

Epigenetische Inaktivierung und Funktion des Tumorsuppressorgens RASSF1A im malignen Melanom

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biochemie der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von Herrn Dipl.-Biochem. Matthias Rastetter
geboren am 08.04.1974 in Mannheim
verteidigt am 22.06.2006

Gutachter:

1. Prof. Dr. Klaus Neubert / Dr. habil. Reinhard Dammann
2. Prof. Dr. Wolfgang Schulz

Halle (Saale), den

urn:nbn:de:gbv:3-000010349

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010349>]

Inhalt

<i>Inhalt</i>	<i>I</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>III</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>VI</i>
<i>Abkürzungen</i>	<i>VII</i>
1 <i>Einleitung</i>	10
1.1 Grundlagen der Tumorgenese	10
1.2 Malignes Melanom	11
1.2.1 Charakteristik und Funktion der untersuchten Tumorsuppressorgene.....	12
1.3 Das Tumorsuppressorgen <i>RASSF1A</i>	13
1.4 Zielsetzung	16
2 <i>Material und Methoden</i>	17
2.1 Material	17
2.1.1 Tumormaterial.....	17
2.1.2 Humane Zelllinien.....	17
2.1.3 Bakterienstämme.....	18
2.1.4 Vektoren.....	18
2.1.5 Nährmedien.....	18
2.1.6 Lösungen und Puffer.....	19
2.1.7 Antikörper.....	21
2.1.8 Rekombinante Enzyme.....	21
2.1.9 Proteasen.....	21
2.1.10 Kits.....	22
2.1.11 Geräte.....	22
2.1.12 Chemikalien.....	22
2.2 Methoden	25
2.2.1 DNA-Isolation aus Tumormaterial.....	25
2.2.2 Methylierungsspezifische PCR (MSP) von genomischer DNA aus malignen Melanomen.....	25
2.2.3 Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern gegen <i>RASSF1A</i> und <i>RASSF1C</i>	27
2.2.4 Transformation von humanen Zelllinien.....	28
2.2.5 Präparation von humanen Zellextrakten.....	28
2.2.6 Immunopräzipitation.....	29
2.2.6.1 Präzipitation von GST- <i>RASSF1A</i>	29
2.2.6.2 Präzipitation von Flag- <i>RASSF1A</i>	29
2.2.7 Proteinanalyse mittels SDS-Gelelektrophorese.....	29
2.2.8 Proteinbestimmung.....	30
2.2.9 Westernblot.....	30
2.2.9.1 Evaluation von Antikörpern.....	30
2.2.9.2 Westernblot mit Flag-Antikörpern.....	31
2.2.10 Immunhistologie an Paraffinschnitten von malignen Melanomen.....	31
2.2.11 Expression und Reinigung der MBP-Fusionsproteine.....	32
2.2.12 Mutation von MBP- <i>RASSF1A</i>	33
2.2.13 Analytische Gelfiltration der MBP- <i>RASSF1A</i> -Fusionsproteine.....	34
2.2.14 Limitierte Proteolyse von MBP- <i>RASSF1A</i>	35
2.2.15 Synchronisation und Präparation von <i>IGR1</i> -Zellkernen.....	35
2.2.16 In vitro-Phosphorylierung von MBP- <i>RASSF1A</i> Fusionsproteinen und Mutanten.....	36
2.2.16.1 Phosphorylierung mittels Zellextrakt.....	36

2.2.16.2	Phosphorylierung mittels rekombinanter Kinasen.....	37
2.2.17	Aktivitätsbestimmung von Protein-Kinase A in IGR1-Zellextrakt.....	37
2.2.18	In vitro-Phosphorylierung von Flag-RASSF1A-Fusionsprotein.....	38
3	<i>Ergebnisse</i>	39
3.1	Tumorsuppressorgene in malignen Melanomen der Haut	39
3.1.1	Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in malignen Melanomen und deren Metastasen	40
3.2	Proteinexpression von RASSF1A/C	44
3.2.1	Validierung von Antikörpern gegen RASSF1A/C.....	44
3.2.2	Proteinexpression von RASSF1A/C in humanen Zelllinien	47
3.2.3	Immunhistochemie an Schnitten maligner Melanome	49
3.3	Proteinanalyse von RASSF1A/C als MBP-Fusionsproteine	52
3.3.1	Modifizierungsstellen von RASSF1A.....	52
3.3.2	Phosphorylierungsstellen von MBP-RASSF1A.....	53
3.3.3	Expression von MBP-RASSF-Varianten in E.coli.....	54
3.3.4	Gelfiltration der Fusionsproteine	54
3.3.5	Limitierte Proteolyse von RASSF1A.....	56
3.4	Phosphorylierungsuntersuchung an MBP-Fusionsproteinen	58
3.4.1	Zellfreie Phosphorylierungsstudien an MBP-RASSF1A	59
3.4.2	Phosphorylierung von Flag-RASSF1A aus humanen Zellen.....	62
3.4.3	Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung.....	63
3.4.4	Abhängigkeit der Protein-Kinase A-Aktivität vom Zellzyklus.....	66
4	<i>Diskussion</i>	67
4.1	Epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in malignen Melanomen	67
4.1.1	Inaktivierung von p16 ^{INK4a} durch Promotor-Methylierung	69
4.1.2	Inaktivierung von Rb, DAPK und MGMT durch Promotor-Methylierung	70
4.1.3	Epigenetische Inaktivierung von RASSF1A, p16 ^{INK4a} , DAPK, MGMT und Rb als Biomarker zur frühen Tumordiagnose in malignen Melanomen	70
4.2	Expression von RASSF1A	71
4.2.1	Monoklonale Mausantikörper gegen RASSF1A.....	71
4.2.2	RASSF1A-Expression in malignen Melanomen und Zelllinien in Abhängigkeit der Promotor-Methylierung	72
4.3	Funktion von RASSF1A	74
4.3.1	Einfluss von RASSF1A auf den Zellzyklus und die Apoptose.....	75
4.3.2	Phosphorylierung von RASSF1A und RAS-Effektoren	78
4.3.3	Phosphorylierung von RASSF1A als Teil der mitotischen Zellzykluskontrolle.....	82
5	<i>Zusammenfassung</i>	87
5.1	Promotor-Methylierung von Tumorsuppressorgenen in malignen Melanomen	87
5.2	Proteinexpression von RASSF1A in malignen Melanomen	88
5.3	Funktion von RASSF1A	89
6	<i>Ausblick</i>	91
6.1	Intratumorale Promotor-Methylierung von Tumorsuppressorgenen	91
6.2	Funktion von RASSF1A	91
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	93
8	<i>Anhang</i>	102

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1:** Proteindomänen von RASSF1A (Quelle: <http://us.expasy.org/prosite/>)..... 14
- Abbildung 2.1:** Mutationen von MBP-RASSF1A; MBP: Maltose-Bindeprotein; DAG: Diacylglycerol-Bindemotiv; ATM: ATM-Kinase-Phosphorylierungsstelle; RA: Ras-Assoziationsmotiv; SARAH: Salvador/RASSF/Hippo-Interaktionsmotiv; CAAX: Prenylierungsstelle..... 34
- Abbildung 3.2:** Darstellung der methylierungsspezifischen PCR (MSP) in einer Metastase für die fünf untersuchten Tumorsuppressorgene RASSF1A, MGMT, DAPK, Rb und p16^{INK4a}. Die Gelausschnitte zeigen die Ergebnisse der jeweiligen intratumoralen MSP. m: Primerpaare für methylierten Promotor; u: Primerpaare für unmethylierten Promotor; A549: Promotor-Methylierung von RASSF1A; Meth: in vitro methylierte DNA aus HF53 oder HeLa als Positivkontrolle; HeLa und HF53: Kontrollen für unmethylierten Promotor; A-F: Proben aus einem Tumor; M: Marker..... 42
- Abbildung 3.3:** Darstellung verschiedener Westernblots, bei welchen unterschiedliche Antikörper gegen MBP (A) sowie gegen die Fusionsproteine MBP-RASSF1A (B) und MBP-RASSF1C (C) getestet wurden. Es wurde ein 10%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel geblottet, anschließend die Membran in schmale Streifen geschnitten und mit eB114- und 2A10-Antikörper gegen RASSF1A sowie 6A9- und 2C3-Antikörper gegen RASSF1C die Bindung der Antikörper geprüft. Als Konjugat wurde Anti-Maus-IgG mit Peroxidase verwendet..... 45
- Abbildung 3.4:** Darstellung eines Westernblots von GST-RASSF1A, bei dem verschiedene Antikörper gegen humanes GST-RASSF1A getestet wurden. Die Antikörper 2A10 und eB114 sind Primärantikörper gegen RASSF1A, 2C3 und 6A9 sind Primärantikörper gegen RASSF1C, GST ist der Primärantikörper gegen den GST-Proteintag. Als Konjugat wurde Anti-Maus-IgG mit Peroxidase verwendet. 46
- Abbildung 3.5:** Immunhistochemische Färbung von normaler Haut in Paraffinschnitten. Es wurden die RASSF1A-Antikörper eB114 und 2A10 verwendet. Die stark gefärbten Strukturen sind gefäßbildende Endothelzellen. 47
- Abbildung 3.6:** Darstellung der RASSF1A-MSP Untersuchungen für Melanomzelllinien. M: Marker; m: spezifische Primer für methylierte Promotoren; u: spezifische Primer für unmethylierte Promotoren; Meth.: in vitro methylierte DNA von HeLa S3; HeLa: Kontrolle, normale DNA aus HeLa S3 Zellen diente als Positivkontrolle..... 48
- Abbildung 3.7:** Westernblot nach 10%-SDS-PAGE des Gesamtproteinextraktes verschiedener Zelllinien mit zwei verschiedenen primären Antikörpern gegen RASSF1A und Konjugatkontrolle 49
- Abbildung 3.8:** Darstellung einer histochemischen Färbung einer Melanommetastase in 12-facher Vergrößerung. In Bild HE ist eine HE-Färbung und in Bild eB114 eine immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper eB114 zu sehen. HE Pfeil 1: blau gefärbter prominenter Zellkern; HE Pfeil 2: angeschnittenes Blutgefäß; eB114 Pfeil 1: blau gefärbter prominenter Zellkern; eB114 Pfeil 2: Tumorzellen mit RASSF1A-Expression; eB114 Pfeil 3: Endothelzellen mit RASSF1A-Expression..... 50
- Abbildung 3.9:** Graphische Darstellung von RASSF1A-positiven Zellen in verschiedenen Tumoren mit unterschiedlicher RASSF1A-Promotor-Methylierung. Für die untersuchten Tumore lag eine unterschiedliche Anzahl an Schnitten vor, so dass in der Graphik nicht alle Tumore die gleiche Anzahl an Messpunkten aufweisen. Es wurden in Tumorschnitten die RASSF1A-positiven Zellen in einem High Power Field (40x) ausgezählt und arithmetisch gemittelt (siehe Anhang Tabelle 8.11). Die Standardabweichung ist für Werte unter 0% und über 100% nicht dargestellt..... 52

Abbildung 3.10: Postulierte Phosphorylierungsposition von RASSF1A unter http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtm ; C1_1 und C1_3: DAG-Domäne; PAD_porph: ATM-Domäne; RA: RA-Domäne.....	54
Abbildung 3.11: Die vier Diagramme zeigen die Läufe der Gelfiltrationen von MBP-RASSF1A (A), MBP-RASSF1A-S203F (B), MBP-RASSF1A- Δ ATM (C) und MBP-RASSF1C (D). Der rote Graph zeigt die Absorption bei 220 nm, der schwarze bei 280 nm (x10) und der grüne bei 400 nm (x200). Bei 220 nm absorbiert das Rückgrat der Peptidkette, bei 280 nm die aromatischen Reste von Aminosäuren und bei 400 nm können in Proteine eingelagerte Kofaktoren detektiert werden. E: Proteineichgerade für alle abgebildeten Gelfiltrationen	56
Abbildung 3.12: Limitierte Proteolyse mit A: Chymotrypsin, Reaktionszeit: 10 / 20 / 45 / 90 min.; B: Trypsin, Reaktionszeit: 10 / 20 / 45 / 90 min.; C: Proteinase-K, Reaktionszeit: 10 / 20 / 45 min.; SDS-Gele (10%) Comassie-gefärbt	57
Abbildung 3.13: Darstellung eines Comassie-gefärbten 10%-igen SDS-Polyacrylamidgels in A mit MBP-RASSF1A/C-Fusionsproteinen und Mutanten nach einer Phosphorylierung mit γ^{32} P-ATP. In B ist die Abbildung der phosphorylierten Fusionsproteine auf einem Phosphorschirm dargestellt.....	59
Abbildung 3.14: Darstellung einer Phosphorylierung von MBP-RASSF1A mit rekombinanter Protein-Kinase A und Casein-Kinase I. Bild A zeigt ein Comassie-gefärbtes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel und Bild B die Abbildung von A auf einem Phosphorschirm.....	60
Abbildung 3.15: Darstellung der Phosphorylierung von MBP-RASSF1A und Mutationen sowie von RASSF1C mit Protein-Kinase A. Bild A zeigt ein Comassie-gefärbtes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel und Bild B das Gel von A auf einem Phosphorschirm.....	61
Abbildung 3.16: Phosphorylierung von humanem Flag-RASSF1A und Flag-RASSF1A-S203F; Bild A: Westernblot mit Anti-Flag als primärem und Anti-Maus-IgG-Peroxidase als sekundärem Antikörper Bild B: Westernblot nach Inkubation auf Phosphorschirm;.....	62
Abbildung 3.17: Zellzyklusstatus von synchronisierten IGR1-Zellen 0 h, 2h, 5 h, 7 h, 9 h nach der Entfernung von Methotrexat	63
Abbildung 3.18: Darstellung einer zellzyklusabhängigen Phosphorylierung von RASSF1A durch Zellextrakt synchronisierter IGR1-Zellen. In Bild A ist ein Comassie-gefärbtes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel und in B die Abbildung von A auf einem Phosphorschirm zu sehen. u: Zellextrakt aus unbehandelten Zellen, 0-9 h: Zellextrakt aus Zellen 0-9 h nach Methotrexatentfernung; * potentielle Interaktionspartner	64
Abbildung 3.19: Darstellung der relativen Phosphorylierung von MBP-RASSF1A in Abhängigkeit des Zellzyklus. Die Phosphorylierung wurde mit Zellextrakt aus synchronisierten IGR1-Zellen durchgeführt.	65
Abbildung 3.20: Protein-Kinase A-Aktivität in Zellextrakt aus unbehandelten und synchronisierten IGR1-Zellen; MTX: Methotrexat.....	66
Abbildung 4.1: Der Einfluss von RASSF1A auf den Zellzyklus: RASSF1A interagiert mit unterschiedlichen Faktoren wie z. B. dem Transkriptionsfaktor p120 oder auch mit dem APC-Aktivatoren CDC20 und ist so in der Lage, den Zellzyklus anzuhalten. RASSF1A bewirkt dies auch durch die negative Regulation von Cyclin D1, p65 und JNK.	75
Abbildung 4.2: Beteiligung von RASSF1A an einem Apoptose vermittelnden Prozess, der durch die Stimulation mit TNF- α ausgelöst werden kann.....	77

- Abbildung 4.3:** RASSF1A kann durch die Interaktion mit MST1 dessen Autophosphorylierung unterbinden und auf diese Weise sowie durch die Interaktion mit MST1 und CNK1 die apoptotische Wirkung von MST1 unterdrücken. 77
- Abbildung 4.4:** Der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg wird durch Wachstumsfaktoren, die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen binden, aktiviert. Dies führt zur Aktivierung von RAS, welches seinerseits durch die RAF-Aktivierung eine Phosphorylierungskaskade von MEK und ERK aktiviert. ERK reguliert durch die Phosphorylierung vieler Ziele unterschiedliches Zellverhalten, wie z. B. Zellproliferation oder Apoptose..... 79
- Abbildung 4.5:** Modell zur Aktivierung von RAF-1. In unstimulierten Zellen bindet das Protein 14-3-3 an phosphoryliertes Serin 259 und Serin 621 und stabilisiert so die inaktive Konformation von RAF-1. Durch rezeptor-vermittelte Aktivierung von RAS bindet RAF-1 an RAS-GTP und ändert seine Konformation, in der das Protein 14-3-3 phosphoryliertes Serin 259 freigibt. Durch weitere Phosphorylierung an Serin 338 und Tyrosin 341 wird RAF-1 aktiviert und kann das rezeptorvermittelte Signal durch Phosphorylierung von MEK weiterleiten [Grafik aus (Mercer and Pritchard, 2003)]. 80
- Abbildung 4.6:** Kontrolle des AP-Komplexes (APC). In der G1-Phase wird die Anreicherung von mitotischem Cyclin durch den APC-CDH1-Komplex inhibiert. Der Übergang von der G1-Phase zur S-Phase ist durch die Aktivierung von EMII (early mitotic inhibitor 1) gekennzeichnet. Dieser wird über die Cyclin D- und E2F-Regulation transkribiert. Cyclin A wird durch die Aktivität von EMII angereichert und die Zellen treten in die S-Phase ein. Während der späten Prophase wird EMII durch die Aktivierung von APC-CDC20 abgebaut. RASSF1A könnte hier regulierend wirken, da Cyclin A durch eine Überexpression nicht mehr abgebaut wird. RASSF1A wirkt aber etwas später im Verlauf des Zellzyklus als EMII. Der Übergang von der Metaphase zur Anaphase ist durch die Aktivierung des APC-CDH1 Komplexes gekennzeichnet, durch den der Abbau von Cyclin B gesteuert wird [Grafik aus (Jackson, 2004)]. P: Prophase; PM: Prometaphase; M: Metaphase; A: Anaphase 83
- Abbildung 4.7:** APC-CDC20 Komplex während der Mitose. Die Steuerung des Cyclin A-Abbaus durch APC-CDC20 findet nach dem Abbau von EMII statt und kann durch RASSF1A-CDC20-Interaktion inhibiert werden. Sowohl EMII als auch RASSF1A sind in der frühen Mitose an den Spindelpolen lokalisiert und könnten so die genaue Aktivität von APC koordinieren. PKA hat ebenfalls die Möglichkeit, den AP-Komplex zu inhibieren. Ein möglicher Einfluss von PKA auf RASSF1A und die Mitose: PKA phosphoryliert RASSF1A in Abhängigkeit des Zellzyklus in der G2/M-Phase. Eine Aktivierung von RASSF1A durch diese Phosphorylierung hätte in diesem Modell eine Zellzyklus-Inhibierung in der Prophase zur Folge. Eine Inhibierung durch eine Phosphorylierung würde den Zellzyklus in dieser Phase aktivieren [Grafik aus (Jackson, 2004) verändert]. 85
- Abbildung 4.8:** Die bisher identifizierten Phosphorylierungsstellen von RASSF1A werden von der ATM-Kinase und von PKA phosphoryliert. Die Auswirkungen dieser Phosphorylierungen konnte noch nicht aufgeklärt werden..... 86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Humane Zelllinien.....	17
Tabelle 2.2:	E.coli Stämme.....	18
Tabelle 2.3:	Primer für Methylierungsanalysen.....	27
Tabelle 2.4:	Genspezifische MSP-Bedingungen und Produktlängen.....	27
Tabelle 2.5:	Antikörper für Westernblot und Immunhistologie	31
Tabelle 2.6:	Primer für MBP-RASSF1A-Mutationen.....	34
Tabelle 2.7:	Endoproteasen und Reaktionsbedingungen der limitierten Proteolyse.....	35
Tabelle 3.8:	Intratumorale genspezifische Promotor-Methylierungsmuster.....	44
Tabelle 3.9:	Potentielle Modifizierungsstellen von RASSF1A nach Abgleich mit der Datenbank auf http://ca.expasy.org/prosite/	53
Tabelle 8.10:	Vergleich von RASSF1A Promotor-Methylierung mit RASSF1A-Expression durch immunhistochemische Färbung in ausgewählten Melanomen (3 primäre Tumore; 1 Lymphknotenmetastase; 3 subcutane Metastasen).	102
Tabelle 8.11:	Patienten, Tumor-Kennzeichen (Typ und Ulceration), und Promotor-Methylierung in 15 primären Melanomen und 8 Fällen mit einzelner oder multipler Melanometastase.	103
Tabelle 8.12:	Verschiedene Zellzyklusinhibitoren, deren Wirkung und das Zellzyklusstadium, in dem das Zellwachstum arretiert wird	I

Abkürzungen

μ	micro
5-Aza-CdR	5-aza-2'-deoxycytidin
APC	Anaphase-Promoting-Complex
ATM	Ataxia-Telangiectasia-mutierte Kinase
ATP	Adenosinetriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Albumin Bovine, Fraktion V
CDK 4/6	Cyclin-abhängige Kinase 4/6
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CNK	connector enhancer of KSR
DAG	Diacylglycerol
DAPK	Death Associated Protein Kinase
dATP	Desoxyadenosintriphosphate
dCTP	Desoxycytosintriphosphate
dGTP	Desoxyguanosintriphosphate
DMEM	Dulbecco's minimal essentielles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP _s	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EGTA	Ethylene-glycol-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
h	Stunde
HF	Humane Fibroblasten
HPO	Hippo (Protein-Kinase)
JNK	c-Jun NH ₂ -terminale-Kinase

kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
KSR	Kinase-Suppressor von Ras-1
l	Liter
LOH	loss of heterozygosity
M	molar
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinasen
MGMT	O(6)-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
MSP	Methylierung spezifische PCR
MST1/2	<i>Mammalian Sterile 20 like 1/2</i> Kinase
NFκ-B	Nekrosefaktor κ-B
NP-40	Nonidet P- 40
p16 ^{INK4a}	Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase 4
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RA	RAS-Assoziationsdomäne
<i>RASSF1</i>	<i>RAS-association domain family 1</i>
<i>Rb</i>	Retinoblastom
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	reverse transkription-PCR
s	Sekunde
SARAH	Salvador-RAS-Hippo Interaktionsmotiv
Sav	Salvador (Gerüstprotein)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
T _{an}	annealing-temperature
TBE	Tris-borate-EDTA-Puffer
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
Tris-HCL	Tris

UV

ultraviolett

Wts

Warts (Protein-Kinase)

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Tumorgenese

Unter den Begriff „Krebs“ fallen etwa 200 verschiedene Krankheiten, die zusammen mehr als 20% aller Todesfälle in den westlichen Industrieländern verursachen. Die unterschiedlichen Krebsarten sind durch einige grundlegende Gemeinsamkeiten gekennzeichnet. Beispielsweise durch eine erhöhte Proliferation von Zellen, welche sich der Kontrolle des umliegenden Gewebes entzieht. Mit diesem Merkmal geht auch die Möglichkeit verloren, den kontrollierten Zelltod, die Apoptose, auszulösen. Weiterhin ist bei Krebszellen eine veränderte, vom ursprünglichen Gewebe unterschiedliche Zelldifferenzierung zu beobachten. Neben verändertem Stoffwechsel und genomischer Instabilität können sich Krebszellen aus ihrem Gewebe lösen und sowohl über den Lymphkreislauf als auch über den Blutkreislauf an anderen Stellen im Körper Metastasen ausbilden.

Diese Unterschiede zu normalen Zellen sind auf genetische Veränderungen zurückzuführen. Durch chromosomale Veränderungen wie Translokation, Insertion, Deletion und Punktmutationen können Gene und Genprodukte sowie deren Funktionalität verändert werden. Abhängig von der Funktion der betroffenen Gene können solche Veränderungen zur unkontrollierten Proliferation führen und somit zur Tumorbildung beitragen.

Als Onkogene werden Gene bezeichnet, durch deren Mutation oder Deregulation die Tumorprogression direkt gefördert wird. Tumorsuppressorgene charakterisieren die andere Klasse von Genen, die bei der Tumorbildung eine hemmende Rolle übernehmen. Für Tumorsuppressorgene wurde von Knudson die *two hit hypothesis* formuliert, die davon ausgeht, dass die Mutation eines Tumorsuppressorgens auf einem Allel nicht ausreicht, um aus einer normalen Zelle eine Tumorzelle entstehen zu lassen (Knudson, 1971). Vielmehr müssen solche Gene durch eine Veränderung auf dem zweiten Allel in ihrer Funktion oder Regulation inaktiviert werden, um Normalzellen zu Tumorzellen zu transformieren. So verliert die Zelle ihre Heterozygotie für das entsprechende Tumorsuppressorgen (*Loss of heterozygosity* – LOH).

Eine mögliche Regulationsänderung bei Tumorsuppressorgen ist epigenetisch bedingt. Epigenetik bezeichnet im Allgemeinen die stabile Vererbung der Genexpression, die nicht auf Änderungen des Genotyps zurückzuführen sind, sondern auf die Organisation von chromosomalen Strukturen. Diese Organisation ist generell reversibel, bleibt aber in den meisten Fällen bei einer Zellteilung erhalten (Laird, 2005). So können Gene im Euchromatin, bei dem die Verpackungsdichte der Nucleosomen

geringer ist, expremiert werden, während Gene im Heterochromatin, das aus dicht gepackten Nucleosomen besteht, nicht expremiert werden. Die Chromatinstruktur wird unter anderem durch Acetylierung und Methylierung der Histone beeinflusst.

Die Expression von Genen kann auch durch die Methylierung von Cytosinen am C-5 Kohlenstoff in CG-Dinucleotiden gesteuert werden. Die CG-Dinucleotide sind im menschlichen Genom in geringerer Häufigkeit vertreten. Etwa 70% dieser genomischen CG-Dinucleotide sind methyliert. In etwa 60% der Promotorregionen von expremierten Genen sind über einen Bereich von 0,5 bis 3 kb ungewöhnlich viele CG-Dinucleotide zu finden. Diese CG-reichen Sequenzen werden CpG-Inseln genannt (Bird, 1986). Die Methylierung von Cytosinen in diesen CpG-Inseln ist eine Möglichkeit, die Chromatinstruktur zu ändern und das Gen stillzulegen (Laird, 2005). In Krebszellen ist häufig eine solche Inaktivierung von verschiedenen Tumorsuppressorgenen zu beobachten, die in Normalzellen nicht auftritt (Jones, 2002).

1.2 Malignes Melanom

Die meist verbreiteten Krebsarten sind epithelialen Ursprungs und werden als Karzinome bezeichnet. Die zwei am häufigsten auftretenden Hautkarzinome sind das Basalzell-Karzinom und das Schuppencell-Karzinom, wovon keines lebensbedrohend ist. Eine weniger häufige Form von Hautkrebs ist das Melanom, dessen Morbidität stetig zunimmt (Schulz, 2005). So sind etwa sieben bis acht von 100.000 Mitteleuropäerinnen und Mitteleuropäern von malignen Melanomen betroffen (Jung, 1995).

Das von Melanozyten gebildete maligne Melanom ist ein hochgradig maligner Tumor, der frühzeitig auf lymphogenem und hämatogenem Weg metastasiert. Diese ausgeprägte Fähigkeit zur Metastasierung erklärt sich dadurch, dass Melanozyten nicht im Gewebeverband wachsen und so auch keine Interzellularbrücken bilden. Sie segregieren nach der Zellteilung.

Der durch das Onkogen RAS vermittelte Signalweg spielt bei malignen Melanomen eine entscheidende Rolle bei der Tumorentwicklung (Rodolfo et al., 2004). RAS, welches durch rezeptorvermittelte Tyrosin-Kinasen (RTK) aktiviert wird und durch gebundenes GTP aktiviert bleibt, kann seinerseits eine Reihe von mitogen-aktivierten Kinasen (MAPK) zur Signalweitergabe durch Phosphorylierung anregen. Ein möglicher Signalweg wird durch RAF-Kinasen weitergeleitet und aktiviert über Cyclin D1 die Zellproliferation (Mercer and Pritchard, 2003; Repasky et al., 2004). Ein Vertreter der RAF-Kinasen, B-RAF, weist in 50% aller Melanome Mutationen auf, die eine permanente Aktivität und eine unkontrollierte Proliferation verursachen (Rodolfo et al., 2004).

Das Tumorsuppressorgen *Ras Association Domain Family 1 (RASSF1A)* wirkt dieser unkontrollierten Proliferation entgegen, in dem es die Akkumulation von Cyclin D1 inhibiert (Shivakumar et al., 2002). Weitere Tumorsuppressorgene, die das Signal von Cyclin D1 inhibieren können und somit die Zellproliferation unterdrücken, sind *p16^{INK4A}* und *Retinoblastom (Rb)* (Satyanarayana and Rudolph, 2004). Eine Inaktivierung eines oder mehrerer dieser Tumorsuppressorgene könnte für die Tumorprogression von malignen Melanomen eine entscheidende Rolle spielen.

Neben Genen, welche in die Signaltransduktion und deren Kontrolle involviert sind, besitzen auch DNA-Reparaturenzyme eine tumorsuppressive Wirkung. Das Gen für *O(6)-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)* ist eines der Gene, welches bei Überexpression in Mäusen die durch Nitrosamin induzierte Tumorentstehung unterdrücken kann (Ishikawa et al., 2004).

Eine Tumorprogression kann sich auch durch das Fehlen apoptotischer Signale entwickeln. Ein apoptotisches Signal wird unter anderem durch *Death Associated Protein Kinase (DAPK)* vermittelt, deren Gen durch Methylierung des Promoters in verschiedenen Tumoren stillgelegt wird (Farrell and Clayton, 2003).

Daher wurden die Promotoren von *RASSF1A*, *p16^{INK4a}*, *Rb*, *MGMT* und *DAPK* hinsichtlich ihrer Methylierung untersucht, um den Einfluss dieser Gene auf die Entwicklung in malignen Melanomen zu beurteilen.

