

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,

beides nicht quantifizierbare Methoden. Ziel sollte es in zukünftigen Ansätzen sein, die Verfahren quantitativ auswerten zu können. Dabei kann die *real-time*-PCR eingesetzt werden, in der eine mit zwei Fluorophoren markierte Sonde, die an die Sequenz einer bisulfitbehandelten DNA Probe bindet, sofern diese zuvor methyliert vorlag. Die markierte Sonde wird, wenn gebunden bei der PCR abgebaut und die sich quencheden Fluorophore werden freigesetzt und können detektiert werden. Auch eine Markierung der COBRA Primer ist vorstellbar, die Schnittprodukte könnten anteilig vom ungeschnittenen PCR-Produkt quantifiziert werden.

Die Stichprobenzahlen für die Analysen der Weichteilsarkome im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind in den einzelnen Entitäten wie den Leiomyosarkomen oder den Liposarkomen relativ niedrig und sollten ausgebaut werden. Es sollten weitere Tumorarten aus verschiedenen Geweben auf epigenetische Inaktivierung verschiedener in die Tumorentwicklung involvierter Gene analysiert werden. In diesem Zusammenhang sollte weiterführend auf Mutationen z.B. in RAS Proteinen gescreent werden, um sich ausschließende Ereignisse in der Tumorigenese bestimmter Entitäten zu erkennen und Rückschlüsse auf funktionelle Zusammenhänge ziehen zu können.

Mit der Interaktion von RASSF1A mit MST ist dessen funktioneller Partner bekannt und in weiterführenden Analysen sollte die Interaktion von RASSF1A mit LATS, die ja für MST nicht gezeigt werden konnte, obwohl MST LATS phosphoryliert, untersucht werden. Dies kann sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* erfolgen. Der Signalweg in den RASSF1A, MST, WW45 und LATS involviert sind, sollte genauer untersucht werden. So könnten MST, WW45 und LATS in einem Hefe-2-Hybrid Experiment als *bait* eingesetzt werden und neue Interaktionspartner gesucht werden, die den Verlauf der Signalkaskade weiter aufklären könnten. MST besitzt zahlreiche Phosphorylierungsstellen. Die Phosphorylierung des Proteins nach Präzipitation mit RASSF1A sowie mit veränderten Varianten sollte mit phospho-serin- und phospho-tyrosinspezifischen Antikörpern untersucht werden. Aber auch die Suche nach weiteren Interaktionspartnern von RASSF1A aber auch RASSF1C ist sinnvoll, ebenso wie die Suche nach spezifischen Interaktionspartnern der C1 Domäne von RASSF1A. Zusätzlich können auch weitere Mitglieder der Genfamilie z.B. NORE1 (RASSF5) näher analysiert werden. Die Interaktion mit MST könnte ebenso das Ziel der Analyse sein, wie die Auswirkungen der Deletion der SARAH Domänen. MST wird im Verlauf der Induktion der Apoptose durch Caspasen geschnitten, die Interaktion der Schnittprodukte mit RASSF1A sollte analysiert werden, ebenso wie die Lokalisation dieser geschnittenen Fragmente. Zelllinien sollten auf die vollständige Inaktivierung von MST, LATS oder WW45 untersucht werden. In einer solchen Zelllinie könnten durch Generierung stabiler Klone nach Transformation die Folgen der Reexpression analysiert werden.

Die Aktivierung von RASSF1A durch Phosphorylierung sollte in Phosphorylierungsassays weiter untersucht werden. Mutagenisierte Formen, die in Codon 131, Codon 133 und/oder Codon 203 verändert sind, sollten mittels Markierung

oder phosphospezifischer Antikörper analysiert werden. Die Aktivierung von RASSF1A könnte in Abhängigkeit des Zellzyklus oder nach Induktion der Apoptose (z.B. durch Paclitaxel) erfolgen. Die beteiligten Kinasen sind dabei von großem Interesse, um die *upstream* Regulation von RASSF1A detailliert zu erforschen. Der Verlauf der Mitose bei Überexpression verschiedener Varianten von RASSF1A, wie z.B. die mutagenisierten Formen RASSF1AMut133, RASSF1AMut131 oder RASSF1AMut203, könnte weiterführend analysiert werden. Nach transienter Transfektion sollten nicht nur die Mitoseraten bestimmt, sondern auch die Phase der Mitose eingeordnet werden, um einen Hinweis zu erlangen, ob die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung einen Fortlauf oder Stop in der Mitoseprogression verursacht.

Es sollten Antikörper, die RASSF1A spezifisch binden und RASSF1A von RASSF1C unterscheiden, generiert werden und die endogene Expression von RASSF1A sollte untersucht werden. Die Expression in Abhängigkeit des Zellzyklus, sowie die Lokalisation des endogenen Proteins könnten von besonderer Bedeutung sein. Auch das Interaktionsverhalten kann bei Expression von endogenem RASSF1A verändert sein, verglichen mit fusionsproteinmarkiertem RASSF1A. Die Interaktion mit MST kann verifiziert werden, weitere Interaktionspartner nach Immunopräzipitation analysiert werden.

RASSF1A ist ein viel versprechendes Tumorsuppressorgen, dessen Funktion es im Detail aufzuklären gilt. Ansätze der Behandlung von Krebspatienten, in deren Tumoren eine Hypermethylierung von Tumorsuppressorgen ausschlaggebend ist, liegen vor, indem Methyltransferasehemmer wie 5-Aza-2'-Deoxycytidin als Chemotherapeutika eingesetzt werden. Noch sind die Nebenwirkungen beträchtlich, da diese Medikamente nicht selektiv nur Krebszellen angreifen und weitere Forschung ist dringend von Nöten, die eine gezieltere Behandlung und Wirkung auf Krebszellen einmal ermöglichen kann. Die Aufklärung des Signalweges, in den RASSF1A involviert ist, kann Lösungsansätze bieten, effizientere Behandlungsmethoden zu entwickeln.