genen *K-RAS* und *B-RAF* wurde in Weichteilsarkomen mittels SSCP analysiert, um eine mögliche Korrelation zur Promoterhypermethylierung von *RASSF1A* zu ermitteln. Es konnten keine Mutationen in *K-RAS* detektiert werden und auch die Mutationsrate in *B-RAF* ist mit 5% sehr gering, Mutationsereignisse in den Genen *B-RAF* und *K-RAS* tragen also nicht erheblich zur Weichteilsarkomentstehung bei.

Die Funktion von *RASSF1A* wurde in der Lungenkrebszelllinie A549 untersucht. Stabil bzw. transient exprimiert in A549 bewirkt *RASSF1A* eine Reduktion der Proliferation, eine verminderte Koloniebildung im weichen Agar, eine verminderte Migrationsgeschwindigkeit und eine Erhöhung der Induktion der Apoptose, verglichen mit Kontrollen. Diese Ergebnisse bestätigten die Rolle von *RASSF1A* als Tumorsuppressorgen. Die Untersuchung der Lokalisation von *RASSF1A* als YFP-Fusionsprotein ergab eine Kolo-kalisation zu Tubulin und damit zu Zytoskelettstrukturen bzw. Spindeln und Spindelpolen während der Mitose.

Die Interaktion von *RASSF1A* und *RASSF1C* mit *MST1* und *MST2* in Abhängigkeit der SARAH-Domäne des Proteins *RASSF1A* wurde in Präzipitationsexperimenten im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt. Verglichen mit dem Einfluss von stabil bzw. transient exprimiertem *RASSF1A*, zeigt die SARAH deletierte *RASSF1A* Variante eine ähnliche Proliferation, eine verminderte Koloniebildung im weichen Agar, eine verminderte Migrationsfähigkeit und eine Zunahme der Apoptoserate. Gravierend ist der Effekt der Deletion der SARAH Domäne für die Ausbildung der Spindelapparate während der Mitose. Die Fasern sind verstärkt, oft monopolar und die Zellen besitzen keine Centrosomen. Die Verteilung der Chromosomen erfolgt ungleichmäßig. *RASSF1A* könnte demzufolge in die Organisation von Spindelfasern und Polen involviert sein und über *MST* an der Regulation von *LATS* beteiligt sein.

Der natürlich vorkommende Polymorphismus des Codons 133 von *RASSF1A* hat Einfluss auf die Tumorigenese von Brustkrebspatienten (Schagdarsurengin *et al.* 2005). Auch funktionell konnte eine Veränderung verglichen mit *RASSF1A* festgestellt werden, denn nach Mutation des Codons 133 kam es zur verstärkten Proliferation, zu stark vergrößerten Kolonien im weichen Agar und zur Zunahme der Migrationsfähigkeit. Die Veränderung an Position 133 hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von *RASSF1A* an den Mikrotubuli. Bei dem Serin an Position 131 handelt es sich im Protein *RASSF1A* um eine putative Phosphorylierungsstelle, der Polymorphismus des Codons 133 könnte zu funktionellen Veränderungen an dieser Phosphorylierungsstelle führen. In Weichteilsarkomen wurde auf die Häufigkeit des Vorkommens des Polymorphismus des Codons 133 getestet. Er wurde in 12% der Fälle detektiert. Die Häufigkeit ist damit höher, verglichen mit einer in der Literatur beschriebenen Kontrollgruppe, bei der der Polymorphismus in 3% der Fälle gefunden wurde. Der Polymorphismus des Codons 133 des Gens *RASSF1A* fördert die Tumorigenese.

Eine weitere Phosphorylierungsstelle stellt Serin 203 in *RASSF1A* dar (Rastetter 2006). Dass Serin 203 phosphoryliert wird, konnte im Western Blot mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers, der eine Abschwächung des Signals nach Mutation des Codons 203 zeigte, verifiziert werden. Nach stabiler bzw. transienter Expression der Form *RASSF1AMut203* in A549 verstärkte sich die Proliferation, während die Koloniegröße im weichen Agar mit der von *RASSF1A* exprimierenden Zellen vergleichbar und die Migrationsfähigkeit durch eine künstliche Kollagenmatrix stark vermindert war. Die Lokalisation von *RASSF1A* an Tubulinstrukturen blieb nach Mutation des Codons 203 unverändert.

Für die Funktion von *RASSF1A* konnten die Codons 133 und 203 sowie die SARAH Domäne als bedeutend charakterisiert werden. Der Polymorphismus des Codons 133 fördert die Tumorigenese, die Mutation der Phosphorylierungsstelle des Codons 203 bewirkte funktionelle Veränderungen und über die SARAH Domäne des Proteins *RASSF1A* interagiert das Protein mit MST. Über diese Interaktion ist *RASSF1A* an Prozessen der Spindelorganisation und der Mitose beteiligt.

6 Ausblick

Zahlreiche Analysen zur Promoterhypermethylierung von *RASSF1A* in einer großen Anzahl von Tumorentitäten liegen bereits vor (Dammann *et al.* 2005). Nach wie vor ist es aber von Interesse, weitere Krebsarten zu untersuchen sowie Assoziationen zwischen bestimmten Ereignissen während der Tumorigenese aufzufindig zu machen, um funktionelle Rückschlüsse ziehen zu können. Zur Analyse der epigenetischen Inaktivierung in verschiedenen Tumorentitäten werden derzeit die MSP (*methylation specific PCR*) und die COBRA (*combined bisulfite restriction analysis*) eingesetzt,