1.2.1 Charakteristik und Funktion der untersuchten Tumorsuppressorgene

RASSF1A ist ein Gen der *Ras Association Domain 1 Family*, die auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 im Segment p21.3 lokalisiert ist. Ein Verlust dieses chromosomalen Segmentes in der Zelle ist eines der häufigsten Veränderungen bei Lungenkrebs und wurde in über 90% des kleinzelligen Lungenkrebs beobachtet (Dammann et al., 2000). Dieser Befund legt den Verdacht nahe, dass in diesem Segment ein Tumorsuppressorgen (TSG) liegen könnte. *RASSF1A* wurde als ein potentielles TSG in dieser Region identifiziert (Dammann et al., 2000). Die zwei Hauptformen dieser Genfamilie, *RASSF1A* und *RASSF1C*, werden von unterschiedlichen CpG-reichen Promotoren aus transkribiert. Eine Hypermethylierung der CpG-Region ist die häufigste epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A*, die in humanen Krebszellen gefunden wurde. Diese Inaktivierung wurde in vielen Primärtumoren (u. a. Lunge, Brust, Pankreas, Niere, Leber) gezeigt (Pfeifer and Dammann, 2005).

Die Methylierung des *RASSF1A*-Promoters könnte daher als diagnostischer und prognostischer Marker dienen. Funktionelle Analysen von *RASSF1A* weisen auf einen apoptotischen Einfluss, auf die Stabilisierung von Mikrotubuli und einen mitotischen Einfluss während des Zellzyklus hin (Seidel et al., 2005).

p16^{INK4a} ist ein Peptid, welches Kinasen inhibieren kann, die von Cyclinen der Gruppe D aktiviert werden. Die Wirkung dieser Kinasen (CDK4/6) lassen Zellen von der G1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase eintreten. Eine Inaktivierung dieses Gens schaltet den Inhibitor der CDK4/6-Kinasen aus, der in der Lage ist, Zellen in der G1-Phase zu halten und somit das Wachstum zu kontrollieren (Sherr, 1996).

Rb ist die Kurzform für das Gen *Retinoblastom*, das nach dieser Krebsart benannt, eine tumorsuppressive Wirkung hat und im Retinoblastom inaktiv ist. Das Rb-Protein wird von den Cyclin-abhängigen Kinasen CDK 4/6 phosphoryliert. Auf diese Weise inaktiviertes Rb entlässt den Transkriptionsfaktor E2F, welcher den Zellzyklus stimuliert und Zellen von der G1-Phase in die S-Phase treten lässt. Eine epigenetische Inaktivierung von *Rb* führt wie bei *p16^{INK4a}*-Inaktivierung zu einem unkontrollierten Zellwachstum (Walker and Hayward, 2002).

DAPK ist eine Ca^{2+} /Calmodulin-regulierte Serin/Threonin-Kinase, die als apoptotischer Mediator fungiert. *DAPK* ist mit Aktinfilamenten assoziiert und phosphoryliert die leichte Kette des Myosins. Diese Phosphorylierung verursacht das so genannte *membrane blebbing*, eine Blasenbildung an der Zellmembran, welche ein Teil des programmierten Zelltodes ist (Shohat et al., 2002).

MGMT, O(6)-Methylguanin-DNA-Methyltransferase ist ein wichtiges Enzym in der DNA-Reparaturkaskade. Es entfernt mutagene und zytotoxische Reste von der Position O(6) am Guanin, dem bevorzugten Angriffspunkt von Karzinogenen und alkylierenden Chemotherapeutika. Die Inaktivierung von *MGMT* hat für Tumore zum einen die Wirkung, dass sich Mutationen schneller ausbreiten und somit andere Tumorsuppressorgene oder Onkogene von Mutationen betroffen sein können. Zum anderen reagieren Tumore ohne *MGMT* sensitiver auf alkylierende Chemotherapeutika, mit welchen die Tumorgenese wirksamer unterbunden werden könnte (Esteller and Herman, 2004).

1.3 Das Tumorsuppressorgen *RASSF1A*

Das Tumorsuppressorgen *RASSF1A* auf Chromosom 3p21.3 könnte in der Lage sein, Zellen, die sich durch eine RAS- oder B-RAF-Mutation zu Krebszellen entwickeln, in ihrer Proliferation zu hemmen. Bei malignen Melanomen wurde bei 57% und bei Melanomzelllinien bei 100% entweder eine N-RAS, K-RAS oder B-RAF-Mutation nachgewiesen. Weiterhin war eine Inaktivierung von *RASSF1A* bei fast allen malignen

Melanomen und bei allen Melanomzelllinien zu beobachten, die entweder eine N-RAS oder eine B-RAF-Mutation zeigten (Reifenberger et al., 2004). Bei Pankreas- und Kolonkarzinomen wurde ein umgekehrter Zusammenhang zwischen einer RASSF1A Inaktivierung und einer K-RAS-Mutation gezeigt, bei dem entweder RASSF1A inaktiviert oder K-RAS mutiert war (Dammann et al., 2003a; Sakamoto et al., 2004). Aufgrund dieser Möglichkeiten wurden sowohl die Funktion als auch die Inaktivierung von *RASSF1A* näher untersucht.

Die Funktion von RASSF1A ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch mehren sich die identifizierten Interaktionspartner, welche die Funktion als Tumorsuppressorgen untermauern. Auch können durch Interaktionen Rückschlüsse zur Funktionsweise gezogen werden. Die bisher bekannten Funktionen beeinflussen den Zellzyklus und die Apoptose von Zellen.

So ist RASSF1A in der Lage, den Zellzyklus zu inhibieren, in dem es zum Beispiel die Akkumulation von Cyclin D1 verhindert oder mit dem Transkriptionsfaktor p120^{E4F} interagiert. Die Bindung an p120 verhindert die Transkription von Cyclin A2, welches für die Übergänge der Zellzyklusphasen von der G1- zur S-Phase sowie von der G2- zur M-Phase verantwortlich ist. Durch Interaktion mit CDC20, einem Aktivator des *Anaphase Promoting Complex* (APC), kann RASSF1A in die Mitose eingreifen, da CDC20 nicht mehr in der Lage ist, APC zu aktivieren (Ahmed-Choudhury et al., 2005; Fenton et al., 2004; Rong et al., 2004; Shivakumar et al., 2002; Song and Lim, 2004).

Durch Interaktion mit der proapoptotischen Protein-Kinase MST1 kann RASSF1A die Apoptose verhindern, während die Interaktion mit MAP-1/C19ORF eine durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) vermittelte Apoptose auslöst. So scheint RASSF1A die Apoptose sowohl verstärken, als auch verhindern zu können (Baksh et al., 2005; Liu et al., 2005a; Liu et al., 2005b; Liu et al., 2005c; Praskova et al., 2004).

Über mögliche Funktionen können die Domänen von RASSF1A Aufschluss geben.

Die Primärstruktur des Proteins RASSF1A weist folgende Strukturmodule auf:

RASSF1A

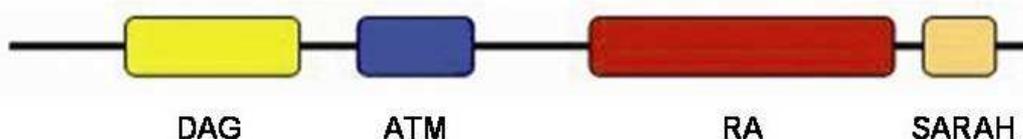


Abbildung 1.1: Proteindomänen von RASSF1A (Quelle: <http://us.expasy.org/prosite/>)

- **DAG-Domäne (51-101)** ist ein Bindungsmotiv für den membranständigen *second messenger* Diacylglycerol (DAG). DAG aktiviert eine Klasse von

Protein-Serin/Threonin-Kinasen, die als Protein-Kinase-C (PKC) klassifiziert werden (Azzi et al., 1992). Phorbolster sind in der Lage, direkt an diese Struktur zu binden und damit die PKC zu stimulieren. Durch diese N-terminale Region, die auch als C1-Region bezeichnet wird, ist das Protein in der Lage, Phorbolster und DAG-Phospholipid zinkabhängig zu binden (Ono et al., 1989). Die DAG-Bindedomäne koordiniert durch sechs Cysteine und zwei Histidine, die in dieser Region stark konserviert sind, zwei Zn^{2+} Ionen.

- **ATM-Domäne 125-138:** Das Gen *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) kodiert eine Serin/Threonin-Kinase, die eine kritische Rolle im Zellzyklus sowie für die genomische Stabilität der Zelle spielt. Das bevorzugte Bindungsmotiv für die ATM-Kinase ist eine LSQE-Sequenz in der Primärstruktur des Proteins (Kim et al., 1999; O'Neill et al., 2000).
- **RA-Domäne 194-288:** RAS-Proteine gehören zu den Signal-vermittelnden Kinasen, die im GTP-gebundenen Zustand aktiv und im GDP-gebundenen Zustand inaktiv sind. RAS ist ein Molekül, welches auf die Zellproliferation Einfluss nimmt und ein weites Spektrum an Effektormolekülen aufweist. Dadurch wirkt RAS über viele verschiedene Signalwege. Die RAS-Assoziations-Domäne (RA) kommt je nach Protein ein- oder zweimal in einer Vielfalt von Signalmolekülen vor (Kido et al., 2002; Liao et al., 1999; Ponting and Benjamin, 1996). Strukturell besteht die RA-Domäne aus einer viersträngig gemischten β -Faltblatt-Struktur, unterbrochen von einer zwölf Aminosäuren enthaltenden α -Helix und zwei weiteren α -Helices (Huang et al., 1997). Die Hauptinteraktion zwischen RAS und der RA-Domäne beruht auf den zwei antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen $\beta 2$ von Ras und $\beta 2$ der RA-Domäne (Huang et al., 1998). Gezeigt werden konnte eine direkte Interaktion von RASSF1A mit RAS sowie eine indirekte Interaktion, die durch den *Novel RAS Effector* (NORE 1) vermittelt wurde (Praskova et al., 2004; Vos et al., 2000; Vos et al., 2003b).
- **SARAH-Domäne 290-373:** Der Name SARAH leitet sich von den drei Tumorsuppressorgenen Salvador, RASSF und Hpo ab. SARAH ist ein C-terminales Strukturmotiv von etwa 50 Aminosäuren, welches in den drei Klassen der oben genannten Tumorsuppressorgene zu finden ist. In den Proteinfamilien Sav und Hpo vermittelt die SARAH-Domäne eine heterotypische Interaktion, welche das Signal von Hpo über das Strukturprotein Sav an eine weitere Komponente des Signalwegs Wts weitergibt. Zusätzlich ist

diese Domäne aber auch in der Lage, eine homotypische Interaktion, wie im Falle des menschlichen Hpo-Orthologs MST1, zu vermitteln. Die postulierte Sekundärstruktur für die SARAH-Domäne ist eine lange α -Helix, die sich fast über den gesamten Bereich der konservierten Regionen erstreckt (Scheel and Hofmann, 2003).

Das Protein RASSF1C, welches von einem eigenen Promoter transkribiert wird, weist bis auf die DAG-Domäne die gleichen Strukturen auf wie RASSF1A.

1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte das Tumorsuppressorgen RASSF1A unter verschiedenen Aspekten näher charakterisiert werden. Zunächst galt es die Inaktivierung von *RASSF1A* durch die Promotor-Methylierung in malignen Melanomen zu untersuchen und diese mit den Tumor assoziierten Genen *Rb*, *p16^{INK4a}*, *DAPK* und *MGMT* zu vergleichen. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Probenvorbereitung des Tumormaterials. So wurden in der Hautklinik der Martin-Luther-Universität die einzelnen Tumore unter morphologischen Gesichtspunkten in mehrere Schnitte aufgeteilt. Auf diese Weise konnte die intratumorale Inaktivierung von RASSF1A und den weiteren Genen untersucht werden.

Nach den Methylierungsstudien bei RASSF1A wurde untersucht, ob sich diese Ergebnisse auch histologisch abbilden lassen. Hierzu wurden zunächst in einer Zusammenarbeit mit Dr. Weber vom Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Antikörper gegen RASSF1A generiert, diese mit einem inzwischen kommerziell verfügbaren Antikörper evaluiert und an ausgewählten Paraffinschnitten von malignen Melanomen getestet.

Ein weiteres Ziel war die Funktion von RASSF1A bei malignen Melanomen zu untersuchen. Der Einfluss auf den Zellzyklus erfordert die Funktionsregulation von RASSF1A durch Interaktion mit anderen Proteinen, die aktivierend oder hemmend wirken. Die Regulation kann auch durch unterschiedliche Proteinmodifikationen wie zum Beispiel durch Glykosylierung oder Phosphorylierung erfolgen. Die Fragestellung, die sich aus diesem Ansatz ergibt, ist die nach einer möglichen Modifikation von RASSF1A sowie die Frage, ob diese Modifikation in einem Zusammenhang mit dem Zellzyklus stehen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tumormaterial

Um den Einfluss der Promotor-Methylierung von RASSF1A in malignen Melanomen näher zu charakterisieren, wurden in Zusammenarbeit mit der Hautklinik der Martin-Luther-Universität, unter Leitung von PD Dr. Peter Helmbold, aus Tumoren in Abhängigkeit ihrer Makrostruktur mehrere Schnitte angefertigt. Jeder Schnitt wurde in Längsrichtung in zwei mindestens 1 mm breite Fragmente geteilt. Eines dieser Fragmente wurde in Paraffin eingebettet, während das Andere sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert wurde. Diese Tumorfragmente waren die Grundlage für die Methylierungsuntersuchungen der verschiedenen Promotoren.

2.1.2 Humane Zelllinien

Tabelle 2.1: *Humane Zelllinien*

Zellkultur	Medium (10% FCS, 1% PS)	Zelltyp	Zellnummer
A549	DMEM	Adenokarzinom (Lunge)	ACC107 (DSMZ)
H740	DMEM	kleinzelliges Lungenkarzinom	CRL-5840 (ATCC)
IGR1	DMEM	Metastase von malignem Melanom	ACC236 (DSMZ)
MEWO	DMEM	Metastase von malignem Melanom	HTB-65 (ATCC)
HeLaS3	DMEM	Zervixkarzinom	ACC161 (DSMZ)
SKMEL13	DMEM	Metastase von malignem Melanom	nicht Verfügbar
C8162	DMEM	malignes Melanom	nicht Verfügbar
HEK293	RPMI	humane embryonale Nierenzellen	CRL-1573 (ATCC)
HF53	DMEM	humane Fibroblasten	nicht Verfügbar
FTC133	DMEM	follikuläres Schilddrüsenkarzinom	nicht Verfügbar
HepG2	RPMI	humanes Leberzellkarzinom	ACC180 (DSMZ)

2.1.3 Bakterienstämme

Tabelle 2.2: *E.coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Medium
K12 TB 1	F ⁻ <i>ara</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) [Φ80 <i>dlac</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15] <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>thi hsdR</i>	LB
XL 10 Gold [®]	Tet ^r Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r] ^a ^a Chloramphenicol-resistent unter 40 µg/ml, aber sensitiv bei 100 µg/ml	LB
DH 5 α	<i>supE44 lacU169</i> (80 <i>lacZ</i> M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	LB

2.1.4 Vektoren

Für die MBP-Fusionsproteine wurde der *pMAL-pc2* Vektor von New England Biolabs verwendet. Das Maltose-bindende Protein befindet sich hierbei am N-Terminus von RASSF1A ebenso wie sich der Flag-Tag an den N-Termini von RASSF1A und RASSF1A-S203F befindet. Als Vektor für die Flag-Fusionsproteine diente das *pCMV-Tag1* Plasmid von Promega.

Das GST-Fusionsprotein GST-RASSF1A wurde in dem Vektor *pEBG* in humane Zelllinien transformiert (Ortiz-Vega et al., 2002).

2.1.5 Nährmedien

LB-Medium: 10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
1 g D-Glucose
mit H₂O auf 1000 ml auffüllen und autoklavieren

DMEM: 3,7 g/l NaHCO₃
1,0 g/l D-Glucose
mit stabilem Glutamin

DMEM: (ohne Pyruvat)	3,7 g/l NaHCO ₃ 4,5 g/l D-Glucose mit stabilem Glutamin ohne Na-Pyruvat
RPMI:	2,0 g/l NaHCO ₃ 1,0 g/l D-Glucose mit stabilem Glutamin
Penicillin/Streptomycin:	100 U/ml Penicillin G 100 µg/ml Streptomycinsulfat

2.1.6 Lösungen und Puffer

Amylose Säulenpuffer:	20 mM Tris-HCl pH 7,4 200 mM NaCl 1 mM EDTA
Amylose Elutionspuffer:	20 mM Tris-HCl pH 7,4 200 mM NaCl 1 mM EDTA 10 mM Maltose
Flag Elutionspuffer:	50 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% Triton X100
Kinase Puffer:	10 mM MgCl ₂ 50 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EGTA pH 7,5
RIPA Puffer:	1% NP40 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% SDS in PBS

Protein Ladepuffer:	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 25% Glycerol 2% SDS (w/v) 0,01% Bromphenol Blau(w/v) 5% β -Mercaptoethanol
PBS:	2 g KCl 2 g KH_2PO_4 1,15 g Na_2HPO_4 8 g NaCl mit H_2O auf 1000 ml auffüllen evtl. pH 7,4 mit NaOH oder HCl einstellen
Citratpuffer (10mM) pH 6,0:	2,94 g Tri-Natriumcitrat-2-hydrat in einem Liter H_2O lösen und mit HCl auf pH 6,0 einstellen
TE:	10 mM Tris HCl pH 7,4 1 mM EDTA pH 8,0
Natriumbisulfit Lösung:	3,8 g Natriumbisulfit 10 ml H_2O 400 μl NaOH (3 M) pH-Wert der Lösung muss 5 sein
Hydroquinon Lösung:	0,11 g Hydroquinon 10 ml H_2O
TBE Puffer (10x):	121,1 g Tris 51,4 g Borsäure 20 ml EDTA (0,5 M EDTA pH 8,0) mit H_2O auf 1000 ml auffüllen
TBS Puffer	50 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl pH 7,4 mit HCl einstellen
Acrylamid / Bis Lösung:	29,2 g Acrylamid (30% T; 2,67%T) 0,8 g N'N'-bis-methylen-acrylamid

Laufpuffer SDS-PAGE:	30,3 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS
Laufpuffer Westernblot:	40 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ 28 ml 0,5 M Na ₂ HPO ₄ mit H ₂ O auf 2 l auffüllen und mit jeweiligem Puffer, pH 6,5 einstellen
Westernblot Waschpuffer:	18 g NaCl 4,8 g Tris 1 ml TritonX-100 mit H ₂ O auf 2 l auffüllen und pH 7,5 mit HCl einstellen

2.1.7 Antikörper

Anti-Maus-IgG Alkaline-Phosphatase-Konjugat: eB114 (Anti-Human-RASSF1A IgG):	Sigma, Deisenhofen, Deutschland eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-Maus-IgG Alexa Fluor 568:	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Anti-Flag-IgG	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti-GST-IgG:	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

2.1.8 Rekombinante Enzyme

Casein-Kinase I:	New England Bio Labs, Beverly, USA
Protein-Kinase A catalytic-Subunit:	New England Bio Labs, Beverly, USA

2.1.9 Proteasen

Chymotrypsin:	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Proteinase-K:	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Trypsin:	Biochrom, Berlin, Deutschland

2.1.10 Kits

QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit:	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Qiafilter Plasmid Maxiprep:	Qiagen, Hilden, Deutschland
Wizard DNA Clean-Up system:	Promega, Heidelberg, Deutschland
NucleoSpin:	Machery-Nagel, Düren, Deutschland

2.1.11 Geräte

Ultraschall Homogenisator Bandelin	
Bandelin Sonopuls HD2070:	Electronics, Berlin, Deutschland
UV Spektrometer GeneQuant pro:	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Gel Dryer, Modell 538:	BioRAD München, Deutschland
Mini Trans-Blot (Westernblot):	BioRAD München, Deutschland
Mini Protean 3 Cell (PAGE):	BioRAD München, Deutschland
Thermocycler Mastercycler Gradient:	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Phosphoimager, Storm 860:	Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA, USA
Immobilon-P PVDF: (Westernblotmembran)	Millipore, Bedford, MA, USA

2.1.12 Chemikalien

[γ ³² PATP]	MP Biomedicals, Co., Irvine, Ca, USA
HCl 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Applichem, Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Acrylamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Amylose Resin	New England Bio Labs, Beverly, USA

APS	Merck, Darmstadt, Deutschland
BCIP/NBT Lösung	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Betain	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Brilliant Blau R	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol Blau	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform-Phenol- Isoamylalkoholmix	Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTPs	InViTek, Berlin, Deutschland
D-Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glycogen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Glycerol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
GST-Sepharose	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Hefeextrakt	Becton Dickinson, MD, USA
Hydroquinon	Merck, Darmstadt, Deutschland
IPTG	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Maltose	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
Methotrexat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
N´N´-bis-methylen-acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumbisulfit	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Merck, Darmstadt, Deutschland
NP40	Fluka Biochemica, Ulm, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phenol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Propidiumjodid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Protease Inhibitor Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Protein-G-Sepharose	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tri-Natriumcitrat-2-hydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Invitrogen, Groningen, Niederlande
TritonX-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Becton Dickinson, MD, USA
Tween20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasser (steril)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolation aus Tumormaterial

Die genomische DNA aus Tumormaterial wurde durch einen Proteinase-K-Verdau gewonnen. Das Tumorgewebe wurde auf einem Trockeneisblock in einer Einwegschale mithilfe einer Rasierklinge durch Schaben oder Schneiden zerkleinert und in 400 µl Proteinase-K-Puffer aufgenommen. Der Verdau erfolgte durch die Zugabe von 15 µl (20 mg/ml) Proteinase-K-Lösung und einer Inkubation von mindestens drei Stunden bei 56°C. Nach dem Verdau war die Lösung meist leicht viskos und wurde mit 500 µl Phenol ausgeschüttelt und bei 14000 U/min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde anschließend mit 500 µl Chloroform-Phenol-Isoamylalkoholmix extrahiert. Um die verbleibenden Reste Phenol aus der wässrigen Phase zu entfernen, wurde diese nochmals mit 500 µl Chloroform ausgeschüttelt. Die DNA-Fällung erfolgte durch die Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und ein Volumen Isopropanol. Anschließend wurde das Präzipitat mit 70% Ethanol von Salzen gereinigt. Die gefällten Nucleinsäuren wurden gelöst und einem RNase-Verdau (10 mg/ml) für zehn Minuten bei 37°C unterzogen. Die verbleibende DNA wurde erneut gefällt, gereinigt und dann in 50-100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde an dem Spektrometer Gene Quant[®] von Pharmacia bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen.

2.2.2 Methylierungsspezifische PCR (MSP) von genomischer DNA aus malignen Melanomen

Die methylierungsspezifische PCR ist ein kombiniertes Verfahren, bei dem zunächst unmethylierte Cytosine in der DNA durch Natriumbisulfit zu Uracil deaminiert werden. Methyliertes Cytosin wird nicht durch diese Reaktion modifiziert. Durch sequenzspezifische Primer kann anschließend eine bestimmte Region durch eine PCR auf ihre Methylierung hin untersucht werden. Hierbei unterscheiden sich die Primerpaare für die gleiche Region in ihrer Sequenz. Die reverse-Primer, welche an unmethylierte DNA binden, haben in ihrer Sequenz statt dem ursprünglichen Guanin generell ein Adenin, da dieses mit Uracil, dem durch Natriumbisulfit deaminierten Cytosin, ein Basenpaar ausbilden kann. Die forward-Primer für eine unmethylierte Promotorsequenz weisen statt eines Cytosins ein Thymin in ihrer Sequenz auf. Bei den reverse-Primern, mit denen methylierte DNA amplifiziert wird, bleiben die Guanine, die komplementär zum Cytosin der CpG-Sequenzen in der Primersequenz erhalten, da die 5-Methyl-Cytosine in der DNA nicht durch Natriumbisulfit deaminiert werden. Die

Guanine, welche nicht zu den Cytosinen in den CpG-Sequenzen gehören, werden auch hier durch ein Adenin ersetzt. Bei den forward-Primern werden Cytosine nur durch Thymin ersetzt, wenn sie nicht in einem CpG-Kontext vorkommen.

Zur Modifizierung von genomischer DNA durch Natriumbisulfit wurden 2 µg DNA in 20 µl TE-Puffer und 0,3 M NaOH für 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurden 208 µl einer 3,6 M Natriumbisulfit-Lösung sowie 12 µl einer 0,1 M Hydroquinon-Lösung zugegeben und für 16 Stunden bei 55°C im Wasserbad inkubiert.

Die Reinigung der DNA aus dem Reaktionsansatz erfolgte über das *Wizard DNA Clean-Up System*[®] von Promega. Nach dieser Reinigung befand sich die DNA in 50 µl H₂O. Um noch am Cytosin verbliebene Schwefelgruppen abzutrennen, gab man 5 µl einer 3 M NaOH-Lösung zu und inkubierte diese Lösung bei 37°C für zehn Minuten. Zur Fällung der DNA wurde 1 µl Glycogen (1 mg/ml), 55 µl Ammoniumacetat und 275 µl Ethanol (100%) zugegeben. Anschließend wurde die gefällte DNA mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Für eine MSP wurden zwischen 3 µl und 6 µl (120-240 ng) dieser gelösten, bisulfitbehandelten DNA eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Die Reaktionen wurden in 25 µl Gesamtvolumen angesetzt und enthielten 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂ und 400 nM der jeweiligen Primerpaare. Die Konzentration des Formamids, die primerspezifische Annealingtemperatur und die Anzahl der Elongationszyklen sind ebenso wie die Produktlänge in Tabelle 2.4 aufgeführt. Als Polymerase wurden 2 Units der Taq-Polymerase von InViTek mit dem entsprechenden mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet. Nach einer Denaturierung der mit Bisulfit behandelten DNA für fünf Minuten bei 95°C wurden folgende Elongationszyklen der PCR ausgeführt: 95°C für 45 Sekunden, T_{an} (siehe Tabelle 2.4) für 30 Sekunden und 72°C für 45 Sekunden. Die PCR Produkte wurden in einem 2%-igen Agarosegel in TBE-Puffer analysiert.

Tabelle 2.3: Primer für Methylierungsanalysen

Gen	forward Primer 5'→3'	reverse Primer 5'→3'
<i>RASSF1A</i>	M: GTGTTAACGCGTTGCGTATC U: TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	M: AACCCCGCGAACTAAAAACGA U: CAAACCCACAACTAAAAACAA
<i>p16^{INK4}</i>	M: TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC U: TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	M: GACCCCGAACCGCGACCGTAA U: CAACCCCAAACCACAACCATAA
<i>DAPK</i>	M: GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC U: GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	M: CCCTCCCAAACGCCGA U: CAAATCCCTCCCAAACACCAA
<i>MGMT</i>	M: TTTTCGACGTTTCGTACCTTTTCGC U: TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGTTTTTGT	M: GCACTCTTCCGAAAACGAAAACG U: AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA
<i>RB</i>	M: GGGAGTTTCGCGGACGTGAC U: GGGAGTTTTGTGGATGTGAT	M: ACGTCGAAAACACGCCCCG U: ACATCAAAAACACACCCCA

M: Primer für methylierte DNA; U: Primer für unmethylierte DNA

Tabelle 2.4: Genspezifische MSP-Bedingungen und Produktlängen

Gen	T _{an} in °C	Zyklen	Formamid (%) in 25 µl	Produktlänge in bp
<i>RASSF1A</i>	60	34	2	methyliert 93
	60	34	2	unmethyliert 105
<i>p16^{INK4}</i>	65	38	4	methyliert 150
	60	38	4	unmethyliert 151
<i>DAPK</i>	54	40	0	methyliert 98
	54	40	0	unmethyliert 106
<i>MGMT</i>	59	40	0	methyliert 81
	59	40	0	unmethyliert 93
<i>RB</i>	59	45	0	methyliert 180
	59	45	0	unmethyliert 180

2.2.3 Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern gegen RASSF1A und RASSF1C

Für den Nachweis der Proteine von RASSF1A und RASSF1C wurden monoklonale Antikörper aus Mäusen generiert. Die verschiedenen Antikörper wurden aus dem Überstand der im ELISA-Test positiven B-Zellkulturen angereichert. Hierfür wurden 1 ml Hi-Trap Protein-G-Sepharose[®] Säulen von Amersham verwendet. Zur Vorbereitung erfolgte eine Äquilibration der Säule mit 10 ml eines 20 mM Phosphatpuffers (pH 7,0).

Der Kulturüberstand wurde 1:5 verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Der Durchlauf der Säule wurde photometrisch vermessen. Nach dem Auftragen wurde die

Säule erneut mit dem zu Beginn verwendeten Phosphatpuffer gewaschen bis kein Protein mehr von der Säule eluiert wurde. Die auf der Säule gebundenen Antikörper wurden mit saurem Elutionspuffer 0,1 M Glycin-HCl (pH 2,7) von der Säule gewaschen und in 500 µl Fraktionen gesammelt. In den Elutionsgefäßen wurde 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 9,0) vorgelegt, um den sauren Elutionspuffer zu neutralisieren. Die Fraktionen wurden mittels einer SDS-PAGE überprüft, entsprechend ihrem Antikörpergehalt vereinigt und in einer Amicon-Filterzelle eingengt. Hierzu wurde mit Stickstoff ein Zelldruck von 2 bar erzeugt und das Eluat dreimal mit 45 ml PBS mit 0,01% Timerozal äquilibriert. Die Proteinmenge wurde nach Lowry bestimmt.

Die Säulen wurden mit 5 ml eines 20 mM Phosphatpuffers (pH 7,0) neutral gewaschen und mit 20 % Ethanol konserviert.

2.2.4 Transformation von humanen Zelllinien

Um RASSF1A durch Immunopräzipitation aus humanen Zellen isolieren zu können, wurden diese mit einem Plasmid transformiert, welches ein GST-RASSF1A-Fusionsprotein kodiert. Als Kontrolle wurde GST transformiert. Diese Transformation erfolgte mit dem Reagenz Lipofectamin 2000[®] von Invitrogen. Als Zelllinie wurde HEK293 verwendet, die in einer 10 cm Kulturschale bis zu einer Konfluenz von etwa 70% kultiviert wurde.

Für jede Zellkulturschale wurden 8 µg Plasmid eingesetzt. Sowohl das Plasmid als auch Lipofectamin 2000[®] wurde in 500 µl Optimem[®] für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen vereinigt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Transformation der Zellen durch die Zugabe des Gemisches zum Medium, welches nach 24 Stunden gewechselt wurde.

2.2.5 Präparation von humanen Zellextrakten

Humane Zellextrakte wurden frisch aus den jeweiligen Zellen in Zellkultur hergestellt. Das Nährmedium wurde aus der 10 cm Kulturschale abgenommen, die Zellkultur zweimal mit 3 ml PBS gewaschen und mit 1,5 ml kaltem, Proteinase-Inhibitoren enthaltenden RIPA-Puffer überschichtet. Nach kurzer Inkubation im Kühlschrank, bei der sich die Zellen ablösen, wurde die Zellsuspension in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Mit einer Spritze und einer 21-Gauge-Nadel erfolgte die Homogenisierung der Zellsuspension, die im Anschluss 20 Minuten bei 14000 U/min. zentrifugiert wurde. Das Zellysat wurde entweder gleich verwendet oder aliquotiert bei -80°C eingefroren.

2.2.6 Immunopräzipitation

2.2.6.1 Präzipitation von GST-RASSF1A

Zwei Tage nach der Transformation wurden die HEK293 Zellkulturen, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, aufgearbeitet.

Als Matrix für die Präzipitation wurde 100 µl GST-Sepharose verwendet, welche zunächst mit zweimal 1 ml PBS und anschließend mit 1 ml PBS + 0,1% Tween-20 äquilibriert wurde.

Zu 75 µl der Matrix wurden 500 µl Zellextrakt gegeben und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde mit 500 G für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die Matrix dreimal mit 1 ml PBS gewaschen, in 35 µl Protein-Ladepuffer aufgenommen und für fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Die Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, aufgetrennt und anschließend, wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben, geblottet.

2.2.6.2 Präzipitation von Flag-RASSF1A

Um die Phosphorylierung von RASSF1A aus humanen Zellen zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen mit dem Plasmid pCMV-Flag-RASSF1A, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, transformiert. Auf diese Weise konnte in humanen Zellen erzeugtes RASSF1A untersucht werden, welches anschließend durch Präzipitation mit Flag-Agarose aus Zellextrakt isoliert wurde.

Die Zellysis erfolgte durch mechanischen Aufschluss mit einer 21-Gauge-Nadel in Flag-Lysis-Puffer. Die Zellfragmente wurden durch eine zehn minütige Zentrifugation bei 4°C und 14000 U/min entfernt. Der Überstand wurde auf zuvor mit zweimal 500 µl TBS gewaschene Flag-Agarose gegeben und bei 4°C über Nacht schwenkend inkubiert. Die Trennung der Agarose vom Proteinüberstand erfolgte durch kurzes Zentrifugieren bei 10000 U/min. Es folgten zwei Waschschriffe mit 500 µl TBS, bevor die Flag-Agarose in 30 µl Ladepuffer aufgenommen und für fünf Minuten auf 95°C erhitzt wurde. Zur weiteren Analyse wurde diese Suspension mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot untersucht.

2.2.7 Proteinanalyse mittels SDS-Gelelektrophorese

Humane Zellextrakte und rekombinante Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese mit dem Mini-Protean[®]3 Cell System von BIORAD aufgetrennt und anschließend mit Comassie-brilliant-blue gefärbt oder für Westernblotanalysen weiterverwendet. Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit einem diskontinuierlichen Puffersystem nach

Laemmli durchgeführt. Um RASSF1A mit einer Größe von etwa 38 kD zu detektieren, wurde ein Trenngel mit 10% und ein Sammelgel mit 4% Polyacrylamid und je 1% SDS verwendet. Sowohl Trenn- als auch Sammelgel wurden durch Tris-HCl gepuffert. Dem Trenngel wurden 2,5 ml/10 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) und dem Sammelgel 2,5 ml/10 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,6) zugegeben.

Die Proteinlösung wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit Protein-Ladepuffer mindestens 2:1 verdünnt und bei 95°C für fünf Minuten erhitzt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis konnten die Proben aufgetragen und bei konstanten 120 V aufgetrennt werden.

2.2.8 Proteinbestimmung

Proteinmengen aus Zellextrakten wurden mit dem Bradford-Proteinassay bestimmt. Als ein mögliches Verfahren wurde die Microassay-Prozedur verwendet. Bei dieser Methode werden 800 µl der Proteinlösungen direkt mit dem unverdünnten Färbereagenz gemischt und zwischen fünf Minuten und 1 Stunde Inkubation vermessen. Die Methode eignet sich zur Bestimmung von Proteinmengen zwischen 1 µg und 20 µg Protein.

2.2.9 Westernblot

2.2.9.1 Evaluation von Antikörpern

Zur Evaluation der Antikörper sowie zur Analyse von RASSF1A und RASSF1C wurde das Mini-Trans-Blot[®]-System von BIORAD verwendet. Als Blotmembran diente die PVDF-Membran-Imobilon[®]-P von Millipore mit einer Porengröße von 45 µm. Die Membran wurde für fünf Sekunden in Methanol, anschließend für zehn Minuten in H₂O und abschließend für 20 Minuten in Blotpuffer für den Westernblot vorbereitet. Der Blot erfolgte mit einer konstanten Stromstärke von 350 mA für eine Stunde. Zur Absättigung der Membran wurde diese nach dem Blotten für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in Waschpuffer mit 5% Magermilch (w/v) inkubiert. Mit drei Waschschritten zu je zehn Minuten mit Westernblot-Waschpuffer wurde die Membran zur Inkubation mit dem primären Antikörper vorbereitet. Diese wurden anschließend mit Waschpuffer entsprechend Tabelle 2.5 verdünnt und die Membran eine Stunde bei 4°C darin inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten unter den oben genannten Bedingungen wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper ebenfalls für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente ein Anti-Maus-IgG mit alkaliner Phosphatase von Sigma. Die eingesetzte Menge an Antikörper ist in Tabelle 2.5 aufgeführt. Als Substrat für IgG-gebundene alkaline Phosphatase wurde die BCIP/NBT-Lösung von Sigma verwendet.

Tabelle 2.5: Antikörper für Westernblot und Immunhistologie

Antigen	Ak Bezeichnung	AK Art	Konzentration	Konzentration
			Westernblot in µg/ml	Immunhistologie in µg/ml
RASSF1A	eB114	primär	2	4
RASSF1A	2A10	primär	2	3,6
RASSF1C	6A9	primär	2	-
RASSF1C	2C3	primär	2	4
Flag-Tag	Anti-Flag-IgG	primär	7	-
Maus-IgG	Anti-Maus-IgG mit alk. Phosphatase	sekundär	0,05	-
Maus-IgG	Anti-Maus-IgG mit Alexa Fluor 568	sekundär	-	5

2.2.9.2 Westernblot mit Flag-Antikörpern

Beim Blotten wurde die gleiche Versuchsdurchführung wie in Kapitel 2.2.9.1 angewendet. Die Membran wurde anschließend in TBS mit 3% Magermilchpulver blockiert und dann für fünf Minuten mit TBS gewaschen. Das Anti-Flag-Immunglobulin wurde in TBS mit 3% Magermilchpulver in einer Konzentration von 7 µg/ml zur Membran gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem gleichen Waschschrift wie in Kapitel 2.2.9.1 mit TBS wurde der sekundäre Anti-Maus-IgG-Antikörper, gekoppelt mit alkaliner Phosphatase, zugegeben und erneut eine halbe Stunde inkubiert. Nachdem darauf folgend viermal fünf Minuten mit TBS gewaschen wurde, erfolgte die Detektion wie in Kapitel 2.2.9.1 beschrieben.

2.2.10 Immunhistologie an Paraffinschnitten von malignen Melanomen

Der Untersuchung der Promotor-Methylierung an genomischer DNA aus malignen Melanomen (MSP) folgte die immunhistologische Untersuchung von Präparaten mit homogen methyliertem, inhomogen methyliertem und homogen unmethyliertem RASSF1A-Promotor.

Hierzu wurden von den in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten je 5 µm dünne Schnitte auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger Super Frost® der Firma Menzel aufgezogen.

Die Entparaffinierung erfolgte durch zweimal zehn minütiges Inkubieren in Xylol und anschließend ebenso lange Inkubation in reinem Ethanol.

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte für 30 Minuten in Methanol mit 3% H₂O₂ bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit destilliertem H₂O gespült.

Für die folgende Behandlung in der Mikrowelle wurden die Schnitte in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) inkubiert und die Präparate für dreimal fünf Minuten in der Mikrowelle bei 600 Watt gekocht. Nach jedem Kochschritt wurde Citratpuffer nachgefüllt.

Nach einer 20 minütigen Abkühlphase wurden die Schnitte mit TBS gespült. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit normalem Pferde-Serum der Firma Vector Laboratories für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Das Serum wurde hierfür im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Nach dieser Inkubation wurden die Schnitte nicht gespült.

Der primäre Antikörper eB114 gegen RASSF1A wurde 1:500 in PBS verdünnt und auf die Melanomschnitte aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurde der Antikörper mit PBS abgespült.

Als sekundärer Antikörper wurde ein biotinylierter, aus Pferden gewonnener Anti-Maus-IgG der Firma Vector Laboratories eingesetzt. In einer 1:100 Verdünnung in PBS wurde dieser für 30 Minuten mit den Schnitten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS abgewaschen.

Der sekundäre Antikörper wurde mit dem Vectastain[®]-Elite[®]-ABC-Kit von Vector Laboratories markiert, in dem er für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit den Schnitten inkubiert wurde. Nach erneutem Spülen mit PBS wurde der Objektträger in TBS mit 0,1 % Tween gespült.

Diese Markierung beruht darauf, dass das Glycoprotein Avidin an das Biotin des sekundären Antikörpers bindet. Ebenso bindet biotinylierte Meerrettich-Peroxidase an das Avidin, welches vier Bindungsstellen für Biotin aufweist. Die Peroxidase setzt das Substrat 3-amino-9-ethyl-carbazol (ACE) zu einem roten Farbstoff um, der im Schnitt lichtmikroskopisch zu sehen ist.

Das ACE-Substrat von DakoCytomation wurde auf die Objektträger aufgetropft und für ca. fünf Minuten inkubiert und mit H₂O abgespült. Als Gegenfärbung erfolgte eine Kernfärbung mit filtriertem Hämalaun der Firma Merck.

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden mit Glycerolgelatine von Serva konserviert.

2.2.11 Expression und Reinigung der MBP-Fusionsproteine

Proteine der Tumorsuppressorgenfamilie RASSF1 lassen sich nur schwer aus humanen Zellen aufreinigen und konzentrieren. Sie sind zum einen in nur sehr geringen Mengen vorhanden und zum anderen scheinen sie in reiner Form unlöslich zu sein. Aus diesen

Gründen wurde für Phosphorylierungsexperimente und *in vitro*-Untersuchungen ein Fusionsprotein mit Maltose bindendem Protein (MBP) hergestellt. Als Vektor wurde pMAL-c2 von New England Biolabs verwendet. Die Klonierung erfolgte so, dass sich MBP am N-Terminus von RASSF1 befindet.

Die jeweiligen Fusionsproteine wurden als rekombinante Proteine in *E.coli* hergestellt. Als Zellmedium wurde 250 ml LB-Medium mit 100 µg/l Ampicillin verwendet, da der Vektor eine Ampicillinresistenz enthält. Die Zellen wurden bis zu einer Dichte von 0,6 bei 600 nm in einem 37°C warmen Schüttler bei 230 U/min vermehrt. Nach Erreichen der Zelldichte wurden mit 0,5 µM IPTG die durch den LacZ-Promotor regulierten Fusionsproteine induziert. Nach der Induktion wurden die Zellen weitere zwei bis drei Stunden bei 37°C geschüttelt.

Zur Reinigung des Fusionsproteins erfolgte zunächst die Zentrifugation der Zellsuspension, der Überstand wurde dekantiert und der Zellrückstand in 5-10 ml Amylose-Säulenpuffer resuspendiert.

Der Aufschluss der *E.coli* Suspension erfolgte durch Ultraschall mit Sonopuls HD2070[®] der Firma Bandelin mit einer Intensität von 60% bei Pulsstufe fünf auf Eis. Hierbei wurde die *E.coli* Suspension achtmal 30 s beschallt mit einer 30 s-Pause nach jeder Beschallung. Nach der Homogenisierung erfolgte erneut eine Zentrifugation, nach welcher der Überstand mit dem Fusionsprotein aliquotiert und bei -80°C eingefroren oder mit Säulenpuffer 1:4 verdünnt auf eine Amylosesäule aufgetragen wurde. Nach dem Auftragen des Zellextraktes und der Bindung der Fusionsproteine an die Amylose-Matrix wurde das Zellextrakt mit drei Säulenvolumen Säulenpuffer gewaschen und anschließend das Fusionsprotein mit Elutionspuffer von der Säule abgelöst. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und entsprechend vereinigt.

2.2.12 Mutation von MBP-RASSF1A

Um die Positionen einer oder mehrerer Phosphorylierungen von RASSF1A eingrenzen zu können, wurde durch gezielte Mutagenese das Fusionsprotein MBP-RASSF1A in seiner Primärsequenz verändert. Verwendet wurde hierfür der QuickChange[®]-XL-Site-Directed-Mutagenesis-Kit von Stratagene mit dem folgende Mutationen erzeugt wurden:

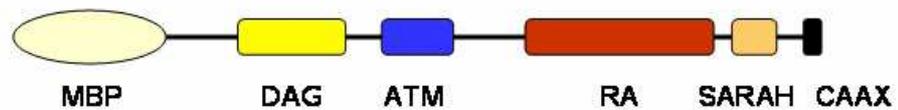
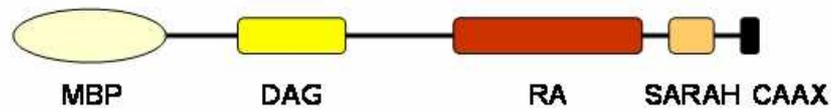
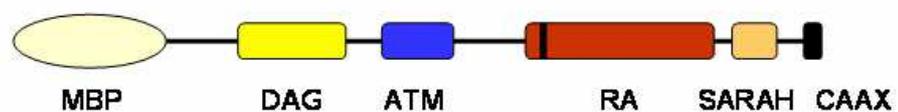
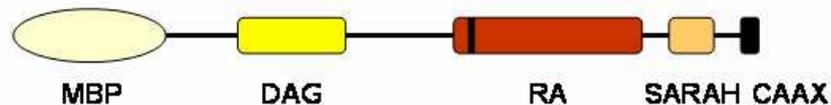
MBP-RASSF1A**MBP-RASSF1A-ΔATM****MBP-RASSF1A-S203F****MBP-RASSF1A-ΔATM-S203F**

Abbildung 2.1: Mutationen von MBP-RASSF1A; MBP: Maltose-Bindeprotein; DAG: Diacylglycerol-Bindemotiv; ATM: ATM-Kinase-Phosphorylierungsstelle; RA: Ras-Assoziations-Motiv; SARAH: Salvador/RASSF/Hippo-Interaktionsmotiv; CAAX: Prenylierungsstelle

Tabelle 2.6: Primer für MBP-RASSF1A-Mutationen

Mutation	Primer	T _{an}
RASSF1A- ΔATM	oberer Primer 5'→3': cgtggacgagcctgtggagatcaaggagtacaatgc unterer Primer 5'→3': gcattgtactccttgatctccacaggctcgtccacg	85
RASSF1A- S203F	oberer Primer 5'→3': gtcaggcgccgcactttcttttacctgccc unterer Primer 5'→3': gggcaggtaaaagaagtgcggcgcctgac	82

2.2.13 Analytische Gelfiltration der MBP-RASSF1A-Fusionsproteine

Die Bestimmung der Größe und des Aggregatzustandes von MBP-RASSF1A und den Mutationen MBP-RASSF1A-ΔATM und MBP-RASSF1A-S203F wurde durch eine analytische Gelfiltration überprüft. Hierfür wurden 10 µl (8-12 µg) gereinigtes Fusionsprotein auf eine Superose-12-(30/10)-Säule aufgetragen und mit einem Fluss von 0,8 ml/min eluiert. Als Laufpuffer diente 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6.

2.2.14 Limitierte Proteolyse von MBP-RASSF1A

Zur Identifizierung von stabil gefalteten Domänen des rekombinanten MBP-RASSF1A-Proteins wurde das Fusionsprotein einer limitierten Proteolyse von drei verschiedenen Endoproteasen unterzogen. Als Proteasen wurden Chymotrypsin, Trypsin und Proteinase-K verwendet. Bei allen Reaktionsansätzen wurden 13 µg MBP-RASSF1A in Amylose-Elutionspuffer mit verschiedenen Konzentrationen einer jeweiligen Protease verdaut. Das Reaktionsvolumen betrug 17 µl. Jede Proteolyse wurde nach unterschiedlichen Reaktionszeiten durch Zugabe von 3 µl Protein-Ladepuffer und fünfminütiges Erhitzen auf 95°C gestoppt. Die entstandenen Proteinfragmente wurden mit einem 10%-igem Gel mittels SDS-PAGE analysiert.

Tabelle 2.7: Endoproteasen und Reaktionsbedingungen der limitierten Proteolyse

Endoprotease	Spezifität	Reaktionsbedingungen	Reaktionszeit in Minuten
Cymotrypsin EC 3.4.21.1	n-X/-Y-c	0,1; 1;10;100 µg/ml Enzym	10; 20; 45; 90
	X: Trp, Phe, Tyr	20 mM Tris pH 7,4	
	(Met, Ala, Glu, Asp, Leu)	200 mM NaCl	
	Y: unspezifisch	1 mM EDTA 10 mM Maltose	
Trypsin EC 3.4.21.4	n-X/-Y-c	0,1; 1;10;100 µg/ml Enzym	10; 20; 45; 90
	X: Arg, Lys	20 mM Tris pH 7,4	
	Y: unspezifisch	200 mM NaCl	
		1 mM EDTA 10 mM Maltose	
Proteinase-K EC 3.4.21.14	n-X/-Y-c	0,1; 1;10;100 µg/ml Enzym	10; 20; 45
	X: aliphatische bzw. aromatische Aminosäuren	20 mM Tris pH 7,4	
	Y: unspezifisch	200 mM NaCl	
		1 mM EDTA 10 mM Maltose	

2.2.15 Synchronisation und Präparation von IGR1-Zellkernen

Um zellzyklusabhängige Untersuchungen durchführen zu können, ist eine vorherige Synchronisation der Zellkultur notwendig, da sich nie alle Zellen einer Zellkultur in der gleichen Zellzyklusphase befinden. Die Synchronisation von IGR1-Zellen erfolgte durch die Zugabe von 1 µM Methotrexat in das Medium der Zellkultur. Die Zellen verharren nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden in der G1- und S-Phase. Nach der Inkubation wurde das methotrexathaltige Medium entfernt und die Zellkultur zweimal

mit PBS gewaschen, um Methotrexatrückstände weitestgehend zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen wieder mit Kulturmedium überschichtet. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte nun eine Präparation der Zellkerne, um durch den unterschiedlichen DNA-Gehalt den Fortschritt des Zellzyklus beurteilen zu können. Für die Herstellung einer Einzelkern-Suspension wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Mit 3 ml Zitronensäure/Tween20-Lösung wurden die Zellkerne aus den Zellen herausgelöst, mit 1550 U/min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach einem Waschschriff mit 5 ml PBS wurden die Zellkerne in 1-2 ml eiskaltem 70%-igen Ethanol aufgeklopft und mindestens 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt.

Die Färbung der DNA in den einzelnen Zellkernen für die anschließende FACS-Messung erfolgte mittels Propidiumjodid. Nach der Zentrifugation mit 1550 U/min wurde das 70%-ige Ethanol dekantiert und die Zellkerne zweimal mit je 2 ml PBS+0,5% Tween20 gewaschen. Die noch vorhandene RNA wurde durch die Inkubation in 0,3 ml RNase-Lösung (1 mg/ml RNase) für zehn Minuten bei RT verdaut. Zu dieser Lösung wurden 0,3 ml Propidiumjodid-Lösung (100 µg/ml) gegeben und die Zellkerne für weitere zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellkerne waren so für die Messung am FACS vorbereitet.

2.2.16 *In vitro*-Phosphorylierung von MBP-RASSF1A Fusionsproteinen und Mutanten

2.2.16.1 Phosphorylierung mittels Zellextrakt

Bei der *in vitro*-Phosphorylierung wurde das entsprechende MBP-Fusionsprotein an einer Amylosematrix durch ein Zellextrakt unter Zugabe eines Kinasepuffers und radioaktivem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP phosphoryliert.

Zunächst wurden 100 µl der Amylosematrix bei 2000 U/min zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette entfernt. Zur weiteren Vorbereitung des Säulenmaterials wurde es zunächst mit zweimal je 150 µl H₂O und anschließend mit der gleichen Menge Säulenpuffer gewaschen.

Die Bindung des Fusionsproteins erfolgte durch Zugabe von 300 µl *E.coli* Zellextrakt unter einstündigem Schwenken bei 4°C. Durch zwei Waschschriffe mit je 150 µl Säulenpuffer wurde das Fusionsprotein gereinigt und in 100 µl Säulenpuffer aufgenommen. Der Ansatz wurde nun halbiert, eine Hälfte zur Phosphorylierung verwendet und die andere zu SDS-PAGE-Analyse, um die Menge des gebundenen Fusionsproteins zu beurteilen.

Für die *in vitro*-Phosphorylierung war es wichtig, frisch hergestelltes Zellextrakt (siehe Kapitel 2.2.5) zu verwenden. Von diesem Extrakt wurden 300-400 µl zu der

Amylosematrix mit gereinigtem Fusionsprotein gegeben und eine Stunde bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die Amylosematrix durfte nach diesem Schritt nicht gewaschen werden, da sonst keine Phosphorylierung mehr zu sehen war. Für die Phosphorylierungsreaktion wurden 100 µl Kinasepuffer zugegeben und anschließend 5 µl (50 µCi) $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten bei 30°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Amylosematrix zweimal mit je 150 µl Säulenpuffer gewaschen und anschließend in 15-20 µl Protein Ladepuffer aufgenommen und für fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Nach dem darauf folgenden Abkühlen wurden die Proteine im Reaktionsansatz durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde Comassie gefärbt, auf einem Filter getrocknet und auf einem Phosphorschirm liegend für drei Tage inkubiert. Die so vorhandenen, durch radioaktives Phosphat markierten Proteine, ließen sich über den Phosphorschirm abbilden.

2.2.16.2 Phosphorylierung mittels rekombinanter Kinasen

Phosphorylierungsuntersuchungen an RASSF1A sowie den in Abbildung 2.1 gezeigten Mutanten und RASSF1C wurden ebenso zellfrei mit rekombinanten Kinasen untersucht. Basierend auf vorangegangenen Untersuchungen wurde die katalytische Untereinheit von Protein-Kinase A und Casein-Kinase I verwendet.

In einen Reaktionsansatz von 60 µl wurden 50 µl Amylosematrix mit daran gebundenem RASSF1A gegeben. Zur qualitativen Kontrolle der Phosphorylierung wurde 1 µl der entsprechenden Kinase zugegeben. Bei Protein-Kinase A entsprach das einer Menge von 2500 U, bei Casein-Kinase I einer Menge von 1000 U. Des Weiteren befanden sich 5 µl (50 µCi) $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP in jedem Ansatz.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 30°C und leichtem Schütteln wurde die Amylosematrix abzentrifugiert, wie oben beschrieben (siehe Kapitel 2.2.16.1) gewaschen und die Analyse durchgeführt.

2.2.17 Aktivitätsbestimmung von Protein-Kinase A in IGR1-Zellextrakt

Die Aktivität der Protein-Kinase A in Zellextrakt von IGR1-Zellen wurde mit dem SignaTECT® cAMP-Dependent-Protein-Kinase-(PKA)-Assay-System bestimmt. Der Test beruhte darauf, dass ein für Protein-Kinase A spezifisches, biotinyliertes Standard-Peptid in einem Reaktionsvolumen von 25 µl mit ^{32}P von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP radioaktiv markiert wurde. 10 µl des Reaktionsansatzes wurden auf eine spezielle Membran gespottet, an der das biotinylierte Peptid gebunden wurde. Die Membran wurde gewaschen und die

Radioaktivität nach zwei Tagen auf einem Phosphorschirm bestimmt. Auf normalen Whatman[®]-Filter wurden 5 µl von jedem Reaktionsansatz aufgetragen, um die spezifische Aktivität von γ ³²P-ATP zu bestimmen. Ebenso wurde eine Reaktion ohne Substrat auf die oben erwähnte spezielle Membran aufgetragen, um den radioaktiven Hintergrund zu bestimmen.

Die Radioaktivität hinterließ auf dem Phosphorschirm Spuren, die durch einen Scanner (Storm) dargestellt wurden. Mit einer entsprechenden Software konnte die Intensität der Banden bestimmt werden. Die so erhaltenen Werte, die auf normalen Whatman[®]-Filter aufgetragenen Proben wurden gemittelt und auf die Menge γ ³²P-ATP bezogen, die sich in dieser Probenmenge befand.

Die Protein-Kinase A-Aktivität in pmol ATP/Minute/µg Gesamtprotein wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{(a-b) \times 37,5}{c \times 10 \times \text{Reaktionszeit}[\text{min}] \times \text{Protein pro Reaktion}[\mu\text{g}]} \quad (2.1)$$

Die Variablen und Zahlen stehen für:

- a: Messwert aus Reaktion mit Substrat
- b: Messwert aus Reaktion ohne Substrat
- c: spezifische Aktivität von γ ³²P-ATP (Pixel/pmol)
- 10: Volumen der aufgetragenen Reaktionsmenge in µl
- 37,5: Summe des Reaktionsvolumens (25 µl) + Terminationspuffer (12,5 µl)

2.2.18 *In vitro*-Phosphorylierung von Flag-RASSF1A-Fusionsprotein

Die an rekombinantem MBP-RASSF1A untersuchte Phosphorylierung wurde auch für das Fusionsprotein Flag-RASSF1A, ebenfalls *in vitro*, untersucht. Hierfür wurden transformierte humane Zellen genutzt, welche mit dem Plasmid pCMV-Flag-RASSF1A transformiert waren (siehe Kapitel 2.2.4). Nach 36 Stunden Wachstum wurden die Zellkulturen lysiert und das Fusionsprotein wie in Kapitel 2.2.6.2 beschrieben, aufgereinigt. An Flag-RASSF1A wurde mit der gleichen Methode wie bei MBP-RASSF1A, in Kapitel 2.2.16.1 beschrieben die *in vitro* Phosphorylierung durchgeführt. Durch anschließende SDS-Gelelektrophorese und Detektion mittels eines Phosphorscreens wurde die *in vitro*-Phosphorylierung von human gefaltetem Flag-RASSF1A nachgewiesen.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit gliedern sich nach ihrer Fragestellung in verschiedene Teile. Zunächst befasst sie sich mit der intratumoralen Promotor-Methylierung von fünf Tumorsuppressorgenen (*RASSF1A*, *p16^{INK4a}*, *DAPK*, *MGMT*, *Rb*) in malignen Melanomen. In einem weiteren Abschnitt der Arbeit wird die Expression von *RASSF1A* als eines dieser fünf Tumorsuppressorgene untersucht. Hierfür werden zunächst unterschiedliche Antikörper evaluiert und anschließend maligne Melanome immunhistochemisch untersucht. Um die Funktion von *RASSF1A* näher zu charakterisieren werden im letzten Teil der Arbeit auch Phosphorylierungsuntersuchungen an verschiedenen *RASSF1A* Fusionsproteinen dargestellt.

3.1 Tumorsuppressorgene in malignen Melanomen der Haut

Bei der Entstehung von malignen Tumoren spielen genetische und besonders epigenetische Veränderungen, bei denen es zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kommen kann, eine wichtige Rolle.

Die epigenetische Inaktivierung eines Gens ist unter anderem die Folge einer Hypermethylierung von CpG-reichen DNA-Regionen, welche sich in einem Promotor befinden. Diese Hypermethylierung kann mit der Methode der methylierungsspezifischen PCR (MSP) untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl primäre maligne Melanome als auch Metastasen auf eine epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen untersucht. Maßgeblich wichtig war die in der Hautklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgenommene Präparation der verschiedenen Tumore. Diese wurden nach der chirurgischen Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Je nach histologischem Befund wurden von einem Primärtumor oder einer Metastase verschiedene Proben geschnitten, die alle eine gemeinsame Schnittkante mit dem für die histologische Untersuchung bestimmten Paraffinpräparat hatten. Die einzelnen Schnitte wurden mit Großbuchstaben bezeichnet, die auch die relative Position der Schnitte zueinander abbildet. Die Proben eines Tumors, der in sechs Proben geteilt wurde, sind mit den Buchstaben A-F bezeichnet. A und F sind jeweils Randschnitte, während B-G Schnitte zwischen A und F bezeichnen und dem nachfolgenden Buchstaben benachbart sind. Der Vorteil dieser akribischen Probenpräparation lag darin, dass zu Proben bei denen die epigenetische Inaktivierung auf DNA-Ebene untersucht wurde, gleichzeitig ein räumlich sehr naher Histologieschnitt zur Verfügung stand. Auf diese Weise

konnten histologische und genomische Befunde in intratumoral räumlicher Nähe verglichen werden.

Ein Ziel der Arbeit war die intratumorale Untersuchung epigenetischer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Die untersuchten Tumorsuppressorgene waren *Ras Association Domain Family 1 (RASSF1A)*, *Inhibitor der Proteinkinase 4a (p16^{INK4a})*, *Death Associated Protein Kinase (DAPK)*, *O(6)-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT)* sowie *Retinoblastom (Rb)*.

3.1.1 Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in malignen Melanomen und deren Metastasen

Die durch Promotor-Methylierung bedingte Inaktivierung der Gene *RASSF1A* sowie *p16^{INK4a}* wurde an 23 Patienten untersucht. Bei den zur Verfügung stehenden Proben handelte es sich um 15 primäre Tumore von 15 Patienten und 19 Metastasen von acht verschiedenen Patienten, von denen zwei bis zehn unterschiedliche Schnitte pro Primärtumor bzw. Metastase untersucht wurden. Ziel war es, die Homogenität von methylierungsbedingter Inaktivierung der Gene innerhalb der Tumore zu untersuchen. Es wurden nur Tumore ausgewertet, bei denen Methylierungsuntersuchungen von mehreren intratumoralen Proben mit 3-fach reproduzierbarem Ergebnis vorlagen.

Nach einer Behandlung mit Natriumbisulfit wird Cytosin zu Uracil deaminiert. Diese Modifikation findet bei methyliertem Cytosin (^{5m}C) nicht statt. Durch spezifische Primer kann somit gezeigt werden, ob in einer CpG-reichen Promotorregion methyliertes oder unmethyliertes Cytosin in den CpG-Sequenzen vorliegt.

Reverse-Primer, mit denen unmethylierte DNA amplifiziert wird, weisen statt einem Guanin ein Adenin in den CpG-Inseln und auch in ihrer restlichen Sequenz auf. Bei forward-Primern für unmethylierte DNA wird das Cytosin aus der unveränderten Primersequenz durch Thymin ersetzt. Bei Primerpaaren für methylierte DNA sind diese Modifikationen nur außerhalb des CpG-Kontextes vorhanden. Mit Bisulfit behandelte genomische DNA wird daher immer zwei PCR-Reaktionen unterzogen. Eine Reaktion erfolgt mit methylierungsspezifischen Primern, eine andere Reaktion wird mit Primern durchgeführt, die spezifisch für unmethylierte DNA sind.

Bei genomischer DNA aus Tumorproben kommt es vor, dass sowohl eine methylierungsspezifische Bande als auch eine Bande für unmethylierte DNA auftritt. Dies hängt unter anderem damit zusammen, dass Tumorproben selten homogen sind. Eine Probe stellt immer ein Gemisch aus Tumorzellen und normalen Zellen dar, die je nach vorhandener Menge an normalen Zellen und analysiertem Promotor eine Bande für unmethylierte DNA verursachen. Eine weitere Ursache für das Auftreten beider Banden ist die unvollständige Methylierung der CpG-Inseln innerhalb des Promotors.

In Abbildung 3.2 sind die Ergebnisse der methylierungsspezifischen PCR (MSP) für die untersuchten Tumorsuppressorgene dargestellt. Es handelt sich hierbei beispielhaft um Proben aus einer Metastase, welche in sechs verschiedene Schnitte geteilt wurde. Die dargestellten Gelausschnitte zeigen zuerst den Größenmarker, anschließend eine Positiv- und eine Negativkontrolle und weiterhin die Ergebnisse der Untersuchungen an den einzelnen intratumoralen Proben, die mit Großbuchstaben gekennzeichnet sind.

Für *RASSF1A*, *DAPK*, *Rb* und *p16^{INK4a}* weist diese Metastase eine inhomogene Methylierung innerhalb ihrer verschiedenen Abschnitte auf. Dies bedeutet, dass bei den entsprechenden Genen die Methylierung des Promotors nicht in allen Teilschnitten gleich ist. Wie in Abbildung 3.2 dargestellt, sind die Proben B und F dieses Tumors vollständig unmethyliert, da nur eine Bande bei der MSP mit Primern für unmethylierte DNA zu sehen ist. Bei den Schnitten A, C, D, und E sind beide Banden zu sehen, sowohl für die MSP einer methylierten als auch unmethylierten Probe. Hier geht man davon aus, dass eine Promotor-Methylierung vorliegt.

Lediglich bei *MGMT* ist der Promotor in keinem Bereich der Metastase methyliert. Je nach Reaktion und Sequenz können unterhalb der durch die MSP erzeugten Banden weitere Banden durch die Bildung von Primerdimeren entstehen.

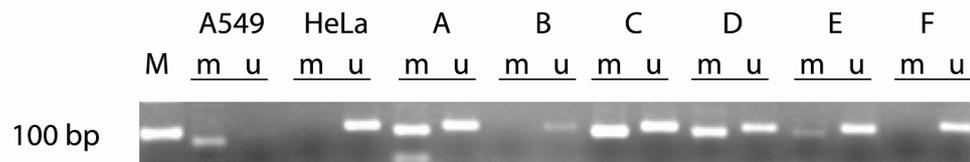
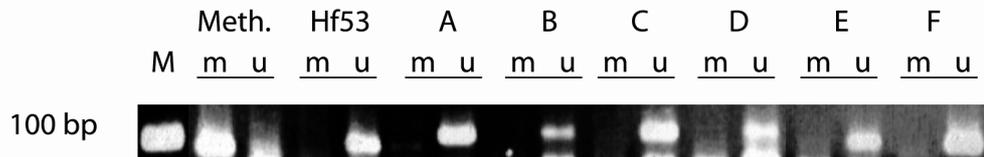
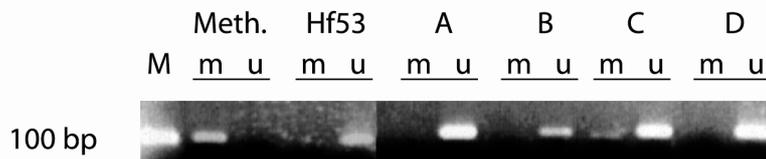
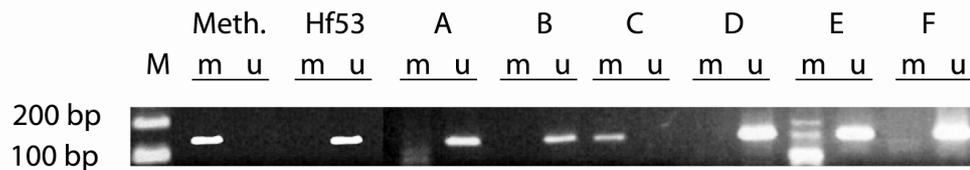
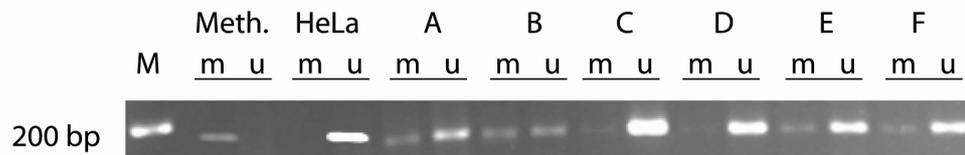
RASSF1A**MGMT****DAPK****Rb****p16^{INK4a}**

Abbildung 3.2: Darstellung der methylierungsspezifischen PCR (MSP) in einer Metastase für die fünf untersuchten Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *MGMT*, *DAPK*, *Rb* und *p16^{INK4a}*. Die Gelausschnitte zeigen die Ergebnisse der jeweiligen intratumoralen MSP. m: Primerpaare für methylierten Promotor; u: Primerpaare für unmethylierten Promotor; A549: Promotor-Methylierung von *RASSF1A*; Meth: in vitro methylierte DNA aus HF53 oder HeLa als Positivkontrolle; HeLa und HF53: Kontrollen für unmethylierten Promotor; A-F: Proben aus einem Tumor; M: Marker.

In gleicher Weise wurden die weiteren Tumorproben untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

Für *RASSF1A* zeigte sich bei zwei der 15 (13%) Primärtumore, dass eine intratumoral homogene Methylierung vorlag. Von elf Metastasen zeigte eine (9%) eine intratumoral homogene Methylierung des *RASSF1A* Promotors. Eine Inhomogenität der *RASSF1A*-Promotor-Methylierung zeigte sich bei nur einem von 15 (7%)

Primärtumoren und bei zwei von elf (18%) Metastasen. In den restlichen zwölf Primärtumoren und acht Metastasen war keine Promotor-Methylierung zu beobachten.

Im $p16^{INK4a}$ -Gen konnten elf der 15 Primärtumore und neun Metastasen ausgewertet werden. Eine intratumoral homogene Methylierung des Promotors ist in einem der elf (9%) Primärtumore vorhanden, während in sechs (54%) von ihnen eine inhomogene Deaktivierung des Gens stattfindet. Keine $p16^{INK4a}$ -Methylierung am Promotor zeigten vier der elf (36%) Primärtumore. In Metastasen waren vier von neun (44%) Proben inhomogen und drei von neun (33%) Proben intratumoral homogen methyliert.

Für die Tumorsuppressorgene *Rb*, *DAPK*, und *MGMT* wurden 15 Fälle untersucht. Bei zehn der Fälle handelte es sich um Primärtumore von zehn verschiedenen Patienten, während elf Metastasen von fünf verschiedenen Patienten stammten. Für die Gene *Rb* waren sieben, für *MGMT* fünf und für *DAPK* sechs Metastasen auswertbar. Keines dieser drei Gene zeigte an den verschiedenen Proben innerhalb eines primären Tumors oder einer Metastase eine homogene Promotor-Methylierung. Bei *Rb* war diese Inhomogenität bei zwei von zehn (20%) Primärtumoren und bei vier von sieben (57%) Metastasen zu sehen. Im überwiegenden Teil der Primärtumore war der *Rb* Promotor jedoch nicht methyliert. Bei den Metastasen wiesen ebenfalls drei von sieben (43%) einen nicht methylierten Promotor auf.

Beide Tumorsuppressorgene (*DAPK* und *MGMT*) zeigen aber sowohl bei Metastasen als auch bei primären Tumoren eine intratumorale inhomogene Methylierung des Promotors. Bei *DAPK* ist diese Methylierung mit drei von zehn (30%) Primärtumoren und zwei von sechs (33%) Metastasen stärker ausgeprägt als bei *MGMT*, bei welchem ein von zehn (10%) Primärtumoren und eine von fünf (20%) Metastasen eine Promotor-Methylierung aufwiesen. Bei beiden Genen waren die Promotoren meist intratumoral homogen unmethyliert.

Die meisten Primärtumore und Metastasen wiesen für die Gene *RASSF1A*, *Rb*, *DAPK* und *MGMT* unmethylierte Promotoren auf. Tritt aber eine geringe Methylierung der Promotoren dieser Gene auf, so war diese nicht überall im Primärtumor oder der Metastase zu finden. Lediglich bei $p16^{INK4a}$ trat der unmethylierte Promotor sowohl in Primärtumoren als auch in Metastasen weniger häufig als der methylierte auf.

Tabelle 3.8: Intratumorale genspezifische Promotor-Methylierungsmuster

Gen	intratumoral homogen methylierter Promotor		intratumoral inhomogen methylierter Promotor		intratumoral homogen unmethylierter Promotor	
	Primärtumor	Metastase	Primärtumor	Metastase	Primärtumor	Metastase
<i>RASSF1A</i>	2/15 (13,3%)	1/11 (9,1%)	1/15 (6,7%)	2/11 (18,2%)	12/15 (80%)	8/11 (72,7%)
<i>p16^{INK4a}</i>	1/11 (9,1%)	3/9 (33,3%)	6/11 (54,5%)	4/9 (44,4%)	4/11 (36,4%)	2/9 (22,2%)
<i>Rb</i>	0/10	0/7	2/10 (20%)	4/7 (57,1%)	8/10 (80%)	3/7 (42,9%)
<i>DAPK</i>	0/10	0/6	3/10 (30%)	2/6 (33,3%)	7/10 (70%)	4/6 (66,6%)
<i>MGMT</i>	0/10	0/5	1/10 (10%)	1/5 (20%)	9/10 (90%)	4/5 (80%)

Die Daten aller Methylierungsanalysen (siehe Anhang Tabelle 8.11) wurden unabhängig von Patient und Tumortyp korreliert. Hierbei zeigte sich, dass bei einer Anzahl von 46 auswertbaren Proben eine signifikante Korrelation zwischen dem Methylierungsstatus des *p16^{INK4a}*- und des *Rb*-Promotors besteht (Signifikanz: $p=0,001$).

Ebenfalls korrelierte der Methylierungsstatus des *p16^{INK4a}*- und des *DAPK*-Promotors bei 49 auswertbaren Proben (Signifikanz: $p=0,035$).

3.2 Proteinexpression von RASSF1A/C

3.2.1 Validierung von Antikörpern gegen RASSF1A/C

Nach der Untersuchung der Promotor-Methylierung wurde die Expression von RASSF1A in unterschiedlichen Zelllinien und in ausgewählten Histologieschnitten der Tumortumoren untersucht, um zu überprüfen, ob sich die Daten der Promotor-Methylierung auf Proteinebene abbilden lassen.

Zu Untersuchungsbeginn der RASSF1-Genfamilie waren keine adäquaten Antikörper zur Proteinmarkierung erhältlich. Deshalb wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Weber vom Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg monoklonale Mausantikörper gegen RASSF1A und RASSF1C entwickelt. Als Antigen wurden zunächst die Fusionsproteine MBP-RASSF1A/C verwendet. Die Selektion der Antikörper erfolgte anschließend gegen eine N-terminale Peptidsequenz, in welcher sich beide Proteine, RASSF1A und RASSF1C, unterscheiden. Zur Validierung der Antikörper wurden die MBP-Fusionsproteine sowie

das GST-Fusionsprotein GST-RASSF1A verwendet. Ebenfalls wurde ein inzwischen kommerziell erhältlicher Antikörper gegen RASSF1A (eB114 von eBioscience San Diego, CA, USA) getestet.

In Abbildung 3.3 ist die Spezifität der Antikörper dargestellt. Keiner der getesteten Antikörper reagiert auf MBP (Abbildung 3.3, A). Auch der sekundäre Antikörper (Konjugat) reagierte mit keinem der Fusionsproteine. Gegen das Fusionsprotein MBP-RASSF1A (Abbildung 3.3, B) ist der kommerzielle Antikörper eB114 sowie der generierte Antikörper 2A10 spezifisch. An MBP-RASSF1C (Abbildung 3.3, C) bindet nur der Antikörper 2C3, wenngleich diese Bindung eher schwach ausfällt.

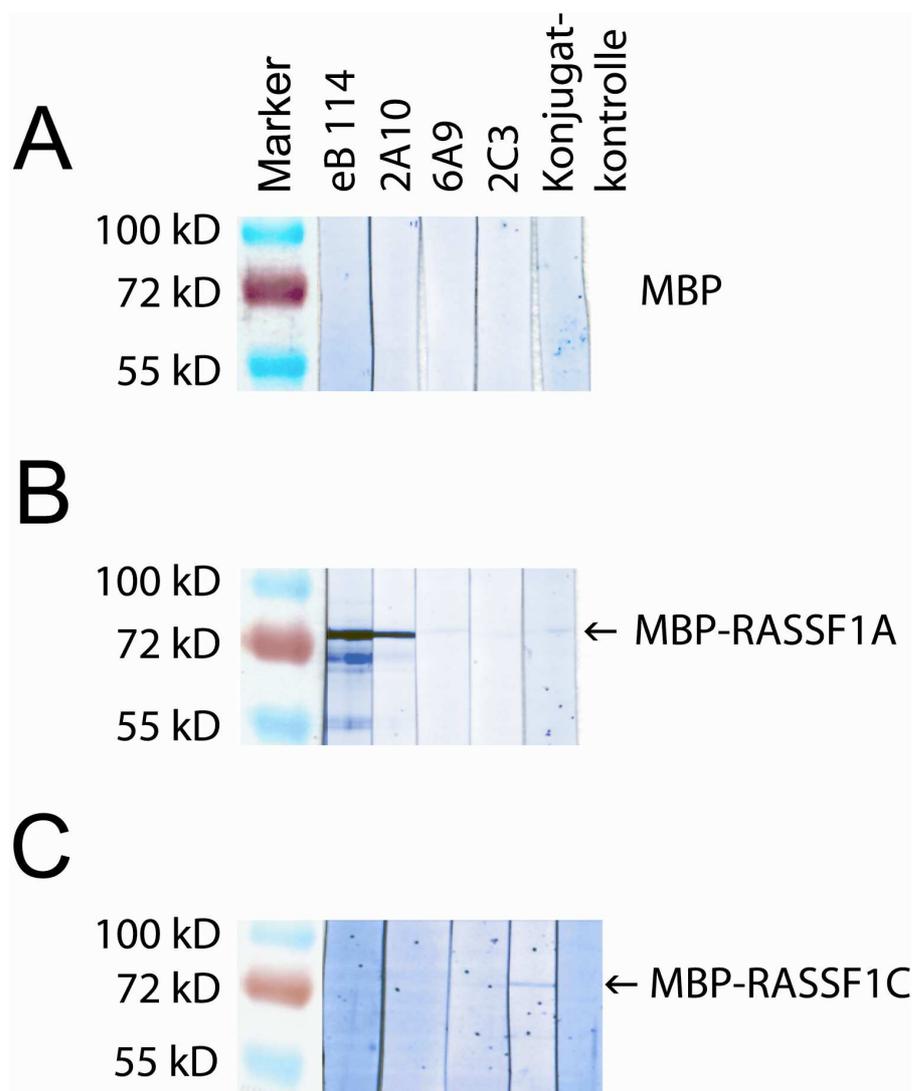


Abbildung 3.3: Darstellung verschiedener Westernblots, bei welchen unterschiedliche Antikörper gegen MBP (A) sowie gegen die Fusionsproteine MBP-RASSF1A (B) und MBP-RASSF1C (C) getestet wurden. Es wurde ein 10%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel geblottet, anschließend die Membran in schmale Streifen geschnitten und mit eB114- und 2A10-Antikörper gegen RASSF1A sowie 6A9- und 2C3-Antikörper gegen RASSF1C die Bindung der Antikörper geprüft. Als Konjugat wurde Anti-Maus-IgG mit Peroxidase verwendet.

In Abbildung 3.4 ist ein Westernblot von GST-RASSF1A dargestellt. Das für das Fusionsprotein kodierende Plasmid wurde in HEK293-Zellen transformiert und dann an einer Glutathion-Sepharose-Säule aufgereinigt. Mittels einer 10%-igen SDS-PAGE wurde das Proteingemisch nach der Extraktion aufgetrennt und auf einem Westernblot analysiert. Diese Fusionsproteine waren nicht wie die MBP-Fusionsproteine aus *E.coli*, sondern wurden aus humanen Zellen isoliert und sollten deshalb starke Ähnlichkeit mit nativem RASSF1A aufweisen. Anschließend wurde das GST-Fusionsprotein auf eine PVDF-Membran geblottet. Diese wurde in Streifen geschnitten, um die verschiedenen primären Antikörper zu testen.

Die Antikörper 2A10 und eB114 zeigten beide eine Bande bei etwa 60 kD. RASSF1A hat eine Größe von 38 kD und GST von 20 kD. Beides zusammen sollte eine Bande von 58 kD im Westernblot ergeben, wie sie in Abbildung 3.4 zu sehen ist. Die Positivkontrolle mit einem Antikörper gegen GST zeigt eine Bande in gleicher Höhe, während die Negativkontrolle mit dem sekundären Anti-Maus-Antikörper kein Signal ergibt. Die Antikörper gegen RASSF1C (2C3 und 6A9) binden ebenfalls, wie erwartet, nicht an GST-RASSF1A.

Es ist aber ein deutlicher Unterschied in der Intensität zwischen den Antikörpern 2A10 und eB114 zu sehen. Der Antikörper 2A10 reagiert nur sehr schwach gegen GST-RASSF1A, während eB114 ein stärkeres Signal ergibt. Dieser Unterschied könnte auf die Faltung des Fusionsproteins zurückzuführen sein. Der Antikörper 2A10 bindet demnach gut an MBP-RASSF1A aus *E.coli* aber weniger stark an humanes RASSF1A, wie in Abbildung 3.4 Abbildung 3.5 zu sehen ist.

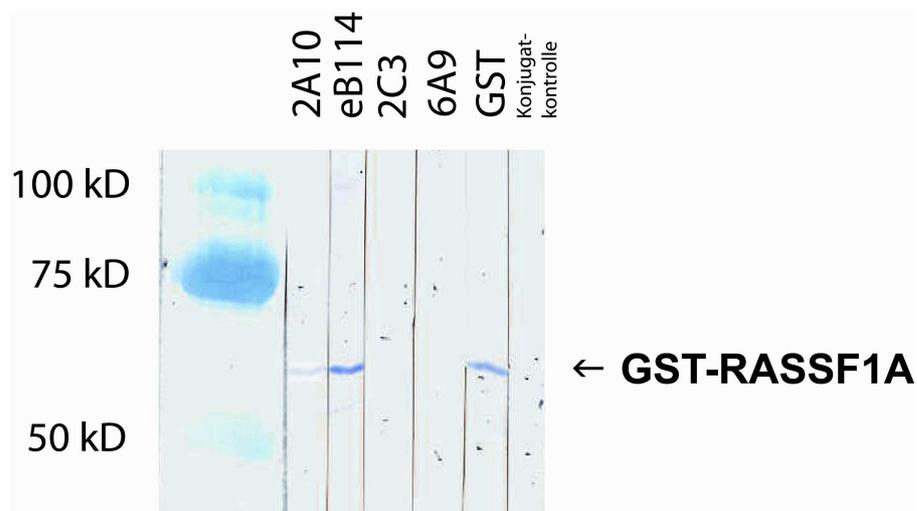


Abbildung 3.4: Darstellung eines Westernblots von GST-RASSF1A, bei dem verschiedene Antikörper gegen humanes GST-RASSF1A getestet wurden. Die Antikörper 2A10 und eB114 sind Primärantikörper gegen RASSF1A, 2C3 und 6A9 sind Primärantikörper gegen RASSF1C, GST ist der Primärantikörper gegen den GST-Proteintag. Als Konjugat wurde Anti-Maus-IgG mit Peroxidase verwendet.

Dieser Unterschied wurde auch bei immunhistologischen Färbungen von RASSF1A in Schnitten aus normaler Haut beobachtet. Wie Abbildung 3.5 zeigt, werden in normaler Haut Endothelzellen am stärksten von den Antikörpern gegen RASSF1A angefärbt. Diese Abbildung zeigt, dass eB114 für die immunhistochemische Färbung der geeigneteren Antikörper zu sein scheint. Der Unterschied in der Stärke des Signals zwischen den Antikörpern 2A10 und eB114 ist bei immunhistochemischen Färbungen ebenso ausgeprägt wie im Westernblot. Dennoch zeigen beide Antikörper die gleichen Strukturen in ihrer Färbung.

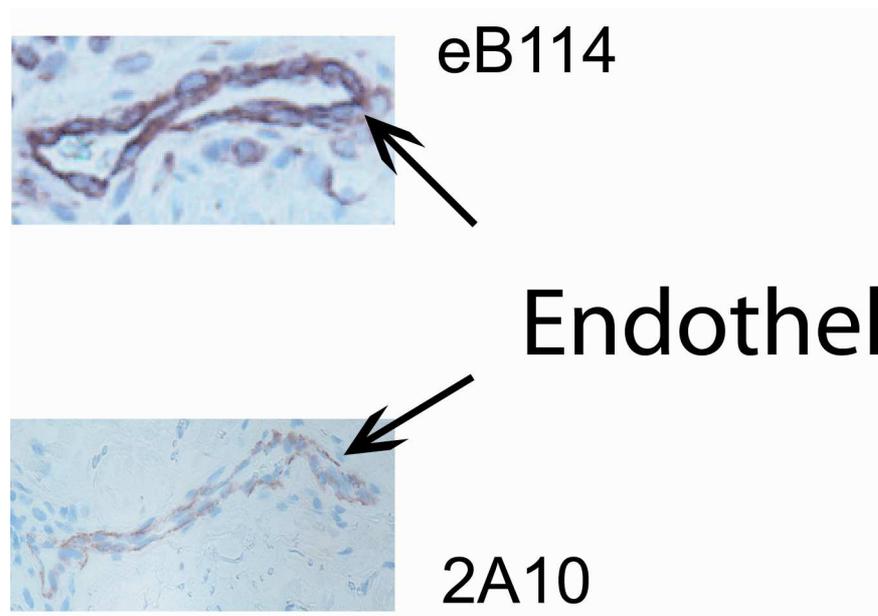


Abbildung 3.5: Immunhistochemische Färbung von normaler Haut in Paraffinschnitten. Es wurden die RASSF1A-Antikörper eB114 und 2A10 verwendet. Die stark gefärbten Strukturen sind gefäßbildende Endothelzellen.

3.2.2 Proteinexpression von RASSF1A/C in humanen Zelllinien

Die Proteinexpression von RASSF1A und RASSF1C wurden in Zellextrakten verschiedener humaner Zelllinien untersucht. Als Primäntikörper wurden eB114 und 2A10 verwendet. Gegen RASSF1C wurde der Antikörper 2C3 als Primäntikörper genutzt.

Es wurden folgende Zelllinien bezüglich ihrer RASSF1A/C-Expression untersucht: HF53 (humane Fibroblasten), IGR1 (Metastase eines malignen Melanoms), A549 (Lungenkarzinomzelllinie), HeLaS3 (Cervixkarzinomzelllinie), H740 (kleinzelliges Lungenkarzinom), FTC133 (follikuläres Schilddrüsenkarzinom), HepG2 (humanes Leberzellkarzinom), SKMEL13 (Metastase eines malignen Melanoms), HEK293 (humane embryonale Nierenzellen) und C8162 (malignes Melanom). In diesen

Zelllinien wurde zunächst der Promotor von *RASSF1A*-Gen hinsichtlich der Methylierung untersucht. In den Zelllinien HF53 (siehe Abbildung 3.2), HeLaS3, IGR1, HEK293 und SKMEL13 (siehe Abbildung 3.6) war keine Promotor-Methylierung von *RASSF1A* zu finden, so dass eine Proteinexpression zu erwarten war.

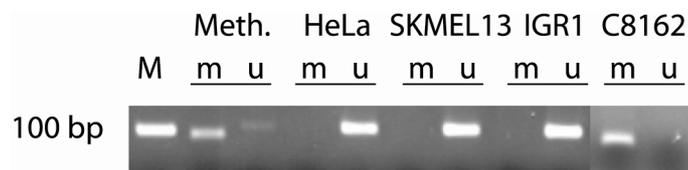


Abbildung 3.6: Darstellung der *RASSF1A*-MSP Untersuchungen für Melanomzelllinien. M: Marker; m: spezifische Primer für methylierte Promotoren; u: spezifische Primer für unmethylierte Promotoren; Meth.: *in vitro* methylierte DNA von HeLa S3; HeLa: Kontrolle, normale DNA aus HeLa S3 Zellen diente als Positivkontrolle.

Für die Zelllinien A549 und FTC133 wurde eine Promotor-Methylierung festgestellt (Schagdarsuregin et al., 2002). Hier wurde keine Proteinexpression von *RASSF1A* erwartet. Die Zelllinie H740 trägt bekanntlich eine homozygote Deletion auf dem Chromosom 3 in Region p21 (Dammann et al., 2000). Deshalb erwartet man hier ebenfalls keine *RASSF1A*-Proteinexpression.

Der Westernblot des Proteinextraktes dieser Zelllinien ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Mit eB114 sind je nach Probe eine oder zwei Banden zu sehen. Die obere Bande bei etwa 52 kD ist, so vorhanden, deutlicher zu sehen als die untere Bande bei etwa 49 kD. Die berechnete Größe von *RASSF1A* liegt bei 38 kD. In der Region dieser Größe ist jedoch keine Bande zu sehen. Wie auch bei eB114 sind bei 2A10 als primärem Antikörper sind nur die unteren Banden in den gleichen Proben zu sehen. Die Konjugatkontrolle allerdings weist das gleiche Bandenmuster wie der primäre Antikörper 2A10 auf. Somit kann davon ausgegangen werden, dass 2A10 nicht an *RASSF1A* in Gesamtproteinextrakt bindet.

Mit dem Primärantikörper 2C3 gegen *RASSF1C* war keine spezifische Bande zu sehen, obwohl die mRNA von *RASSF1C* in vielen Zelllinien nachzuweisen ist (Dammann et al., 2000).

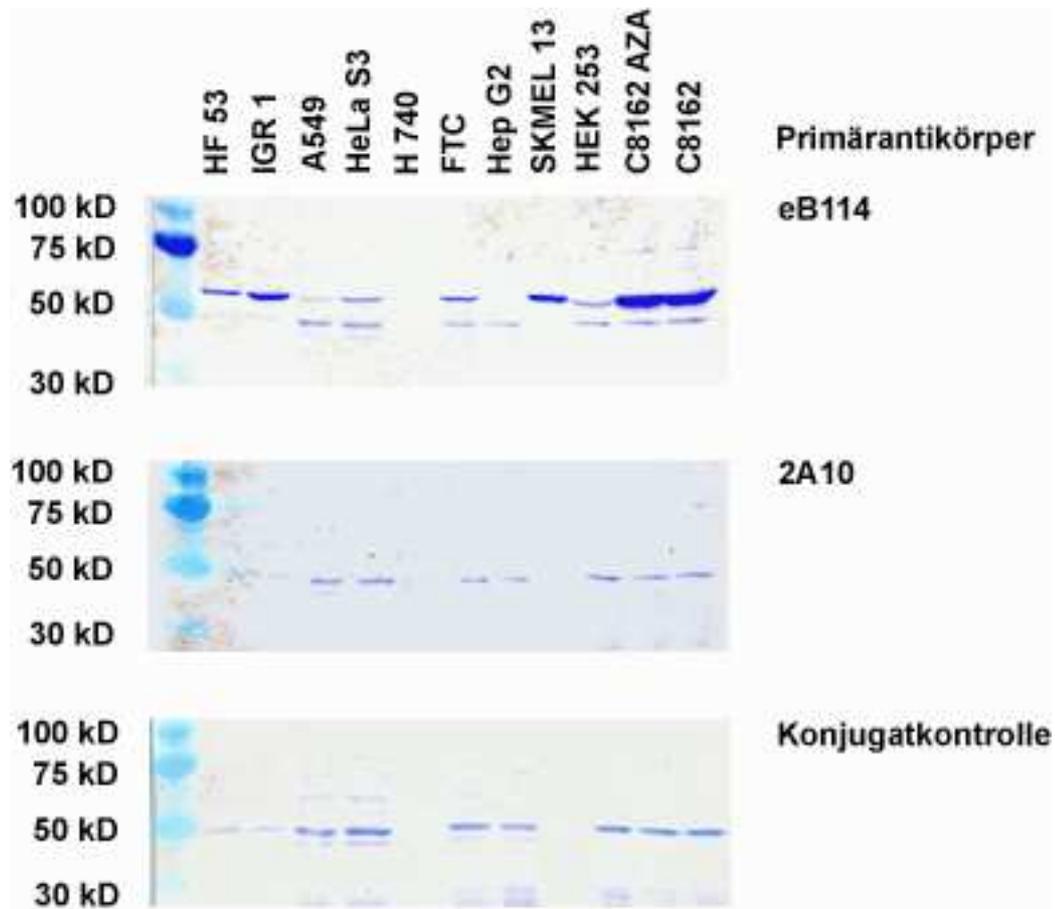


Abbildung 3.7: Westernblot nach 10%-SDS-PAGE des Gesamtproteinextraktes verschiedener Zelllinien mit zwei verschiedenen primären Antikörpern gegen RASSF1A und Konjugatkontrolle

3.2.3 Immunhistochemie an Schnitten maligner Melanome

Um die Daten der Promotor-Methylierung von *RASSF1A* hinsichtlich der Proteinexpression zu validieren, wurden Tumorproben von mehreren Patienten immunhistochemisch gefärbt. Es wurden Proben ausgewählt, bei denen entweder eine vollständige Methylierung, keine Methylierung oder eine intratumoral inhomogene Methylierung des Promotors nachgewiesen wurde. Von den ausgewählten Tumoren wurde jeder Schnitt gefärbt, an dem die Methylierung untersucht wurde. Als primärer Antikörper wurde eB114 verwendet.

In Abbildung 3.8 sind histochemische Untersuchungen einer Metastase dargestellt. Es handelt sich um die gleiche Metastase, deren Promotor-Methylierung von *RASSF1A* in Abbildung 3.2 gezeigt wurde. Die in Abbildung 3.8 HE und eB114 dargestellten Schnitte entsprechen dem Schnitt D aus Abbildung 3.2. Diese wies eine Promotor-Methylierung für *RASSF1A* auf, was darauf schließen lässt, dass *RASSF1A* in diesem Bereich inaktiviert ist.

Die HE-Färbung in Abbildung 3.8 HE dient zur Darstellung der Zellen. Hier sind mit Pfeil 1 hauptsächlich Tumorzellen mit prominentem Nukleus und geringer Größe zu sehen. Mit Pfeil 2 ist der Anschnitt eines Blutgefäßes, welches noch mit Erythrozyten gefüllt ist, markiert.

In Abbildung 3.8 eB114 ist die Färbung eines Schnittes aus dem gleichen Bereich zu sehen. Dieser wurde immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen RASSF1A gefärbt. Unveränderte Zellen, die RASSF1A exprimieren, erscheinen bei dieser Färbemethode rotbraun, während Tumorzellen mit blau gefärbtem prominenten Zellkern zu sehen sind (Pfeil 1). Es treten jedoch Tumorzellen auf, die zytosolisch rotbraun erscheinen und somit eine RASSF1A-Expression aufweisen (Pfeil 2). Ebenso ist eine Expression von RASSF1A in Endothelzellen eines Gefäßes zu beobachten (Pfeil 3). Diese Färbung zeigt, dass auch bei einem Methylierungssignal bei der MSP-Methode, die den Methylierungsstatus der DNA repräsentiert, das Protein RASSF1A intratumoral in Tumorzellen vorhanden sein kann. Hier ist auch auf die intratumorale Inhomogenität dieser Metastase zu verweisen. In den MSP-Untersuchungen wiesen nicht alle Proben dieser Metastase eine Methylierung des RASSF1A-Promotors auf. Somit war auch eine partielle Expression von RASSF1A in Proben zu erwarten, die in der MSP eine Methylierung zeigten.

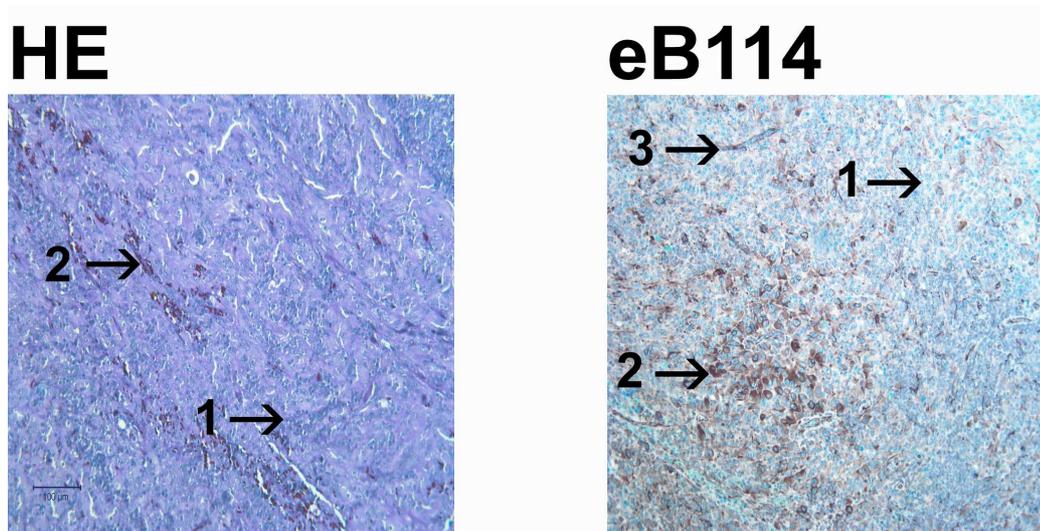


Abbildung 3.8: Darstellung einer histochemischen Färbung einer Melanommetastase in 12-facher Vergrößerung. In Bild HE ist eine HE-Färbung und in Bild eB114 eine immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper eB114 zu sehen. HE Pfeil 1: blau gefärbter prominenter Zellkern; HE Pfeil 2: angeschnittenes Blutgefäß; eB114 Pfeil 1: blau gefärbter prominenter Zellkern; eB114 Pfeil 2: Tumorzellen mit RASSF1A-Expression; eB114 Pfeil 3: Endothelzellen mit RASSF1A-Expression

Die Expression des RASSF1A-Proteins wurde in sieben verschiedenen Tumoren mit unterschiedlicher *RASSF1A* Promotor-Methylierung sowie einer unterschiedlichen Anzahl der intratumoralen Schnitte immunhistochemisch untersucht. Nach der Färbung wurde das Verhältnis der RASSF1A-positiven Tumorzellen zu den RASSF1A-negativen unter dem Mikroskop in 10 High-Power-Fields bestimmt und arithmetisch gemittelt. Auf diese Weise konnte ein Zusammenhang zwischen der intratumoralen DNA-Methylierung des Promotors und der vorhandenen *RASSF1A*-Proteinexpression dargestellt werden.

Die Tumore wurden mit 1-7 beziffert und unterschieden sich in der Promotor-Methylierung von *RASSF1A* wie folgt: in Tumor 1 und 2 ist in allen Schnitten eine Promotor-Methylierung zu sehen, bei Tumor 3 und 4 sind innerhalb der Tumore sowohl Abschnitte mit methyliertem als auch mit unmethyliertem Promotor zu finden und bei den Tumoren 5, 6 und 7 ist keine Promotor-Methylierung von *RASSF1A* zu beobachten.

In Abbildung 3.9 ist der Expressionsunterschied zwischen den unterschiedlichen Tumoren dargestellt. Diese Darstellung wurde aus Tabelle 8.11 im Anhang abgeleitet. Die Tumoren 1 und 2 wiesen nur in sehr wenigen Zellen RASSF1A auf. Die Tumore 3 und 4, bei denen eine intratumorale inhomogene *RASSF1A* Promotor-Methylierung vorlag, wichen in ihrer RASSF1A Proteinexpression nicht von den Tumoren 1 und 2 ab. Die Tumore 5 bis 7, die keine *RASSF1A* Promotor-Methylierung zeigten, wiesen auch eine dreifach höhere RASSF1A-Proteinexpression auf.

Diese Befunde zeigen, dass sich die Daten aus MSP-Untersuchungen immunhistochemisch begrenzt abbilden lassen.

Während bei den ersten vier Tumoren eine geringe Zahl von RASSF1A-positiven Zellen zu sehen ist, steigt diese etwa um das Dreifache an, wenn der Promotor unmethyliert vorliegt.

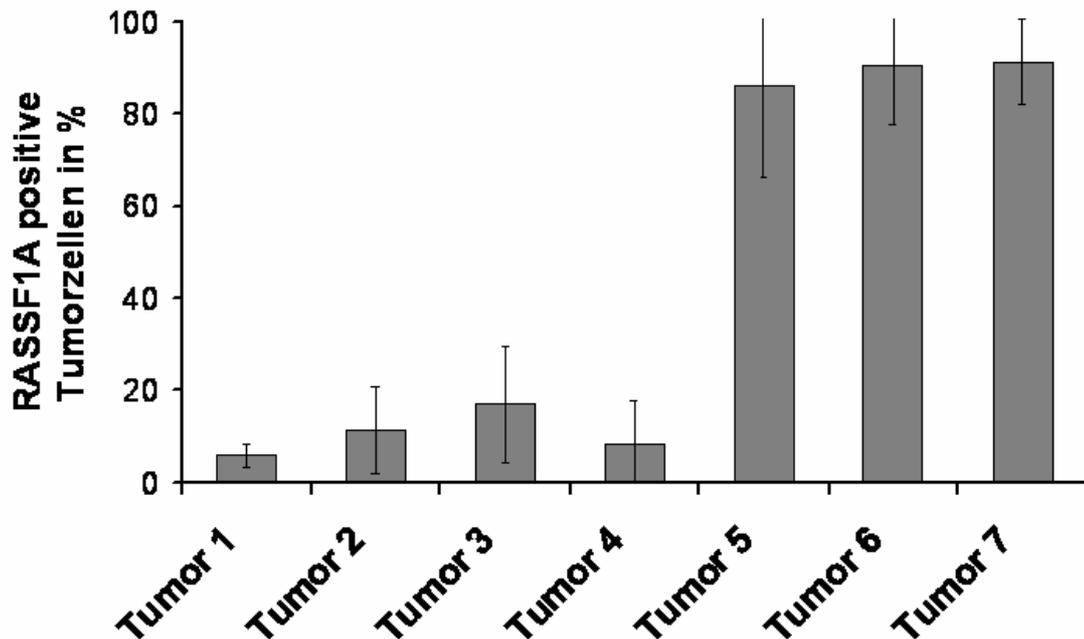


Abbildung 3.9: Graphische Darstellung von RASSF1A-positiven Zellen in verschiedenen Tumoren mit unterschiedlicher RASSF1A-Promotor-Methylierung. Für die untersuchten Tumore lag eine unterschiedliche Anzahl an Schnitten vor, so dass in der Graphik nicht alle Tumore die gleiche Anzahl an Messpunkten aufweisen. Es wurden in Tumorschnitten die RASSF1A-positiven Zellen in einem *High Power Field* (40x) ausgezählt und arithmetisch gemittelt (siehe Anhang Tabelle 8.11). Die Standardabweichung ist für Werte unter 0% und über 100% nicht dargestellt.

3.3 Proteinanalyse von RASSF1A/C als MBP-Fusionsproteine

3.3.1 Modifizierungsstellen von RASSF1A

Um potentielle Modifizierungsstellen des RASSF1A-Proteins zu finden, wurde die Primärsequenz von RASSF1A mit einer im Internet frei verfügbaren Datenbank verglichen. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.9 dargestellt. Dieses Ergebnis weist für drei verschiedene Protein-Kinasen mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen in RASSF1A auf. Zusätzlich sind noch Positionen vorhanden, an denen eine Myristoylierung möglich sein könnte, sowie je eine Position für eine Glykosylierung und eine Prenylierung.

Tabelle 3.9: Potentielle Modifizierungsstellen von RASSF1A nach Abgleich mit der Datenbank auf <http://ca.expasy.org/prosite/>

Modifizierungsstelle	Position	Primärsequenz^a
Casein-Kinase II- Phosphorylierungsstellen	24-27; 63-66; 117-120; 131-134; 184-187; 297-300	T r r E ; T w c D ; T n v D ; S q a E ; S l q D ; S m p E
Proteinkinase-C- Phosphorylierungsstellen	178-180; 179-181; 197-199; 275-277	S s K ; S k K ; S v R ; S d K
cAMP- und cGMP- abhängige Protein-Kinase- Phosphorylierungsstellen	199-202 200-203	RR r T ; RR t S
N-Myristylierungsstellen	79-84; 158-163	G L q c A H ; G S y t G F
N-Glykosylierungsstelle	286-289	N D S G
Prenylierungsstelle	337-340	C P L g

^a Der **fettgedruckte** Buchstabe bezeichnet die modifizierte Aminosäure

3.3.2 Phosphorylierungsstellen von MBP-RASSF1A

Zur Untersuchung von möglichen Phosphorylierungsstellen von RASSF1A und C wurde zunächst auf http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml nach potentiellen Aminosäuren gesucht. Die Primärsequenz wurde unter sehr stringenten Bedingungen, die eine hohe Selektivität ermöglichen, abgesucht. Mit dieser Abfragemethode zeigte sich, dass das Serin in Position 203 der Primärsequenz die einzige Aminosäure des RASSF1A-Proteins ist, die als potentielle Phosphorylierungsstelle in Frage kommt. Die entsprechende Kinase ist Protein-Kinase A, welche an die Primärsequenz RRTSF bindet und das Serin 203 in der Ras-Assoziationsdomäne phosphoryliert.

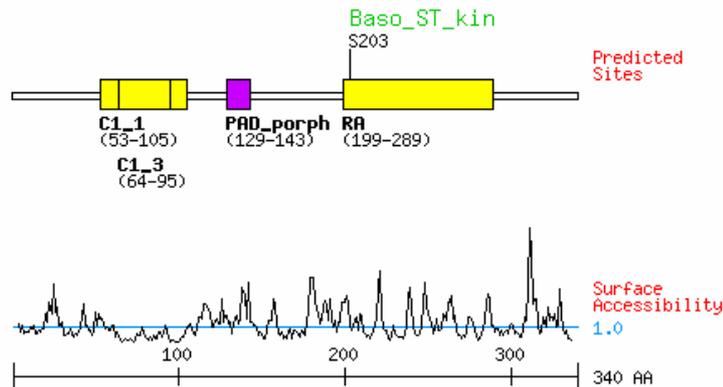


Abbildung 3.10: Postulierte Phosphorylierungsposition von RASSF1A unter http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtm; C1_1 und C1_3: DAG-Domäne; PAD_porph: ATM-Domäne; RA: RA-Domäne

Als weitere Region, die für eine Phosphorylierung in Frage kommt, wurde die ATM-Kinase-Domäne beschrieben (Kim et al., 1999; Shivakumar et al., 2002).

3.3.3 Expression von MBP-RASSF-Varianten in *E.coli*

Zur den *in vitro*-Untersuchungen möglicher Phosphorylierungsstellen wurde RASSF1A, RASSF1C sowie deren N-Termini und drei zusätzliche Mutanten als Fusionsproteine mit Maltose-bindendem-Protein (MBP) in *E.coli* überexprimiert. Folgende Expressionsvektoren wurden von MBP-RASSF1A hergestellt:

- MBP-RASSF1A- Δ ATM (RASSF1A ohne ATM-Kinase-Domäne)
- MBP-RASSF1A-S203F (RASSF1A; Serin 203 gegen Phenylalanin ausgetauscht)
- MBP-RASSF1A- Δ ATM-S203F (RASSF1A ohne ATM-Kinase-Domäne und mit S203F Mutation)

Die Aufreinigung erfolgte mittels einer Amylose-Affinitätsmatrix. Nach Induktion durch IPTG und einer Expressionszeit von etwa zwei bis drei Stunden betrug die Proteinausbeute durchschnittlich 185 μ g Fusionsprotein pro Gramm Nassmasse an *E.coli* Zellen.

3.3.4 Gelfiltration der Fusionsproteine

Aufgereinigte Fusionsproteine wurden durch Gelfiltration untersucht, um einerseits das Molekulargewicht abzuschätzen und andererseits zu prüfen, ob MBP-RASSF1A/C, wie beschrieben, Dimere bilden kann (Ortiz-Vega et al., 2002). Diese Untersuchungen

wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Fritz der AG Bio-Anorganische-Chemie an der Universität Konstanz durchgeführt.

Nach dem Auftragen der Proben auf die Sepharose-Säule erfolgte die Detektion bei Wellenlängen von 220, 280 und 400 nm. Bei einer Wellenlänge von 220 nm absorbierte die Peptidbindung im Rückgrat (Backbone) des Proteins. Mit 280 nm werden die aromatischen Aminosäuren F, Y und W detektiert. Mit 400 nm, einer Wellenlänge, bei der Proteine eigentlich nicht absorbieren, sollten hier Proteinaggregate oder Kofaktoren nachgewiesen werden. Dieser Kofaktor könnte bei den MBP-Fusionsproteinen Zink in der DAG-Domäne oder möglicherweise Eisen sein, da es sich um ein rekombinantes Protein aus *E.coli* handelt und in *E.coli* Bakterien auch Eisen-Schwefel-Cluster statt Zink integriert werden können (Archer et al., 1994).

In Abbildung 3.11 sind in den Diagrammen A-D die verschiedenen Gelfiltrationen von MBP-Fusionsproteinen dargestellt. Das Diagramm D zeigt eine Eichgerade mit Standardproteinen unter den Filtrationsbedingungen dieser Gelfiltration.

Bei allen vier Diagrammen ist der erste Peak bei 7,5-7,9 ml zu sehen. Dies entspricht einer Größe von etwa 3000-6000 kD. MBP-Fusionsproteine liegen in Lösung nicht als Monomere oder Dimere vor, wenn Sie in *E.coli* rekombinant hergestellt werden, sondern als hochpolymere Aggregate. Diese Aggregatbildung kann verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise wurden die Fusionsproteine in *E.coli* nicht richtig gefaltet, so dass sich große hydrophobe Bereiche nicht im Proteininneren, sondern im äußeren Bereich befinden. Eine weitere Möglichkeit ist eine generelle Hydrophobizität des Proteins, wie sie bei kleinen Signalmolekülen vorkommen kann. In beiden Fällen sorgt das Maltose-bindende Protein dafür, dass das entsprechende Protein in Lösung bleibt. Die sich bildenden großen Aggregate beruhen wahrscheinlich darauf, dass MBP eine hydrophile Hülle um die aggregierenden Varianten von RASSF1-Polypeptidketten bildet. Bei den nachfolgenden Peaks handelt es sich um präparationsbedingte Verunreinigungen und Pufferbestandteile.

Die in A und D auftretenden Peaks bei etwa 17 ml sind vermutlich Mercaptoethanol-Disulfide, da in beiden Proben im Puffer β -Mercaptoethanol enthalten war.

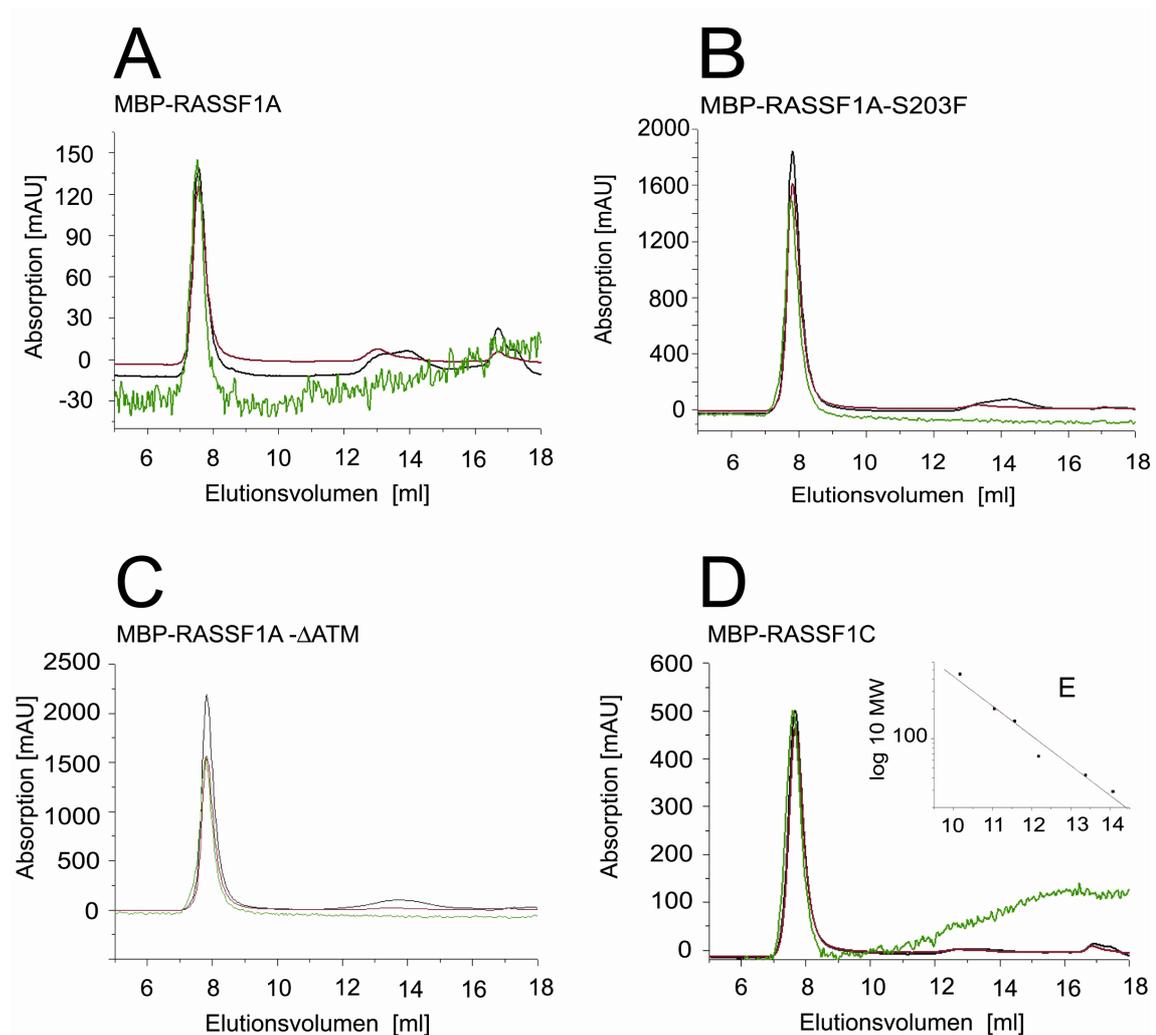


Abbildung 3.11: Die vier Diagramme zeigen die Läufe der Gelfiltrationen von MBP-RASSF1A (A), MBP-RASSF1A-S203F (B), MBP-RASSF1A- Δ ATM (C) und MBP-RASSF1C (D). Der rote Graph zeigt die Absorption bei 220 nm, der schwarze bei 280 nm (x10) und der grüne bei 400 nm (x200). Bei 220 nm absorbiert das Rückgrat der Peptidkette, bei 280 nm die aromatischen Reste von Aminosäuren und bei 400 nm können in Proteine eingelagerte Kofaktoren detektiert werden. E: Proteineichgerade für alle abgebildeten Gelfiltrationen

3.3.5 Limitierte Proteolyse von RASSF1A

Um weitere Angaben zur Struktur des Fusionsproteins MBP-RASSF1A machen zu können, wurde das Fusionsprotein einer partiellen Proteolyse unterzogen. Hierbei wurde der unvollständige Verdau des Fusionsproteins durch drei verschiedene Endoproteasen untersucht. Durch den unvollständigen Verdau kann die Größe von stabil gefalteten Domänen bestimmt werden, da die Proteasen zuerst an gut zugänglichen und wahrscheinlich ungefalteten Regionen schneiden. Als Proteasen wurden Trypsin, Chymotrypsin und Proteinase-K in verschiedenen Konzentrationen in einem Zeitraum von 10 bis 90 Minuten eingesetzt.

Bei allen drei limitierten Proteolysen, die in Abbildung 3.12 dargestellt sind, ist die Doppelbande von MBP-RASSF1A zwischen 60 und 100 kD in den Comassiegefärbten 10%-igen SDS-Gelen zu sehen. Diese Doppelbande ist präparativ bedingt. Trotz verschiedener Präparationsbedingungen ist es nicht gelungen, MBP-RASSF1A so zu isolieren, dass es als eine Bande in einer SDS-PAGE erscheint. Da sich MBP ohne Probleme als eine Bande isolieren lässt, ist anzunehmen, dass ein partieller proteolytischer Abbau vom C-Terminus ausgeht. Beide Banden von MBP-RASSF1A werden im Reaktionsverlauf von allen drei Proteasen zu gleichen Teilen abgebaut. Keine dieser Banden unterliegt einem schnelleren proteolytischen Abbau. Dieser erfolgt je nach Protease in unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Proteinase-K baut das Fusionsprotein am schnellsten ab, weswegen in Abbildung 3.12 C der Abbau mit einer Proteinase-K-Konzentration gezeigt wird, die 100-fach geringer ist als die Proteasekonzentration bei Chymotrypsin und Trypsin. In allen drei Reaktionen entstehen im Verlauf der Reaktionszeit stabile Spaltpeptide. In Abbildung 3.12 A und B sind knapp unter 45 kD zwei Banden zu sehen, wovon die untere im Reaktionsverlauf zunimmt und die obere in A stabil bleibt und in B abgebaut wird. Proteinase-K erzeugt hier zwei Fragmente, die beide im Verlauf in höherer Konzentration vorliegen. Der proteolytische Abbau mit Chymotrypsin erzeugt zwischen 45 kD und 30 kD zwei stabile Fragmente in geringer Konzentration, die bei keiner der anderen Proteolysen zu sehen sind. Trypsin erzeugt wie auch Proteinase-K an dieser Stelle ein Fragment.

In allen drei Abbauvarianten zeigen sich Protease-spezifische stabile Fragmente, welche für stabil gefaltete Domänen des rekombinanten Fusionsproteins MBP-RASSF1A sprechen. Für weitere funktionelle und strukturelle Untersuchungen könnten so stabil gefaltete Bereiche charakterisiert werden.

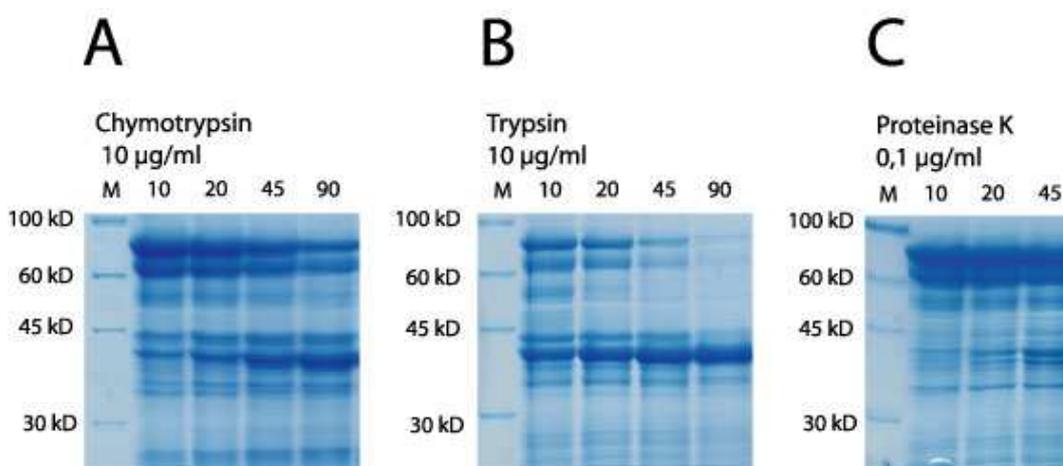


Abbildung 3.12: Limitierte Proteolyse mit A: Chymotrypsin, Reaktionszeit: 10 / 20 / 45 / 90 min.; B: Trypsin, Reaktionszeit: 10 / 20 / 45 / 90 min.; C: Proteinase-K, Reaktionszeit: 10 / 20 / 45 min.; SDS-Gele (10%) Comassiegefärbt

3.4 Phosphorylierungsuntersuchung an MBP-Fusionsproteinen

Aufgrund der in 3.3.2 und der in der Literatur postulierten Phosphorylierungsstellen wurden folgende Varianten von MBP-RASSF1A auf Phosphorylierung untersucht:

- MBP-RASSF1A
- MBP-RASSF1A-NT (N-Terminus von RASSF1A [AS 1-121])
- MBP-RASSF1A- Δ ATM (RASSF1A ohne ATM-Kinase-Domäne [ohne AS 125-138])
- MBP-RASSF1A-S230F (RASSF1A; Serin 203 gegen Phenylalanin ausgetauscht)
- MBP-RASSF1A- Δ ATM-S203F (RASSF1A ohne ATM-Kinase-Domäne und mit S203F Mutation)
- MBP-RASSF1C
- MBP-RASSF1C-NT (N-Terminus von RASSF1C [AS 1-52])

Die Fusionsproteine wurden direkt aus *E.coli*-Extrakt aufgereinigt und waren somit vor der Phosphorylierung an eine Amylose-Matrix gebunden. Aufgrund der Ergebnisse der Gelfiltration, die zeigte, dass diese MBP-Fusionsproteine als Aggregate vorliegen, ergab sich die Notwendigkeit, diese Aggregate durch die Bindung an eine Amylose-Matrix aufzulösen, um die Phosphorylierung untersuchen zu können. Diese Matrix wurde mit Zellextrakt aus der Melanomzelllinie IGR1 inkubiert. Nach der Inkubation wurde Kinase-Reaktionspuffer sowie $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP hinzugegeben. Die Proben wurden dann durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel mit Comassie gefärbt und anschließend unter einem Phosphorscreen inkubiert.

In Abbildung 3.13 ist in A das Comassie-gefärbte Gel zu sehen. Die gereinigten Fusionsproteine sind präparationsbedingt immer als Doppelbande zu sehen. Als Negativkontrolle wurde MBP ohne Fusion der Phosphorylierung unterzogen. Das Gel zeigt, dass etwa gleiche Mengen Fusionsprotein aufgetragen wurden.

In Abbildung 3.13 B ist die durch radioaktives Phosphat verursachte Schwärzung des Comassie-gefärbten Gels zu sehen. Die Fusionsproteine MBP-RASSF1A, MBP-RASSF1A- Δ ATM und MBP-RASSF1C sind demnach phosphoryliert, wohingegen die N-Termini von MBP-RASSF1A und MBP-RASSF1C nicht phosphoryliert werden.

Die Punktmutation des Serins 203 zu Phenylalanin verhindert eine Phosphorylierung sowohl von MBP-RASSF1A als auch von dessen Mutation ohne ATM-Kinase-Domäne. Dieses Experiment lässt vermuten, dass RASSF1A an seiner Ras-Assoziationsdomäne am Serin 203 phosphoryliert wird.

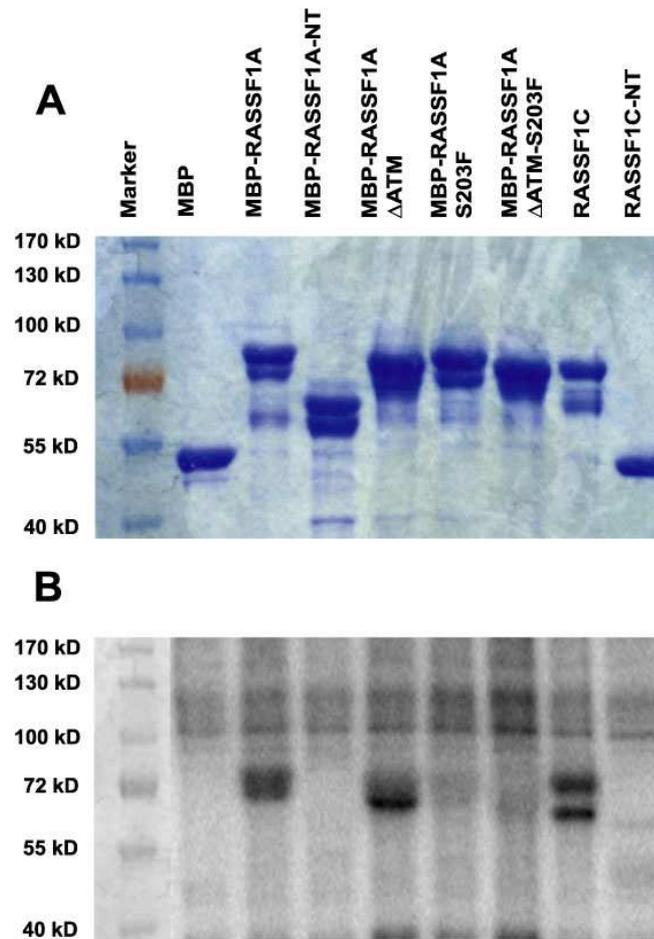


Abbildung 3.13: Darstellung eines Coomassie-gefärbten 10%-igen SDS-Polyacrylamidgels in A mit MBP-RASSF1A/C-Fusionsproteinen und Mutanten nach einer Phosphorylierung mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. In B ist die Abbildung der phosphorylierten Fusionsproteine auf einem Phosphorschirm dargestellt.

3.4.1 Zellfreie Phosphorylierungsstudien an MBP-RASSF1A

Die phosphorylierte Primärsequenz von RASSF1A ist der Datenbankanalyse zufolge eine spezifische Sequenz für eine Phosphorylierung durch Protein-Kinase A. Um diese These zu prüfen, wurde ein zellfreier Versuch durchgeführt, bei welchem nur Protein-Kinase A-Puffer und rekombinante Protein-Kinase A zu dem an Amylose-Matrix gebundenen Fusionsprotein MBP-RASSF1A gegeben wurde.

Die zellfreie Phosphorylierung von MBP-RASSF1A wurde zum einen mit Protein-Kinase A und zum anderen mit Casein-Kinase I untersucht. In einer Hefe-2-Hybrid-Untersuchung wurde in der eigenen Arbeitsgruppe Casein-Kinase I als putativer Interaktionspartner identifiziert, so dass die zellfreie Phosphorylierung auch mit dieser Kinase untersucht wurde.

Es wurde festgestellt, dass nur die Protein-Kinase A, nicht aber die Casein-Kinase I in der Lage ist, MBP-RASSF1A zu phosphorylieren (siehe Abbildung 3.14).

Wenn im Zellextrakt Protein-Kinase A für die Phosphorylierung verantwortlich ist, sollte in einem zellfreien *in vitro*-Versuch die rekombinante Protein-Kinase A bei der Phosphorylierung der MBP-Fusionsproteine, wie sie in 3.3.2 dargestellt sind, die gleichen Fusionsproteine phosphorylieren.

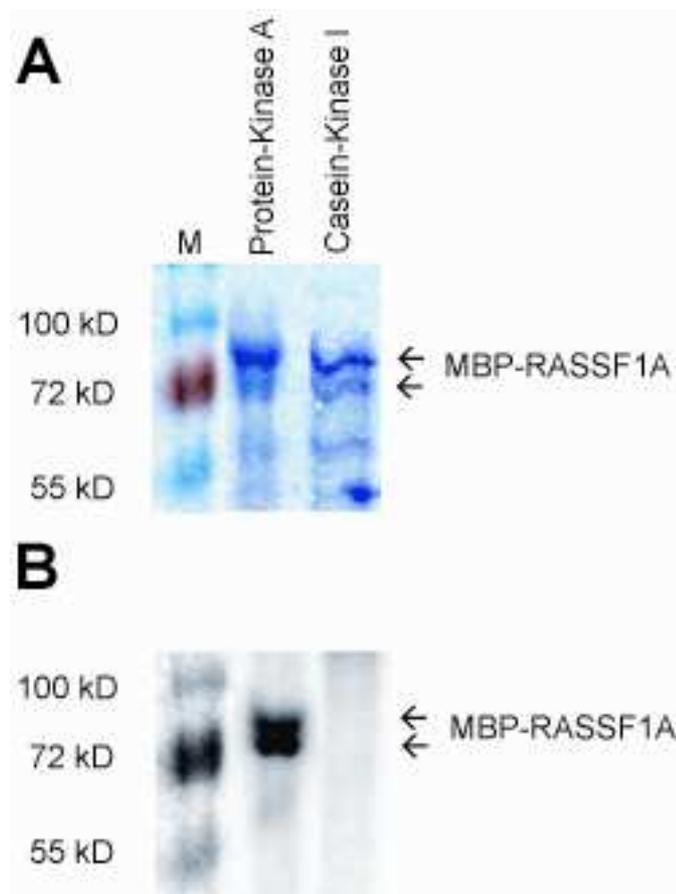


Abbildung 3.14: Darstellung einer Phosphorylierung von MBP-RASSF1A mit rekombinanter Protein-Kinase A und Casein-Kinase I. Bild A zeigt ein Comassie-gefärbtes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel und Bild B die Abbildung von A auf einem Phosphorschirm.

Die Ergebnisse der zellfreien *in vitro*-Phosphorylierung sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Das Comassie-gefärbte Gel in Bild A zeigt, dass die aufgetragene Proteinmenge nicht gleich ist. Die Fusionsproteine MBP-RASSF1A und MBP-RASSF1A- Δ ATM sind in geringerer Menge vorhanden. Trotz dieses Befundes sind die Banden dieser beiden Fusionsproteine stärker auf dem Phosphorschirm zu sehen, als die Signale der Fusionsproteine MBP-RASSF1A-S203F und MBP-RASSF1A- Δ ATM-S203F, die in deutlich größerer Menge vorhanden sind. Das Signal von MBP-RASSF1C ist ebenfalls sehr stark zu sehen, was auf die große aufgetragene Proteinmenge zurückzuführen ist. Die schwachen Phosphorylierungssignale von MBP-RASSF1A-S203F und MBP-RASSF1A- Δ ATM-S203F in Abbildung 3.15 B sind darauf zurückzuführen, dass diese Fusionsproteine in größerer Menge aufgetragen wurden.

Anzunehmen wäre ebenfalls, dass durch einen Überschuss an Protein-Kinase A das Tyrosin vor dem Phenylalanin in der Primärsequenz (RR^TFF) der Fusionsproteine in geringer Menge phosphoryliert wird (siehe Tabelle 3.9 und Kapitel 3.3.2).

Unter Berücksichtigung der aufgetragenen Proteinmengen sowie der Möglichkeit der Tyrosin-Phosphorylierung werden bei der *in vitro*-Phosphorylierung durch Protein-Kinase A die gleichen MBP-Fusionsproteine phosphoryliert wie von dem Zellextrakt der IGR1 Zelllinie. Es ist somit möglich, dass RASSF1A auch *in vivo* einer Phosphorylierung der Protein-Kinase A unterliegt.

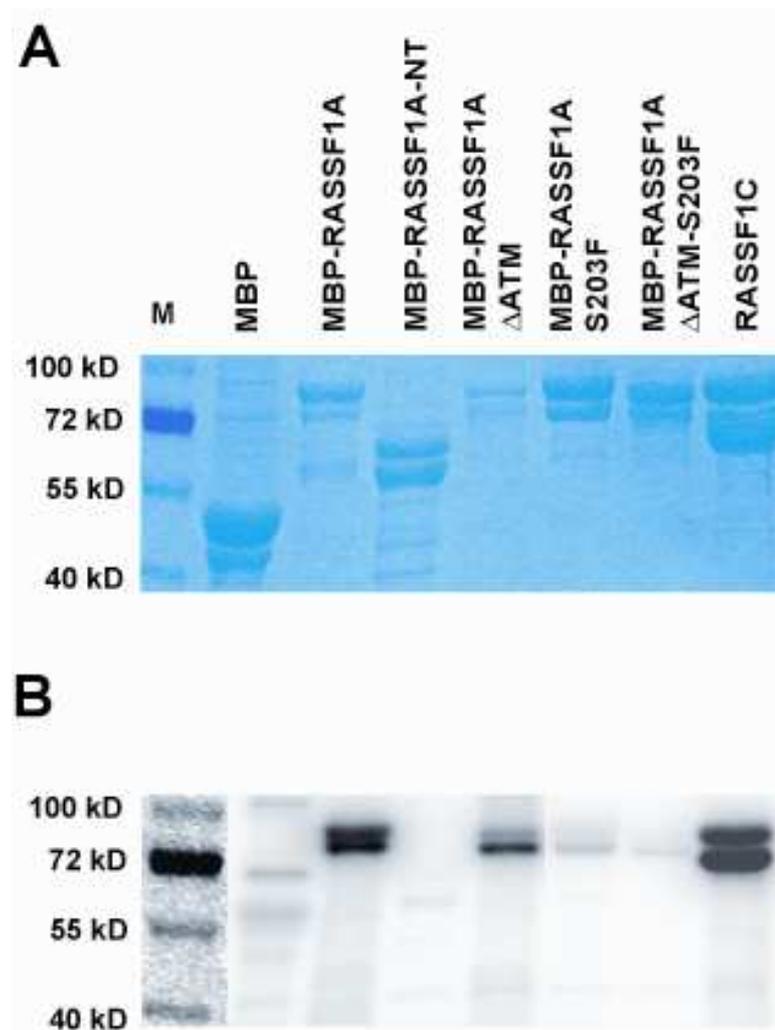


Abbildung 3.15: Darstellung der Phosphorylierung von MBP-RASSF1A und Mutationen sowie von RASSF1C mit Protein-Kinase A. Bild A zeigt ein Coomassie-gefärbtes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel und Bild B das Gel von A auf einem Phosphorschirm.

3.4.2 Phosphorylierung von Flag-RASSF1A aus humanen Zellen

Um ausschließen zu können, dass die Phosphorylierung nur an rekombinantem Fusionsprotein aus *E.coli* aufgrund einer falschen Proteinfaltung stattfindet, wurde überexprimiertes RASSF1A aus humanen Zellen isoliert. Zu diesem Zweck wurden HEK293-Zellen mit einem Plasmid transformiert, welches das Fusionsprotein Flag-RASSF1A kodierte. Somit konnte das Flag-Fusionsprotein mit Flag-Agarose aufgereinigt werden. Flag-RASSF1A wurde für die Phosphorylierungsreaktion an die Agarose-Matrix gebunden. Die weitere Phosphorylierung wurde wie bei MBP-RASSF1A durchgeführt. In einem nächsten Versuch wurde nach der SDS-PAGE ein Westernblot durchgeführt. Die Flag-Fusionsproteine konnten so mit Anti-Flag-Antikörper nachgewiesen werden. Dieser Westernblot wurde anschließend auf einem Phosphorschirm inkubiert.

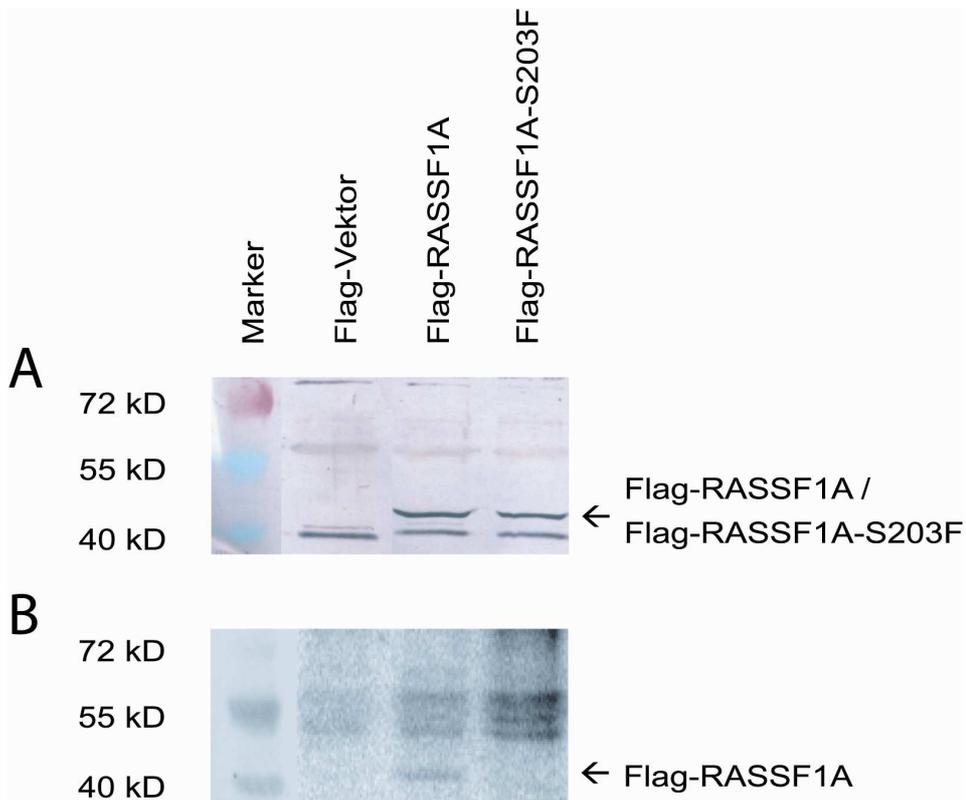


Abbildung 3.16: Phosphorylierung von humanem Flag-RASSF1A und Flag-RASSF1A-S203F; Bild A: Westernblot mit Anti-Flag als primärem und Anti-Maus-IgG-Peroxidase als sekundärem Antikörper Bild B: Westernblot nach Inkubation auf Phosphorschirm;

Die Phosphorylierung von humanem Flag-RASSF1A und Flag-RASSF1A-S203F zeigt die gleiche Phosphorylierung wie die MBP-Fusionsproteine. Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, bewirkt der Aminosäureaustausch von Serin 203 gegen Phenylalanin

eine Löschung des Signals. Das so veränderte Protein wird auch in humanen Zellen nicht phosphoryliert.

3.4.3 Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung

Weiterhin wurde die Phosphorylierung in Abhängigkeit des Zellzyklus untersucht. Die Zelllinie IGR1 lässt sich mit Methotrexat synchronisieren. Methotrexat inhibiert die Dihydrofolatreduktase, wodurch die Zellen in der G0/G1-Phase arretiert werden. Nach Entfernen des Methotrexat setzen nahezu alle Zellen gleichzeitig den Zellzyklus fort. So können aus synchronisierten Zellen während des fortschreitenden Zellzyklus Extrakte gewonnen werden, deren Kinaseaktivitäten zellzyklusspezifisch ist. Dieses Zellextrakt wurde eingesetzt, um MBP-RASSF1A radioaktiv zu phosphorylieren.

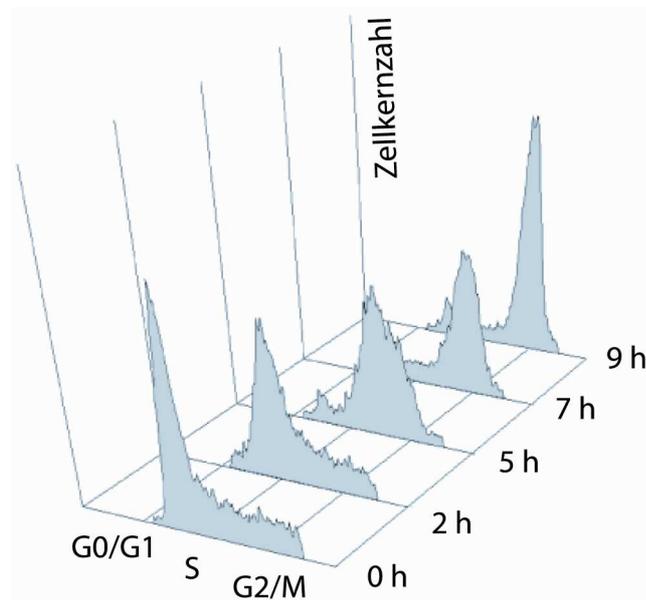


Abbildung 3.17: Zellzyklusstatus von synchronisierten IGR1-Zellen 0 h, 2 h, 5 h, 7 h, 9 h nach der Entfernung von Methotrexat

Der Zellzyklusstatus von synchronisierten IGR1-Zellen wurde anhand der im Kern befindlichen DNA-Mengen per FACS bestimmt. Während des Zellzyklus verdoppelte sich die DNA-Menge von der G0/G1-Phase zur G2/M-Phase. Die Zellkerne wurden aus der Zellkultur isoliert, die DNA mit Propidiumjodid angefärbt und anschließend vermessen. Wie Abbildung 3.17 zeigt, sind IGR1-Zellen nach einer Methotrexat Behandlung alle im G0/G1-Status. Bereits zwei Stunden nachdem das Methotrexat entfernt wurde, traten alle Zellen allmählich in die S-Phase ein. Nach fünf Stunden befanden sich alle Zellen in der S-Phase. Nach sieben Stunden waren nur noch Zellen in der G2/M-Phase zu sehen. Nach neun Stunden befanden sich die meisten

Zellen immer noch in der G2/M-Phase, die Zellen wurden nun jedoch wieder asynchron, was an dem kleinen vorderen Peak zu sehen ist. Zu jedem dieser Zeitpunkte wurde das isolierte Zellextrakt zur Phosphorylierung von MBP-RASSF1A verwendet.

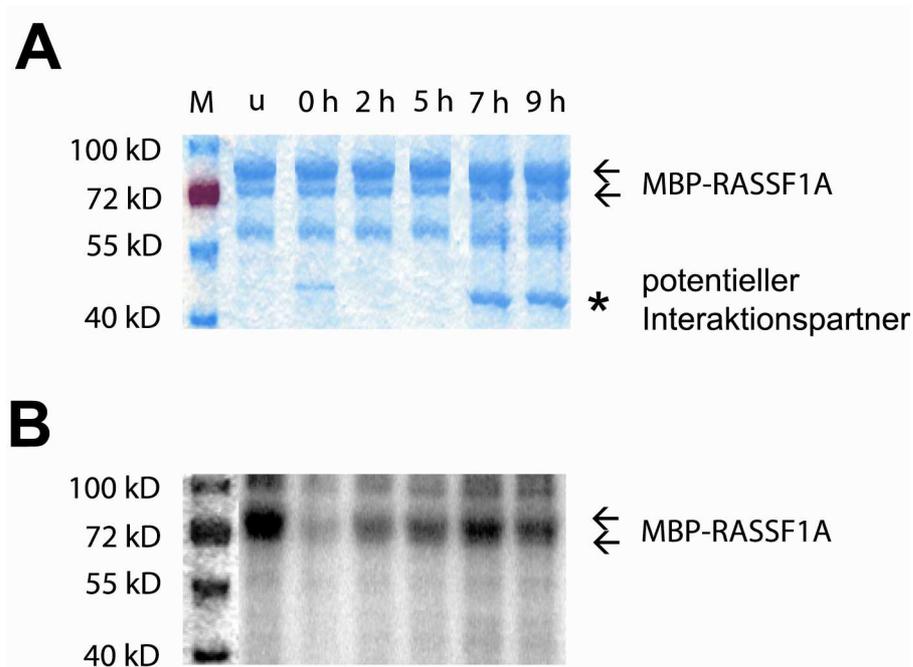


Abbildung 3.18: Darstellung einer zellzyklusabhängigen Phosphorylierung von RASSF1A durch Zellextrakt synchronisierter IGR1-Zellen. In Bild A ist ein Coomassie-gefärbtes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel und in B die Abbildung von A auf einem Phosphorschirm zu sehen. u: Zellextrakt aus unbehandelten Zellen, 0-9 h: Zellextrakt aus Zellen 0-9 h nach Methotrexatentfernung; * potentielle Interaktionspartner

In Abbildung 3.18 ist die zellzyklusabhängige Phosphorylierung von MBP-RASSF1A dargestellt. In Bild A ist die Doppelbande von MBP-RASSF1A zu sehen. In diesem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel fällt auf, dass zwei Banden bei etwa 43 kD (7h und 9h) und eine bei etwa 47 kD (0h) zu sehen sind. Diese Banden können keine Fragmente aus der Aufreinigung des Fusionsproteins aus *E.coli* sein, da sie sonst auf jeder Gelbahn sichtbar wären. Es liegt nahe, dass diese Banden auf die Zellextrakte aus synchronisierten IGR1-Zellen zurückzuführen sind. Das Fusionsprotein wurde vor der Kinase-Reaktion mit Zellextrakt inkubiert, welches dann wieder entfernt wurde. Es könnte sich daher um zellzyklusabhängige Interaktionspartner handeln.

In Abbildung 3.18 B ist die Phosphorylierung von MBP-RASSF1A dargestellt. Die stärkste Phosphorylierung ist auf der ersten Bahn zu sehen, bei der MBP-RASSF1A mit unbehandeltem Zellextrakt inkubiert wurde. Bei den Phosphorylierungsreaktionen mit Zellextrakt aus synchronisierten Zellen sind die Signale schwächer. Es ist aber gut zu beobachten, dass die Fähigkeit des Zellextraktes, MBP-RASSF1A zu phosphorylieren, in Abhängigkeit des Zellzyklus unterschiedlich ist. So wird MBP-

RASSF1A von Zellextrakt in der G1/G0-Phase am schwächsten phosphoryliert. Hier tritt auch die erste Bande im Comassie-gefärbten Gel bei etwa 47 kD auf. Mit fortschreitendem Zellzyklus nimmt auch die Phosphorylierung des Fusionsproteins zu, bis zu dem Zeitpunkt (7 h), an dem sich die Zellen in der G2/M-Phase befinden. Nach neun Stunden wird das Signal wieder schwächer, was auf die zunehmende Asynchronität zurückgeführt werden kann. Die Signalstärken wurden mittels eines Densimeters berechnet. Es konnte festgestellt werden, dass die Phosphorylierung von MBP-RASSF1A, bezogen auf Abbildung 3.19, in der G0/G1-Phase am geringsten war. In der G2/M-Phase nahm die Phosphorylierung um das Dreifache gegenüber der G0/G1-Phase zu. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Phosphorylierung zellzyklusspezifisch ist.

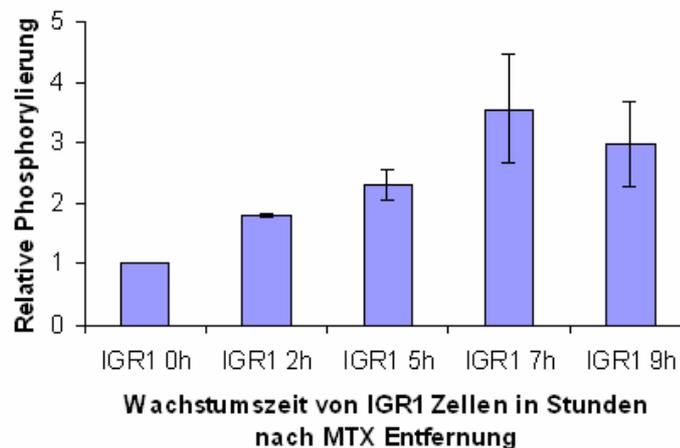


Abbildung 3.19: Darstellung der relativen Phosphorylierung von MBP-RASSF1A in Abhängigkeit des Zellzyklus. Die Phosphorylierung wurde mit Zellextrakt aus synchronisierten IGR1-Zellen durchgeführt.

Die Banden bei ca. 43 kD, die nach sieben und neun Stunden nach Methotrexat Entfernung auftreten und die Bande bei ca. 47 kD, die auftritt, wenn sich die Zellen noch in der G1/G0-Phase befinden (0h), sind im Comassie-gefärbten Gel zu sehen. Sie konnten allerdings nicht über den Phosphorschirm detektiert werden und sind somit nicht radioaktiv.

Stellen diese Banden Interaktionspartner dar, so liegen sie nicht phosphoryliert vor. Denkbar ist aber eine Interaktion, die in Abhängigkeit der Phosphorylierung von RASSF1A stattfindet.

Um zu beurteilen, durch welche Faktoren diese zellzyklusspezifische Phosphorylierung zustande kommt, wurde die Aktivität der Protein-Kinase A während der verschiedenen Zellzyklusphasen untersucht.

3.4.4 Abhängigkeit der Protein-Kinase A-Aktivität vom Zellzyklus

Eine erhöhte Phosphorylierung durch stärkere Protein-Kinase A-Aktivität würde auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von RASSF1A und Protein-Kinase A hindeuten. Wenn dieser Zusammenhang nicht besteht und keine zellzyklusspezifische Protein-Kinase A-Aktivität zu beobachten ist, so wird die Phosphorylierung von RASSF1A vermutlich durch andere Faktoren gesteuert. Die Protein-Kinase A-Aktivität wurde mit dem SignaTECT® cAMP-Dependent-Protein-Kinase (PKA)-Assay-System-Kit bestimmt.

Die Aktivitätsbestimmung der Protein-Kinase A wurde in Zellextrakt von synchronisierten IGR1-Zellen bestimmt. Das durch ^{32}P markierte Standardsubstrat der Protein-Kinase A wurde über einen Phosphorschirm bestimmt und mit der Software ImageQuant® ausgewertet. Die Ergebnisse einer Fünffachbestimmung sind in

Abbildung 3.20 dargestellt.

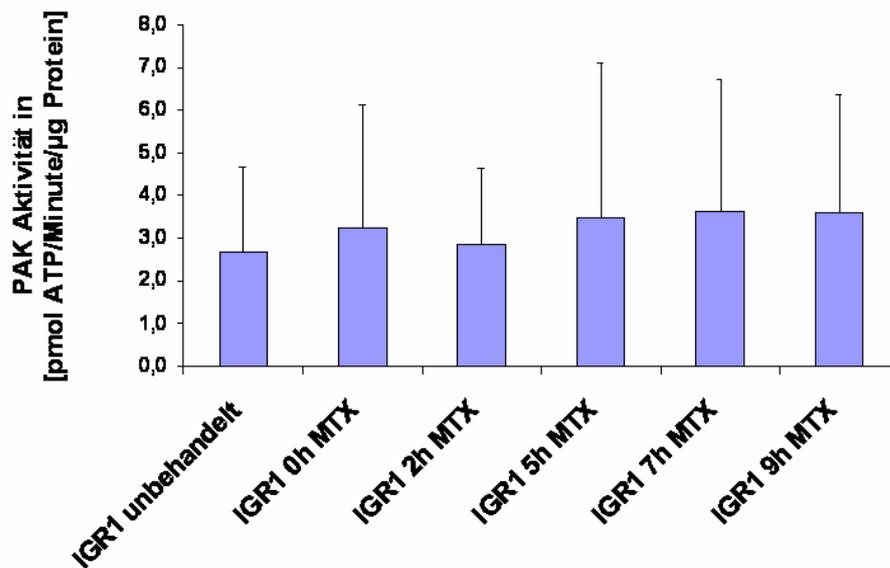


Abbildung 3.20: Protein-Kinase A-Aktivität in Zellextrakt aus unbehandelten und synchronisierten IGR1-Zellen; MTX: Methotrexat

Es konnte keine signifikante, zellzyklusspezifische Aktivität festgestellt werden. Die durchschnittliche Protein-Kinase A-Aktivität liegt etwa zwischen 2,5 und 3,5 pmol γ ^{32}P -ATP/Minute/µg Gesamtzellprotein.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die zellzyklusspezifische Phosphorylierung, von RASSF1A wahrscheinlich nicht auf Aktivitätsunterschiede von Protein-Kinase A während des Zellzyklus zurückzuführen ist. Die Phosphorylierung von RASSF1A wird somit von anderen Faktoren reguliert.

4 Diskussion

4.1 Epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in malignen Melanomen

Melanome sind stark maligne Tumore, die sich aus Melanozyten entwickeln und sehr schnell metastasieren. In solchen Metastasen konnten unterschiedliche Mutationen nachgewiesen werden, die auf eine genetische Instabilität hindeuten (Lotem et al., 2003; Nakayama et al., 2001). Auch in Stammzelllinien von primären malignen Melanomen wurden in einem frühen Entwicklungsstadium verschiedene Mutationen nachgewiesen (Helmbold et al., 2005). Die Mechanismen der genetischen Instabilität von malignen Melanomen sind bisher nicht weiter untersucht. Die epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen stellt einen entscheidenden Schritt in der Tumorentwicklung dar (Jones and Baylin, 2002). Um die Polyklonalität von malignen Melanomen auf epigenetischer Ebene näher zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die intratumorale epigenetische Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *Rb*, *p16^{INK4a}*, *DAPK* und *MGMT* untersucht.

Die bisherigen Arbeiten zeigen pro primären Tumor oder pro Metastase eine Methylierungsuntersuchung, das heißt, dass nur eine Probe pro Tumor entnommen wurde. Daher sind die Daten nur bedingt mit denen in der vorherigen Untersuchung vergleichbar, da hier mehrere Proben eines Tumors untersucht wurden.

Bei malignen Melanomen wiesen die Primärtumore eine 20%-ige Hypermethylierung des *RASSF1A*-Promotors auf. Diese Häufigkeit liegt in dem bereits von Hoon et al. beschriebenen Bereich für die Hypermethylierung des *RASSF1A*-Promotors in Primärtumoren (Hoon et al., 2004). Dort wurde bei Primärtumoren eine Hypermethylierung von 15% beschrieben. Innerhalb der hier untersuchten Primärtumore zeigen allerdings nicht alle Proben ein intratumoral homogenes Muster für die *RASSF1A*-Promotor-Methylierung. In einem Primärtumor war eine intratumoral inhomogene *RASSF1A*-Promotormethylierung zu sehen. Bei Metastasen war die intratumorale Inhomogenität der Promotor-Methylierung stärker ausgeprägt, als bei Primärtumoren. Hier zeigten 9% der Metastasen eine intratumoral homogene Hypermethylierung des *RASSF1A*-Promotors, während 18% ein intratumoral inhomogenes Methylierungsmuster aufwiesen. Ein Großteil der Proben, sowohl von Primärtumoren (80%) als auch von Metastasen (72%), zeigte jedoch keine Promotor-Methylierung von *RASSF1A*. Diese Ergebnisse weichen von den in der Literatur beschriebenen Werten ab. So wurde in Metastasen eine Promotor-Methylierung von 41% (Spugnardi et al., 2003) und 57% (Hoon et al., 2004) beschrieben.

Aufgrund der homogenen Promotor-Methylierung von *RASSF1A* in einigen Primärtumoren und Metastasen kann angenommen werden, dass die *RASSF1A*-Inaktivierung eine kritische Rolle bei der Entstehung von malignen Melanomen spielt. In Primärtumoren ist eine geringere Anzahl von inhomogen methyliertem *RASSF1A*-Promotor zu sehen, was auf eine frühe epigenetische Inaktivierung in der Entwicklung von malignen Melanomen hindeutet. Bei einer Inaktivierung zu einem späteren Zeitpunkt in der Karzinogenese würde man eine größere intratumorale Heterogenität in Primärtumoren erwarten.

Die Inaktivierung von *RASSF1A* könnte für die weitere Entwicklung von malignen Melanomen notwendig sein, denn die intratumorale inhomogene Methylierung des *RASSF1A*-Promotors scheint bei deren Metastasen zuzunehmen. Das heißt, dass mehrere Proben innerhalb einer Metastase eine Methylierung des *RASSF1A*-Promotors aufweisen.

Dennoch ist die Anzahl der primären Tumore und der Metastasen mit *RASSF1A*-Promotor Methylierung gering. Eine weitere Möglichkeit, die zu einem malignen Melanom führen kann, ist die Signalkette, die durch RAS vermittelt wird.

Die drei menschlichen RAS-Proteine, H-RAS, K-RAS und N-RAS zeigen eine Strukturähnlichkeit von 84% und leiten die von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) vermittelten Signale in den Zellen weiter (Coleman et al., 2004; Cox and Der, 2003). Hierbei wird GDP an inaktivem RAS durch GTP ersetzt und RAS kann nun über mitogen aktivierende Kinasen (MAPK) die Proliferation von Zellen beeinflussen. Eine dieser MAPK ist B-RAF, welche durch verschiedene Phosphorylierungen aktiviert werden kann (siehe Kapitel 4.3.2). Eine permanente Aktivität von RAS oder den in der darauf folgenden Signalkaskade aktiven MAPK stellen Onkogene dar, welche die maligne Entwicklung von Melanozyten neben einer Inaktivierung von *RASSF1A* auslösen können.

So wurde bereits gezeigt, dass in 57% der malignen Melanomen und allen in dieser Arbeit untersuchten Melanomzelllinien entweder eine N-RAS-, K-RAS- oder B-RAF-Mutation vorliegt (Reifenberger et al., 2004). Weiterhin zeigten 22% der Melanome und 50% der Melanomzelllinien mit einer solchen Mutation eine reduzierte *RASSF1A*-Transkription (Reifenberger et al., 2004).

Dies deutet auf einen Zusammenhang bei der Entwicklung von malignen Melanomen hin, bei der nicht ausschließlich die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *RASSF1A* durch Promotor-Methylierung die entscheidende Rolle spielt, sondern mehrere unterschiedliche Effekte die Tumorentstehung fördern. Unter der Voraussetzung, dass *RASSF1A* als Tumorsuppressorgen fungiert, das in der Lage ist, die RAS vermittelte Proliferation zu hemmen, ist zu erwarten, dass bei malignen Melanomen mit zunehmender Entwicklungszeit die Zellen einen Wachstumsvorteil

haben, die ein permanentes Proliferationssignal (z.B. durch mutiertes RAS oder B-RAF) vorliegt oder eine Inaktivierung von *RASSF1A* (Reifenberger et al., 2004) aufweisen.

4.1.1 Inaktivierung von $p16^{INK4a}$ durch Promotor-Methylierung

Das Gen $p16^{INK4a}$ kodiert für ein Protein, welches Cyclin D-abhängige Kinasen inhibiert und so das Voranschreiten des Zellzyklus verhindern kann. Ein solcher Mechanismus sorgt für eine verlängerte Reproduktionsphase, in der die genomische Stabilität der Zelle eher erhalten bleibt, als in einer verkürzten Reproduktionsphase. Eine epigenetische Inaktivierung von $p16^{INK4A}$ durch Promotor-Methylierung würde zu einer kürzeren Reproduktionsphase führen.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene intratumoral homogene Promotor-Methylierung von $p16^{INK4a}$ in primären malignen Melanomen lag mit 9% im gleichen Bereich, wie in der Literatur beschrieben. So wurde in 10% der primären malignen Melanome eine Hypermethylierung nachgewiesen (Gonzalzo et al., 1997). Bei weiteren Untersuchungen an malignen Melanomen wurde in 15% der Fälle gezeigt, dass kein $p16^{INK4a}$ -Protein vorhanden ist. Dieses Fehlen wurde auf eine homozygote Deletion zurückgeführt (Fujimoto et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wiesen Metastasen eine wesentlich höhere homogene Hypermethylierung auf. In den eigenen Untersuchungen zeigen 33% der Proben eine homogene Promotor-Methylierung von $p16^{INK4a}$.

Die Anzahl der Primärtumore, die eine partielle Inaktivierung durch intratumoral heterogene Hypermethylierung von $p16^{INK4a}$ aufweisen, ist mit 54% der Fälle jedoch wesentlich höher als die Anzahl der homogen hypermethylierten Primärtumore. In Metastasen zeigen 44% der Proben eine intratumorale inhomogene Hypermethylierung der Promotorregion. In 36% der Primärtumore sowie in 22% der Metastasen wurde keine Hypermethylierung der Promotorregion von $p16^{INK4a}$ gefunden.

Die Inaktivierung von $p16^{INK4a}$ könnte, wie auch die Inaktivierung von *RASSF1A*, ein kritisches Ereignis bei der Entstehung von malignen Melanomen darstellen. Der hohe Anteil der intratumoral heterogen methylierten Primärtumore deutet darauf hin, dass eine Inaktivierung von $p16^{INK4a}$ sich fördernd auf ein permanentes Tumorwachstum auswirken könnte, da die Cyclin D-abhängigen Kinasen nicht mehr durch $p16^{INK4a}$ -Protein inhibiert werden können. Durch den hohen intratumoral homogenen sowie inhomogenen Methylierungsanteil bei Metastasen wird ebenfalls deutlich, dass eine $p16^{INK4a}$ -Inaktivierung für Tumorzellen einen Wachstumsvorteil darstellt.

4.1.2 Inaktivierung von *Rb*, *DAPK* und *MGMT* durch Promotor-Methylierung

Keines dieser drei Tumorsuppressorgene zeigte in den eigenen Untersuchungen eine intratumoral homogene Promotor-Methylierung. Dieser Befund war sowohl für primäre maligne Melanomen als auch Metastasen gleich.

Das *Rb*-Gen zeigt jedoch bei 20% der primären Tumoren eine intratumoral inhomogene Methylierung, während 57% der Metastasen eine solche inhomogene Methylierung aufweisen. Für das *Rb*-Gen liegen noch keine Untersuchungen hinsichtlich der Hypermethylierung der Promotorregion in malignen Melanomen vor.

Für das Tumorsuppressorgen *DAPK* wurde bisher keine Promotor-Methylierung in primären malignen Melanomen nachgewiesen, während 19% der Metastasen eine Hypermethylierung zeigten (Hoon et al., 2004). Bei *MGMT* wurde eine Promotor-Methylierung in 10% der primären malignen Melanome gezeigt (Hoon et al., 2004).

Bei den Tumorsuppressorgen *Rb*, *DAPK* und *MGMT* lag jedoch sowohl eine intratumoral inhomogene Hypermethylierung in primären Tumoren als auch in Metastasen der jeweiligen Promotoren vor. Die intratumoral inhomogene Promotor-Methylierung von *DAPK* ist in primären Tumoren (30%) sowie in Metastasen (25%) etwa gleich stark ausgeprägt. Bei *MGMT* verhält sich dies mit einer intratumoral inhomogenen Promotor-Methylierung bei primären Tumoren (10%) und Metastasen (14%) ebenso.

Die Inaktivierung dieser drei Gene scheint bei der Tumorentstehung bzw. der frühen Tumorentwicklung eine untergeordnete Rolle zu spielen. Vielmehr ist eine Inaktivierung dieser Gene während der Tumorgenese maligner Melanome von Bedeutung, da sie immer intratumoral inhomogen auftritt. Durch die intratumoral inhomogene Inaktivierung von *Rb* scheint ein Wachstumsvorteil für Tumorzellen vorzuliegen, da sie sich bei Metastasen im Vergleich zu Primärtumoren verdoppelt.

4.1.3 Epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A*, *p16^{INK4a}*, *DAPK*, *MGMT* und *Rb* als Biomarker zur frühen Tumordiagnose in malignen Melanomen

Eine erfolgreiche Krebstherapie setzt eine Diagnose im frühen Stadium eines Tumors voraus. Um eine frühe Diagnose durchführen zu können, ist es nötig, neue Biomarker zu charakterisieren und Methoden zu etablieren, die eine nicht invasive und sensitive Detektion dieser Biomarker in Körperflüssigkeiten ermöglichen. Die methylierungsspezifische PCR (MSP) wurde in einigen Studien für eine solche Diagnostik verwendet. So wurde aus dem Serum von Krebspatienten DNA gewonnen, die auf eine abweichende Promotor-Methylierung des *p16^{INK4a}*-Gens untersucht wurde (Wong et al., 1999). Diese Methode wurde sowohl an Lungenkrebspatienten als auch an Patienten, die Tumore im Bereich des Halses oder Kopfes aufwiesen, für die Promotor-

Methylierungen der Gene *p16^{INK4a}*, *DAPK* und *MGMT* angewendet (Esteller et al., 1999; Sanchez-Cespedes et al., 2000). Weiterhin fand man abweichende Methylierungsmuster des *p16^{INK4a}*-Promotors und anderer tumorassoziierter Gene im Sputum von Lungenkrebspatienten (Ahrendt et al., 1999; Belinsky et al., 1998), im Urin von Patienten mit Prostatakarzinomen (Cairns et al., 2001), sowie bei Patienten mit Blasenkarzinomen (Dulaimi et al., 2004). Die prätherapeutische Untersuchung von Promotor-Methylierung bei *RASSF1A* zeigte bei Brustkrebspatientinnen einen Zusammenhang zwischen der detektierten Methylierung im Serum und einer schlechten Prognose (Muller et al., 2003).

Neben der Detektion von Promotor-Methylierungen putativ tumorassoziierter Gene in Körperflüssigkeiten, die als Biomarker dienen könnten, ist zunächst eine Überprüfung der Methylierungsbefunde in primären Tumoren und Metastasen nötig. Für die hier untersuchten Gene ist vorerst entscheidend, dass diese in Normalgewebe keine Promotor-Methylierung aufweisen, sowie es auch für die hier untersuchten Gene zutrifft. Sowohl bei *RASSF1A* als auch bei *p16^{INK4a}* findet man in primären malignen Melanomen sowie in Metastasen intratumoral homogen methylierte Promotoren dieser Gene. In den Promotoren von *Rb*, *DAPK* und *MGMT* ist diese intratumorale homogene Methylierung weder in primären malignen Melanomen noch in Metastasen zu sehen. Für eine frühe Diagnostik scheinen sich daher nur *RASSF1A* und *p16^{INK4a}* zu eignen, denn bei diesen beiden Genen kommt es nicht nur auf die intratumorale Position der untersuchten Probe an. *Rb*, *DAPK* und *MGMT* weisen zwar ebenfalls eine Promotor-Methylierung auf, diese scheint aber abhängig von der intratumoralen Position im malignen Melanom zu sein und tritt hier in keinem Fall homogen in allen Melanomschnitten auf.

Aufgrund der Häufigkeit und Heterogenität der Methylierungsereignisse innerhalb der Promotoren für die hier untersuchten Gene, eignet sich keines als aussagekräftiger prognostischer Marker zur Diagnose von malignen Melanomen in primären Tumoren oder Metastasen. Eine Diagnostik im Serum könnte aber durchaus andere Ergebnisse zeigen, da *RASSF1A* bei Brustkrebs als prognostischer Serummarker ein aussagekräftiges Ergebnis liefert (Muller et al., 2003). Dies könnte an veränderten Eigenschaften der Zellen liegen, bei denen *RASSF1A* inaktiviert ist.

4.2 Expression von RASSF1A

4.2.1 Monoklonale Mausantikörper gegen RASSF1A

Um die Expression von RASSF1A *in vivo* darzustellen, wurden und werden verschiedene RASSF1A-Fusionsproteine verwendet (Liu et al., 2003; Shivakumar et al., 2002). Eine *in vivo*-Darstellung von RASSF1A ohne Fusionsprotein ist durch den

inzwischen kommerziell verfügbaren Antikörper eB114 gegen RASSF1A von eBioscience möglich (Dallol et al., 2004). In anderen Arbeiten wurden generierte Antikörper gegen RASSF1A verwendet (Rong et al., 2004; Song et al., 2004).

Die hier generierten Maus-Antikörper gegen RASSF1A und gegen RASSF1C wurden durch MBP-Fusionsproteine hergestellt und durch N-terminale Peptidsequenzen von RASSF1A und RASSF1C selektiert.

Der so hergestellte monoklonale Antikörper 2A10 gegen RASSF1A bindet ebenso wie der kommerzielle Antikörper eB114 sowohl an MBP-RASSF1A als auch an GST-RASSF1A. Die Bindungsqualität ist jedoch unterschiedlich. Während eB114 beide Fusionsproteine gut sichtbar auf einem Westernblot darstellt, zeigt 2A10 beim GST-Fusionsprotein ein schwächeres Signal. Der Unterschied dieser Fusionsproteine könnte darauf beruhen, dass MBP-RASSF1A rekombinant aus *E.coli* gewonnen und GST-RASSF1A aus der humanen Zelllinie HEK293 aufgereinigt wurde. Durch Immunhistochemie angefärbte Paraffinschnitte weisen ebenfalls unterschiedlich starke Färbungen auf. Der Antikörper eB114 zeigt ein stärkeres Signal, als der Antikörper 2A10. Für weitere immunhistochemische Untersuchungen wurde aufgrund des deutlicheren Signals der kommerziell verfügbare Antikörper von eBioscience verwendet. Beide Antikörper zeigen in Normalgewebe der Haut eine Färbung der gleichen Strukturen, was die Expression von *RASSF1A* belegt. Auch hier ist die Färbung mit dem Antikörper 2A10 schwächer, als mit dem Antikörper eB114.

Beide Antikörper zeigen eine starke RASSF1A-Expression in Endothelzellen. Endothelzellen zeigen eine geringe Proliferation und hohe genetische Stabilität (Baluk et al., 2005). Die starke Expression von RASSF1A als Tumorsuppressorgen mit mitotischem Einfluss könnte somit eine Ursache für die geringe Teilung der Endothelzellen darstellen.

Gegen RASSF1C wurden unter anderem die monoklonalen Antikörper 6A9 und 2C3 hergestellt, wovon 2C3 eine spezifische Reaktion gegen MBP-RASSF1C zeigte. In Paraffinschnitten war kein RASSF1C nachzuweisen.

4.2.2 RASSF1A-Expression in malignen Melanomen und Zelllinien in Abhängigkeit der Promotor-Methylierung

Ein Untersuchungsschwerpunkt der vorliegenden Arbeit war der Zusammenhang von intratumoraler Promotor-Methylierung und der intratumoralen RASSF1A-Proteinexpression in malignen Melanomen.

Sowohl primäre maligne Melanome als auch Metastasen zeigten in intratumoralen immunhistologischen Untersuchungen eine geringe Anzahl von RASSF1A exprimierenden Zellen, wenn eine homogene Promotor-Methylierung vorlag. Eine heterogene intratumorale Hypermethylierung des *RASSF1A*-Promotors wich nur in

einer geringen Anzahl von *RASSF1A* exprimierenden Zellen ab. Eine Unterscheidung zwischen intratumoral heterogen und homogen methyliertem *RASSF1A*-Promotor mittels immunhistochemische Analysen ist, wie diese Ergebnisse zeigen, kaum möglich, da in beiden Fällen eine schwache Färbung beobachtet werden kann.

Bisherige Expressionsdaten von *RASSF1A* konzentrieren sich auf die mRNA in Zelllinien oder in verschiedenen Tumoren. So wurde in malignen Melanomen gezeigt, dass eine niedrigere Transkriptionsrate der *RASSF1A*-mRNA mit der Promotor-Methylierung korreliert (Reifenberger et al., 2004; Spugnardi et al., 2003). Immunhistochemische Daten an malignen Melanomen sind bisher noch nicht bekannt.

In den eigenen Versuchen wiesen primäre Tumore maligner Melanome sowie deren Metastasen bei homogen unmethyliertem *RASSF1A*-Promotor eine etwa dreimal höhere Anzahl an *RASSF1A* positiven Zellen auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es möglich wäre, maligne Melanome und Metastasen immunhistochemisch auf die Expression von *RASSF1A* zu untersuchen. Als weiterer Schritt könnte in umfassenderen Studien überprüft werden, ob *RASSF1A* als ein weiterer Marker zur Diagnose von malignen Melanomen dienen könnte. Möglich wäre dies durch den Befund, dass in normaler Haut *RASSF1A* in Melanozyten expremiert wird.

Die Detektion von *RASSF1A* wurde auch bei Zelllinien überprüft, deren Methylierungsstatus am *RASSF1A*-Promotor bekannt war. So wurden als Zellen, die keine Methylierung am *RASSF1A*-Promotor zeigten, humane Fibroblasten (HF53), HeLa-S3 (Zervixkarzinom), humane embryonale Nierenzellen (HEK253) sowie Zellen aus zwei Lymphknotenmetastasen maligner Melanome (IGR1, SK-MEL-13) verwendet (Dammann et al., 2000; Schagdarsurengin et al., 2002; Schagdarsurengin et al., 2003; Yu et al., 2003).

Der Antikörper eB114 zeigt als einziger Antikörper bei diesen Zelllinien spezifische Banden. Diese zeigen jedoch ein Größe von 52 kD und sind damit etwa 14 kD größer, als die berechnete Größe von *RASSF1A*.

Als Zellen, die aufgrund einer *RASSF1A* Promotor-Methylierung keine *RASSF1A*-Proteinexpression zeigen sollten, wurden die Zelllinien A549 (Adenolungenkarzinom), FTC133 (follikuläres Schilddrüsenkarzinom), HepG2 (humanes Leberzellkarzinom) und C8162 (Lymphknotenmetastase eines malignen Melanoms) untersucht (Dammann et al., 2000; Schagdarsurengin et al., 2002; Schagdarsurengin et al., 2003).

Die Zelllinie HepG2 ist die einzige unter diesen Zelllinien, welche keine *RASSF1A*-Bande durch den Antikörper eB114 aufweist. Bei FTC133 und C8162 ist jeweils die gleiche Bande im Westernblot zu sehen wie bei den Zelllinien, die keine *RASSF1A*-Promotor-Methylierung aufweisen.

Zudem ist bei A549 eine schwache Bande zu sehen. Dies deutet auf eine geringe Expression bei nicht vollständiger Promotor-Methylierung hin. Bei den Zelllinien

FTC133 und C8162 sollten jedoch eine sehr schwache oder keine RASSF1A Proteinexpression zu sehen sein, da diese Zelllinien eine Promotor-Methylierung aufweisen.

Eine Möglichkeit wäre die Reaktion von eB114 mit einem zu RASSF1A homologen Protein. Das Maus-*Nore1*-Gen, dessen humanes Ortholog *RASSF5* auf dem Chromosom 1q32.1 lokalisiert ist kodiert, für ein 418 Aminosäuren langes Protein mit einer Größe von etwa 47 kD (Tommasi et al., 2002; Yao et al., 2001). Das Gen *RASSF3* auf Chromosom 12q14.2 zeigt wie *RASSF5* eine 60%-ige Homologie zu *RASSF1A* und kodiert für ein 28,6 kD großes Protein. Beide Proteine weisen in ihrer Struktur eine RA-Domäne auf und kommen somit als RAS Effektoren in Frage. Weder *RASSF5* noch *RASSF3* sind in primären Tumoren durch Promotor-Methylierung inaktiviert (Tommasi et al., 2002). Es ist demnach möglich, dass der Antikörper eB114, je nach Peptid mit welchem er selektiert wurde, auch an *RASSF5* bindet. Dies könnte sowohl die größere Bande erklären, als auch die Tatsache, dass trotz Promotor-Methylierung eine Bande zu sehen ist. Die weiteren RASSF1 Homologen *RASSF2* und *RASSF4* auf den Chromosomen 20p12.1 und 10q11.21 sind beide kleiner als *RASSF1* und könnten bei einer Reaktion mit eB114 den Größenunterschied nicht erklären (Chow et al., 2004; Comincini et al., 2001; Vos et al., 2003a).

Sollte die Bande bei 52 kD *RASSF1A* sein, so könnte dies auf eine Proteinmodifikation von *RASSF1A* hindeuten. Mögliche Veränderungen könnten eine Glykosylierung oder Prenylierung sein. Beide Sequenzmotive für diese Modifizierungen sind in der Primärstruktur von *RASSF1A* vorhanden und könnten weitere Ziele von Untersuchungen an diesem Protein sein.

Die Zelllinie eines kleinzelligen Lungenkarzinoms (H740), bei dem eine Deletion der chromosomalen Region 3p21.3 auftritt, wurde als Negativkontrolle verwendet. Hier ist, wie zu erwarten, keine Bande zu sehen. Sollten in dieser Zelllinie das *RASSF1* Homologe *RASSF5* expremiert werden, sollte eine Bande zu sehen sein, wenn eB114 auch an *RASSF5* bindet. Es ist aber auch möglich, dass *RASSF5* nicht in der Zelle vorliegt. Um dies genauer zu untersuchen sind weitere Versuche nötig.

4.3 Funktion von RASSF1A

Die Funktion von *RASSF1A* ist weitgehend ungeklärt. Verschiedene Experimente zeigen jedoch, dass *RASSF1A* in unterschiedliche Signalwege in der Zelle eingebunden ist. So ist ein Einfluss auf den Zellzyklus zu beobachten, bei dem Zellen durch *RASSF1A* in der Zellzyklusphase G0/G1 oder aber in der G2-Phase an einer weiteren Proliferation gehindert werden. Die Funktion von *RASSF1A* wirkt sich auch auf apoptotische Signalwege aus.

4.3.1 Einfluss von RASSF1A auf den Zellzyklus und die Apoptose

Cyclin D1 gehört zu einer Klasse von Enzymen, die für das Voranschreiten des Zellzyklus von der G1-Phase in die S-Phase verantwortlich ist. Dieses Signal wird durch eine Interaktion von Cyclin D1 mit Kinasen vermittelt, welche eine Hyperphosphorylierung des Retinoblastom (Rb)-Proteins zur Folge hat. Diese Kinasen sind Cyclin-abhängige-Kinasen (CDK). Cyclin D1 interagiert mit CDK4- und CDK6-Kinasen. Die Hyperphosphorylierung des Rb-Proteins führt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F und leitet den Übergang der Zelle in die S-Phase ein (Fu et al., 2004). RASSF1A ist, wie in Abbildung 4.1 dargestellt, in der Lage, die Akkumulation von Cyclin D1 posttranskriptionell zu inhibieren und somit die Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus zu halten (Shivakumar et al., 2002).

Mit dem Transkriptionsfaktor $p120^{E4F}$ kann RASSF1A interagieren und ebenfalls den Zellzyklus in der G1-Phase anhalten (Fenton et al., 2004). Der Transkriptionsfaktor $p120^{E4F}$ bindet an die Promotorregion des Cyclins A2, welches die Zellen sowohl von der G1-Phase in die S-Phase, als auch von der G2-Phase in die M-Phase überleiten kann. Die Interaktion mit RASSF1A beeinflusst die Bindungsstärke von $p120^{E4F}$ auf den Promotor von Cyclin A2. Eine Interaktion erhöht die Bindungsstärke und inhibiert somit die Transkription von Cyclin A2 (Ahmed-Choudhury et al., 2005; Fenton et al., 2004; Wolgemuth et al., 2004).

Zellzyklus-Inhibierung

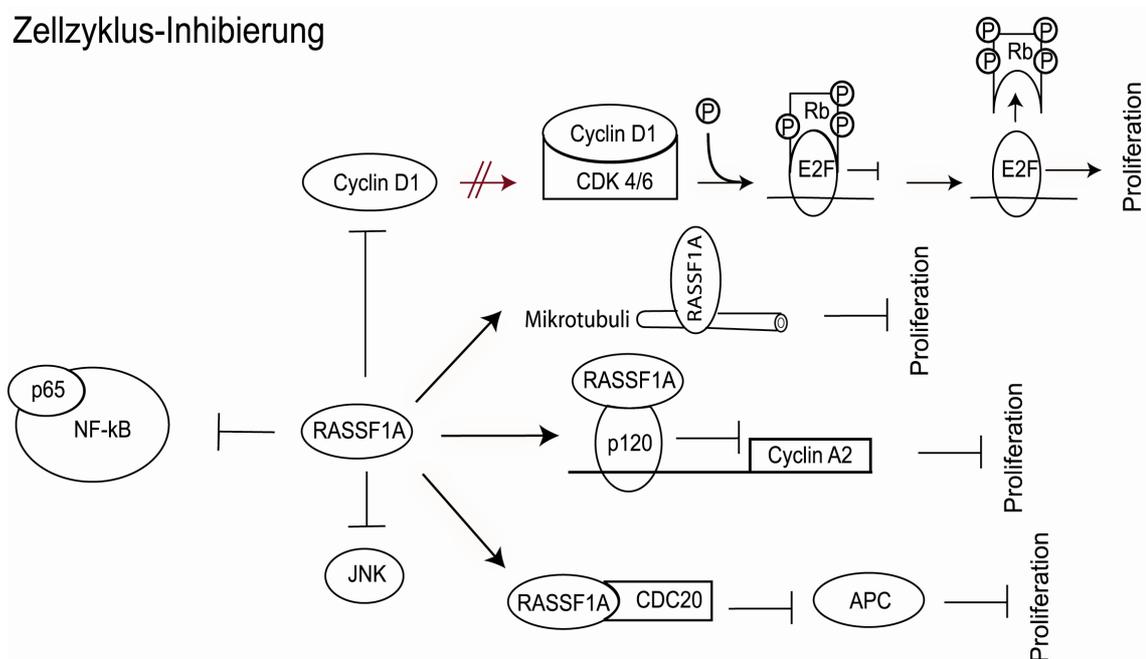


Abbildung 4.1: Der Einfluss von RASSF1A auf den Zellzyklus: RASSF1A interagiert mit unterschiedlichen Faktoren wie z. B. dem Transkriptionsfaktor p120 oder auch mit dem APC-Aktivator CDC20 und ist so in der Lage, den Zellzyklus anzuhalten. RASSF1A bewirkt dies auch durch die negative Regulation von Cyclin D1, p65 und JNK.

Neben dem Zellzyklus ist RASSF1A auch in die Regulation der Mitose eingebunden. Durch die Interaktion mit CDC20 kann die Mitose in der Prometaphase von RASSF1A angehalten werden. CDC20 ist ein Interaktionspartner des APC (anaphase-promoting complex), der durch diese Interaktion die Anaphase während der Mitose einleitet. Das Fehlen von RASSF1A bewirkt den früheren Abbau von mitotischem Cyclin und eine durch den aktiven APC früher einsetzende Mitose. Es verursacht auch Zellteilungsdefekte, die durch multipolare Spindeln gekennzeichnet sind (Song et al., 2004).

Der nukleare Faktor κ B (NF- κ B) wirkt sich auf inflammatorische, apoptotische und proliferative Prozesse in Zellen aus. NF- κ B kann von dem Rezeptor Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) aktiviert werden. A549 Zellen, die keine Expression von RASSF1A zeigen, weisen mit stabil transfiziertem RASSF1A eine geringere Expression von p65, einer Untereinheit von NF- κ B, auf. Auch hier könnte RASSF1A über die Expression von p65 regulierend auf den Zellzyklus einwirken (Deng et al., 2005).

Die Aktivierung des Onkogens RAS sowie die Aktivität der c-Jun-NH₂-Kinase (JNK) ist in der Lungenkrebszelllinie H1299 eine Voraussetzung für die maligne Transformation der Zellen. Die Aktivität von JNK wirkt sich auf den Aktivierungs-Proteinkomplex 1 (AP1) aus. JNK phosphoryliert c-Jun an Serin 63 und Serin 73, einer Untereinheit von AP1 und aktiviert somit diesen DNA-gebundenen Transkriptionsfaktor. Die Aktivierung von AP1 kann sowohl Apoptose als auch Proliferation von Zellen auslösen (Davis, 2000; Hess et al., 2004; Liu and Lin, 2005). RASSF1A ist in der Lage, die Aktivität der c-Jun-NH₂-Kinase in H1299 Zellen, in denen sie proliferativ wirkt, zu hemmen und auf diese Weise die Zellproliferation zu unterbinden (Whang et al., 2005).

All diese bekannten Auswirkungen von RASSF1A auf den Zellzyklus weisen eine hemmende Wirkung hinsichtlich der Proliferation von Zellen auf. Neben der Beteiligung an Prozessen, die eine Proliferation der Zellen hemmen, beeinflusst RASSF1A auch apoptotische Prozesse, wie in Abbildung 4.2 dargestellt ist.

So wurde gezeigt, dass RASSF1A an Mikrotubuli gebunden ist und dort mit dem Mikrotubuli assoziierten Protein1 (MAP1) sowie dessen Homolog C19ORF5 binden kann (Baksh et al., 2005; Liu et al., 2003; Liu et al., 2005b). Diese Interaktion erfolgt nach einer Stimulation mit TNF- α durch die sowohl RASSF1A als auch MAP1 an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) binden. Diese Kolo-kalisation ermöglicht die Bindung von MAP1 an RASSF1A. MAP1, welches vor dieser Komplexbildung durch eine intramolekulare Interaktion inaktiviert war, kann nun an BAX, ein Mitglied der Bcl-2 Protein-Familie binden. BAX ändert in diesem Komplex seine Konformation und kann nun in die mitochondriale Membran integriert werden. Aus den Mitochondrien wird nun Cytochrom c freigesetzt und die Apoptose ausgelöst. Dieser Vorgang wird auch als

mitochondrial aggregation and genome destruction (MAGD) bezeichnet (Baksh et al., 2005; Liu et al., 2005b).

Apoptose

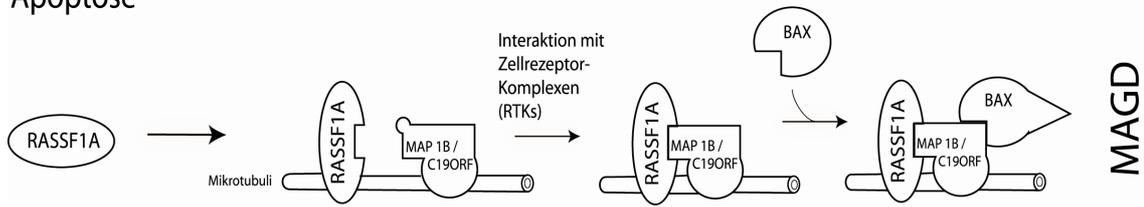


Abbildung 4.2: Beteiligung von RASSF1A an einem Apoptose vermittelnden Prozess, der durch die Stimulation mit TNF- α ausgelöst werden kann.

Die Proteine *mammalian Sterile20-like1* (MST1) und MST2 sind eng verwandt mit der Klasse II der GC (protein Ser/Thr)-Kinasen und induzieren, wenn sie in Zellen überexprimiert werden, Apoptose. Diese Kinasen zeigen eine Eigenaktivierung durch eine intramolekulare Autophosphorylierung. Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, sind sowohl RASSF1A als auch RASSF1C in der Lage, an MST1/2-Proteine zu binden und deren Autophosphorylierung zu unterbinden (Praskova et al., 2004). MST1 und MST2 können beide an den *connector enhancer of KSR1* (CNK1) binden und so dessen proapoptotische Wirkung aufheben. RASSF1A als konstitutiver Bindungspartner von MST1 kann ebenso an CNK1 binden, ist aber nicht in der Lage, dessen apoptotische Wirkung aufzuheben. Dies legt nahe, dass RASSF1A nur durch die Interaktion mit MST1 die Apoptose durch CNK1 inhibieren kann (Rabizadeh et al., 2004).

Apoptose-Inhibierung

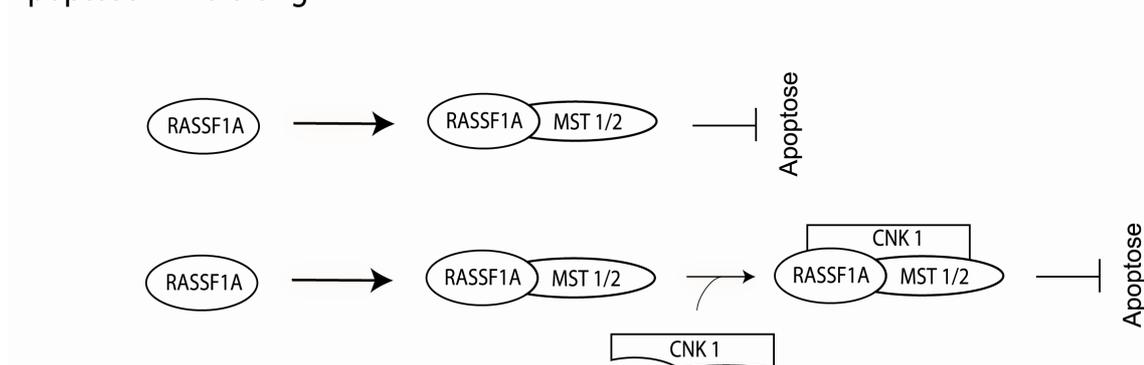


Abbildung 4.3: RASSF1A kann durch die Interaktion mit MST1 dessen Autophosphorylierung unterbinden und auf diese Weise sowie durch die Interaktion mit MST1 und CNK1 die apoptotische Wirkung von MST1 unterdrücken.

4.3.2 Phosphorylierung von RASSF1A und RAS-Effektoren

Für RASSF1A sind verschiedene Modifizierungsstellen in Tabelle 3.9 dargestellt. Von diesen verschiedenen putativen Modifizierungen wurde bisher eine Phosphorylierung am Serin in Position 131 postuliert. Entdeckt wurde diese Mutation als einer von zwei Polymorphismen in Tumorzelllinien, die RASSF1A exprimieren. Der zweite Polymorphismus ist das Alanin in Position 133, das durch ein Serin ersetzt wird. Bei beiden Polymorphismen weist RASSF1A eine reduzierte Phosphorylierung und eine geringere antiproliferative Wirkung auf, als der Wildtyp. Dieses Serin 133 liegt in der putativen Phosphorylierungsstelle der ATM-Kinase, einer Serin/Threonin-Kinase (Kim et al., 1999; Shivakumar et al., 2002). Sowohl der Zeitpunkt als auch die Funktion dieser putativen Phosphorylierung sind weitgehend ungeklärt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und der postulierten Phosphorylierungsstelle in der Abbildung 3.10 wurden die in 3.4 beschriebenen Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Phosphorylierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei RASSF1A das Serin in Position 203 phosphoryliert wird und die Deletion der ATM-Domäne keine Auswirkungen auf die Phosphorylierung hat. Der N-Terminus von RASSF1A (Aminosäuren 1-119) wird ebenfalls nicht phosphoryliert. Die Position der Phosphorylierung befindet sich am Anfang der RA-Domäne von RASSF1A. Eine Phosphorylierung in dieser Domäne bei anderen RAS-Effektoren wie NORE1 (RASSF5), RASSF2 oder Phospholipase C Epsilon (PLC ϵ) ist bisher nicht bekannt.

Eine der bis jetzt am besten charakterisierten RAS-Effektor-Familien ist die in Abbildung 4.4 dargestellte RAF-Kinase-Proteinfamilie. RAF-Kinasen gehören zu der Familie der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) und sind in Mammalia in drei verschiedenen Genvarianten, *A-RAF*, *B-RAF* und *C-RAF* (oder *RAF-1*) vertreten. RAF-Kinasen fungieren als direkte Effektoren von RAS, in dem sie an aktives RAS-GTP binden und anschließend durch Phosphorylierung den MAPK/extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK)-Signalweg aktivieren, welcher zu einer Zellproliferation führt.

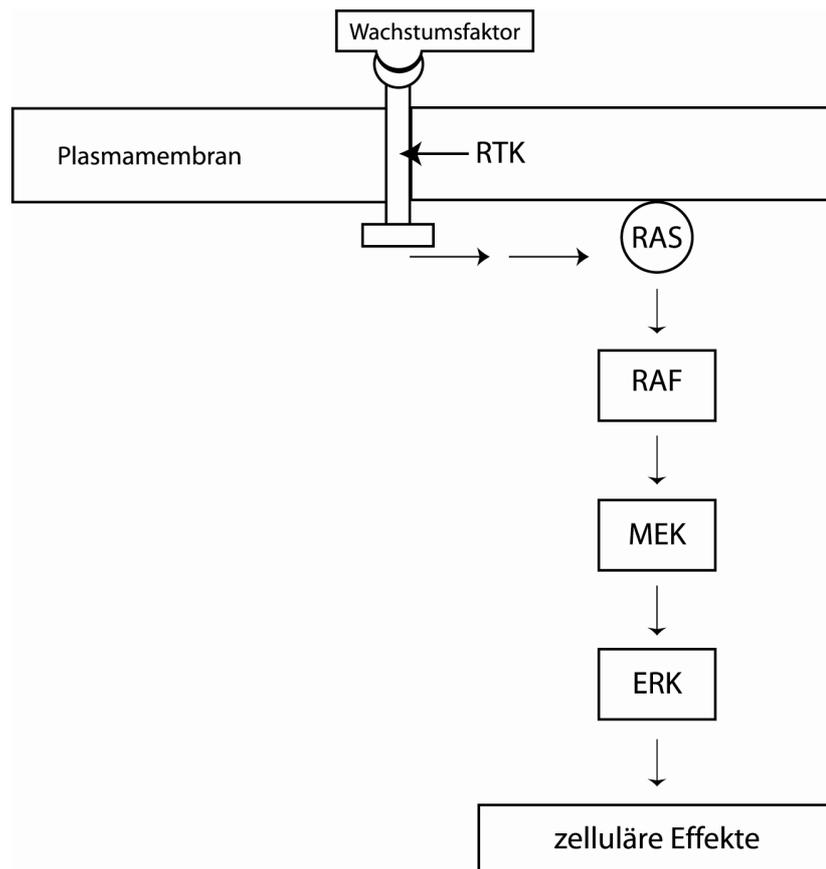


Abbildung 4.4: Der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg wird durch Wachstumsfaktoren, die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen binden, aktiviert. Dies führt zur Aktivierung von RAS, welches seinerseits durch die RAF-Aktivierung eine Phosphorylierungskaskade von MEK und ERK aktiviert. ERK reguliert durch die Phosphorylierung vieler Ziele unterschiedliches Zellverhalten, wie z. B. Zellproliferation oder Apoptose.

Die Unterschiede zu RASSF1A bestehen in der RAS-Bindestelle von RAF-Kinasen und in ihrer Kinaseaktivität, wie sie in Abbildung 4.5 dargestellt ist. RAF-Kinasen binden durch die RAS-Bindedomäne (RBD) und die cysteinreiche Domäne (CRD) an RAS, wofür bei RASSF1A die RA-Domäne in Frage kommt. Die Kinaseaktivität kann RAF-1 nur durch verschiedene Phosphorylierungsstufen entfalten. Die Phosphorylierung von Serin 259 und Serin 621 ermöglichen dem Protein 14-3-3 an RAF-1 zu binden und es in einem inaktiveren Stadium zu halten. Aktiviertes RAS-GTP kann RAF-1 an der Plasmamembran binden und das daran koordinierte Protein 14-3-3 vom Serin 259 der RAF-1 Kinase verdrängen. Durch die einhergehende Konformationsänderung in eine offene Form von RAF-1 kann nun die Protein-Phosphatase 2 A (PP2A) das Serin 259 dephosphorylieren. Durch diese Dephosphorylierung bleibt RAF-1 in der offenen aktivierbaren Konformation. Die Aktivierung erfolgt durch die Phosphorylierung des Serins 338 und des Tyrosins 341. Aktiviertes RAF-1 kann nun MEK1 an Serin 218 und 222 phosphorylieren und somit das von aktivem RAS-GTP übertragene Signal an ERK weitergeben. Die Aktivierung

von B-RAF verläuft prinzipiell auch RAS-vermittelt durch Dephosphorylierung und anschließende Phosphorylierung. Im Gegensatz zu RAF-1 lässt sich B-RAF *in vitro* durch RAS aktivieren, ohne dass eine Membranlokalisation nötig ist (Dhillon et al., 2002; Mercer and Pritchard, 2003).

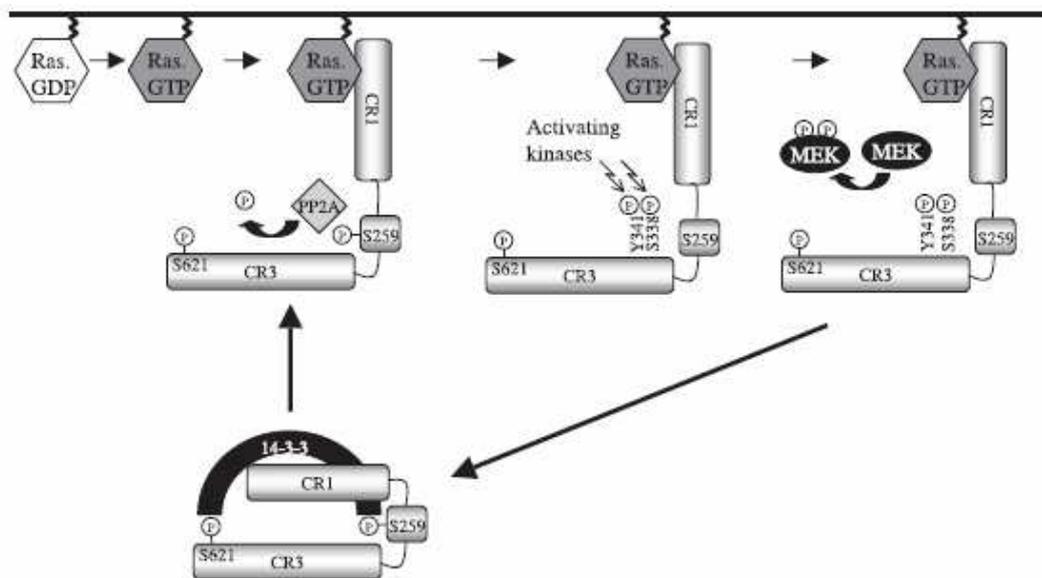


Abbildung 4.5: Modell zur Aktivierung von RAF-1. In unstimulierten Zellen bindet das Protein 14-3-3 an phosphoryliertes Serin 259 und Serin 621 und stabilisiert so die inaktive Konformation von RAF-1. Durch rezeptorvermittelte Aktivierung von RAS bindet RAF-1 an RAS-GTP und ändert seine Konformation, in der das Protein 14-3-3 phosphoryliertes Serin 259 freigibt. Durch weitere Phosphorylierung an Serin 338 und Tyrosin 341 wird RAF-1 aktiviert und kann das rezeptorvermittelte Signal durch Phosphorylierung von MEK weiterleiten [Grafik aus (Mercer and Pritchard, 2003)].

Die Regulierung von RAF-1 erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen. Die von RAF-1 aktivierte ERK-Kinase kann über eine Feedbackregulation aktives RAF-1 in der offenen aktiven Konformation phosphorylieren und so inaktivieren (Dougherty et al., 2005).

Aktivierbares aber inaktives, geschlossenes RAF-1, an Serin 259 und 621 phosphoryliert und an 14-3-3 gebunden, kann durch Protein-Kinase A (PKA) an Serin 233 phosphoryliert werden. An dieses phosphorylierte Serin 233 bindet der Inhibitor 14-3-3 und löst die Bindung von phosphoryliertem Serin 621. Diese Bindungsänderung von 14-3-3 an inaktivem RAF-1 ist irreversibel und RAF-1 ist somit nicht mehr aktivierbar (Dumaz and Marais, 2005).

Die Aktivität der PKA wird durch cAMP stimuliert. Somit wirken höhere cAMP-Konzentrationen anitproliferativ auf Zellen, da das Serin 233 öfter in RAF-1 phosphoryliert wird. Auf B-RAF wirkt eine erhöhte cAMP-Konzentration allerdings stimulierend auf die Proliferation von Zellen (Dumaz and Marais, 2005). Diese Modelle von B-RAF und RAF-1 lassen keinen Schluss über die Wirkung der Phosphorylierung

von RASSF1A durch PKA zu. Die PKA-Aktivität zeigt hier gegensätzliche Auswirkungen auf den Zellzyklus. Diese durch RAS vermittelte Phosphorylierung von RAF-1 und B-RAF wird exogen durch Tyrosin-Kinase-Rezeptoren initiiert und wirkt sich anschließend auf die Zellzyklusaktivität aus, während die Phosphorylierung von RASSF1A abhängig vom Zellzyklus ist. Die stärkste Phosphorylierung von RASSF1A tritt in der G2/M-Phase auf.

Bisher konnte eine direkte Interaktion zwischen aktivem RAS-GTP und RASSF1A gezeigt werden (Vos et al., 2000), sowie eine GTP-abhängige Interaktion des „novel RAS effectors1“ (NORE1) mit RAS (Vavvas et al., 1998). RASSF1A ist in der Lage, mit NORE1 ein Heterodimer zu bilden und dann an RAS-GTP zu binden (Ortiz-Vega et al., 2002). Durch diese Lokalisation ist eine Phosphorylierung durch RAS-aktivierte Kinasen möglich.

RASSF1A wird wie auch RAF-1 durch PKA phosphoryliert. Es ist aber noch nicht geklärt, in welcher Weise sich diese Phosphorylierung auf die Funktion von RASSF1A auswirkt und ob es die einzige mögliche Phosphorylierung von RASSF1A darstellt. So ist ebenfalls eine Phosphorylierungsstelle durch die Protein-Kinase C (PKC) in Tabelle 3.9 dargestellt, die sich durchaus in der Nähe der Phosphorylierungsstelle der PKA befindet und somit räumlich in einer für die Phosphorylierung zugänglichen Region des Proteins liegt. PKC wird von membranständigem Diacylglycerol aktiviert, welches nach der rezeptorvermittelten Hydrolyse von Inositol-Phospholipiden entsteht. Die Aktivität von PKC induziert die Proliferation von Zellen und ist auch an der Metastasierung von malignen Melanomen beteiligt (Oka and Kikkawa, 2005). RASSF1A, welches an membranständiges aktiviertes RAS gebunden ist, könnte auch von PKC phosphoryliert werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine Phosphorylierung von RASSF1A durch Aurora-Kinase A, welche eine Kontrollfunktion während der Mitose ausübt (Bolanos-Garcia, 2005). Eine Überexpression von Aurora-Kinase A führt zu einer genetischen Instabilität in dem es wichtige mitotische Kontrollpunkte wie zum Beispiel CDC20-Interaktion mit BUB-R1 überbrückt (Bolanos-Garcia, 2005). RASSF1A, welches die Proliferation von Zellen in der G2/M-Phase anhalten kann, (Rong et al., 2004) trägt somit durch seine antiproliferative Wirkung zu einer korrekt ablaufenden Mitose bei. Durch Aurora-Kinase A, die während der Mitose wie RASSF1A auch an den Spindelpolen lokalisiert ist (Giet et al., 2005; Song et al., 2005), könnte RASSF1A ebenfalls durch Phosphorylierung inaktiviert werden. Diese Art der Phosphorylierung würde mit dem Zeitpunkt der stärksten Phosphorylierung in der G2/M-Phase übereinstimmen.

4.3.3 Phosphorylierung von RASSF1A als Teil der mitotischen Zellzykluskontrolle

Wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, wurde eine Interaktion von RASSF1A mit CDC20, dem Aktivator des AP-Komplexes, gezeigt. Dieser Komplex besitzt eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität und steuert die Proteolyse von Cyclin A, Securin und Cyclin B. Cyclin A reguliert den Zellzyklus in der S-Phase, während Cyclin B und andere mitotische Faktoren die Mitose kontrollieren (Jackson, 2004). Einer dieser mitotischen Faktoren ist Securin, das den zeitlichen Verlauf der Mitose durch das Blockieren der Chromosomentrennung bis zur Anaphase steuert (Nasmyth, 2002). Ein negativer Regulator des AP-Komplexes ist der *early mitotic inhibitor 1* (EMI1). Durch die Bindung der Aktivatoren des AP-Komplexes, CDC20 und CDH1, wird die Akkumulation von Cyclin A, Cyclin B und des Securins ermöglicht (Hsu et al., 2002; Reimann et al., 2001a). Nach dem Abbau von EMI1 beginnt in der Prometaphase die Aktivierung des AP-Komplexes durch die Interaktion mit CDC20 und Securin wird abgebaut. In der Anaphase wird CDC20 durch CDH1 ersetzt, der so aktivierte AP-Komplex leitet die Proteolyse von Cyclin B ein und steuert die Zellen in eine neue G0/G1-Phase.

Die Assoziation von RASSF1A an Mikrotubuli (Liu et al., 2003) sowie eine Interaktion mit verschiedenen mitotischen Strukturen weisen auf eine Beteiligung am Zellzyklus hin. Es wurde gezeigt, dass während der Interphase RASSF1A an den zytoplasmatischen Mikrotubulstrukturen bindet. Während der Prophase ist RASSF1A an den bereits geteilten Centromeren zu sehen. In der Meta- und Anaphase ist eine Lokalisation an den Spindelapparaten und Polen zu beobachten. In der Telophase sowie im Verlauf der Zytokinese kann RASSF1A im Mittelbereich zwischen den Chromosomen nachgewiesen werden (Song et al., 2004).

Eine Überexpression von RASSF1A führt zu einem Stillstand des Zellzyklus in der Prometaphase und verhindert den Abbau von Cyclin A und B. Hier könnte RASSF1A auf die gleiche Weise wie nicht abbaubares EMI1 wirken (Reimann et al., 2001b). In einer *in vitro*-Reaktion des AP-Komplexes mit CDC20 als Aktivator und Cyclin B als Substrat wurde gezeigt, dass RASSF1A eine Ubiquitynilierung von Cyclin B verhindern kann (Song et al., 2004). Die zeitliche Betrachtung der Inhibierung von APC durch die Assoziation von RASSF1A mit CDC20 ergab, dass RASSF1A erst nach der Inaktivierung von EMI1 den AP-Komplex inhibiert (Song et al., 2004). Diese Beobachtungen führten zu der These, dass RASSF1A nach dem Abbau von EMI1 in der Prophase und vor dem Spindelkontrollpunkt für die Inhibierung des AP-Komplexes verantwortlich ist. Das zellzyklusabhängige auftreten der genannten Proteine ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

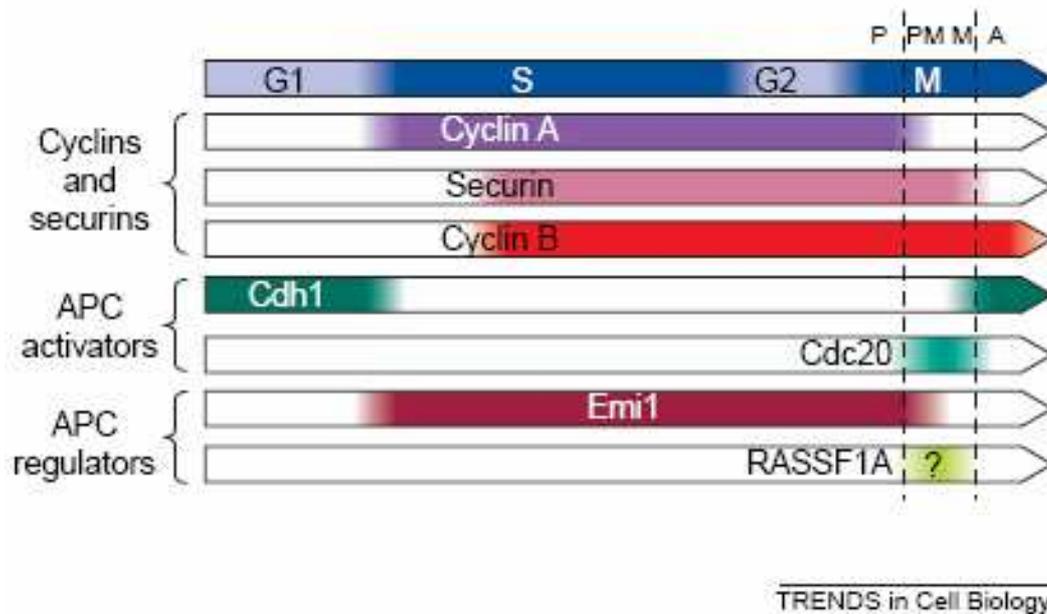


Abbildung 4.6: Kontrolle des AP-Komplexes (APC). In der G1-Phase wird die Anreicherung von mitotischem Cyclin durch den APC-CDH1-Komplex inhibiert. Der Übergang von der G1-Phase zur S-Phase ist durch die Aktivierung von EMI1 (*early mitotic inhibitor 1*) gekennzeichnet. Dieser wird über die Cyclin D- und E2F-Regulation transkribiert. Cyclin A wird durch die Aktivität von EMI1 angereichert und die Zellen treten in die S-Phase ein. Während der späten Prophase wird EMI1 durch die Aktivierung von APC-CDC20 abgebaut. RASSF1A könnte hier regulierend wirken, da Cyclin A durch eine Überexpression nicht mehr abgebaut wird. RASSF1A wirkt aber etwas später im Verlauf des Zellzyklus als EMI1. Der Übergang von der Metaphase zur Anaphase ist durch die Aktivierung des APC-CDH1 Komplexes gekennzeichnet, durch den der Abbau von Cyclin B gesteuert wird [Grafik aus (Jackson, 2004)]. P: Prophase; PM: Prometaphase; M: Metaphase; A: Anaphase

Der Einfluss von PKA auf die Mitose wurde in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) charakterisiert. Hier wurde gezeigt, dass in Abhängigkeit von der DNA-Schädigung und den damit verbundenen Regulationspunkten während der Mitose der Übergang von der Metaphase zur Anaphase durch die Kinasen CHK1 und RAD53 blockiert werden kann. Diese Kinasen stabilisieren durch Phosphorylierung Securin und inhibieren die Aktivierung des APC-CDH1-Komplexes, der die Zellen aus der Anaphase in eine neue G1-Phase leitet. Mutanten für CHK1 und RAD53 zeigten dennoch keinen stark erhöhten Übergang von der Mitose zur G1-Phase. Dieser Befund deutet auf einen weiteren Regulationsmechanismus hin (Jackson, 2004; Searle et al., 2004). Durch die Phosphorylierung von CDC20 mittels PKA wird die Aktivität dieses Komplexes inhibiert. In Hefen mit nicht phosphorylierbarem CDC20 ist der Abbau von Securin erhöht und die Zellen, die zusätzlich keinen Regulationsweg für eine DNA-Schädigung aufweisen (CHK1-Mutanten), treten früher in den Metaphase-Anaphase-Übergang ein. Mutiertes CDC20, das nicht mehr phosphoryliert werden kann, zeigt eine Interaktion mit CLB2, einem mitotischen Cyclin der Hefe, während Wildtyp CDC20 diese

Interaktion nicht aufweist. Diese Ergebnisse wiesen auf eine Regulation des APC-Komplexes durch PKA hin und sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

Die Phosphorylierung von Serin 203 bei RASSF1A kann in den Kontext dieses Modells eingeordnet werden, da hier sowohl die Phosphorylierung von RASSF1A als auch der Zeitpunkt der Phosphorylierung hinsichtlich des Zellzyklus berücksichtigt wird. Ebenso ist die phosphorylierende Kinase in diesem Modell einbezogen.

Demnach wird RASSF1A in Abhängigkeit des Zellzyklus am stärksten in der G2/M-Phase von der Protein-Kinase A phosphoryliert. Im Bezug auf das hier von Jackson beschriebene Modell hieße das, dass sowohl APC-CDC20 als auch RASSF1A durch PKA phosphoryliert werden könnte. Die Konsequenz der Phosphorylierung von APC-CDC20 durch PKA ist eine Inhibierung dieses Komplexes, wodurch sich Zellen länger in der Mitose aufhalten, da der Abbau von Securin langsamer verläuft. Ausgehend von der Tatsache, dass diese Phosphorylierung die Interaktion von APC-CDC20 mit Securin verhindert, könnte es sich bei einer Phosphorylierung von RASSF1A ebenfalls um die Inhibierung einer Interaktion handeln. RASSF1A, das den APC-CDC20-Komplex durch die Interaktion mit CDC20 inhibiert, könnte bei einer inhibierenden Phosphorylierung an dieser Interaktion gehindert werden. Somit würde der APC-CDC20-Komplex wieder aktiv und die Mitose könnte voranschreiten.

Die Aktivität der PKA ist nicht abhängig vom Zellzyklus, so dass die erhöhte Phosphorylierungsrate von RASSF1A während der G2/M-Phase auf einer anderen Regulierung beruhen muss. Die zusätzlichen Banden, die im Comassie-gefärbten Gel zu sehen sind, könnten regulatorische Interaktionen mit anderen Faktoren darstellen.

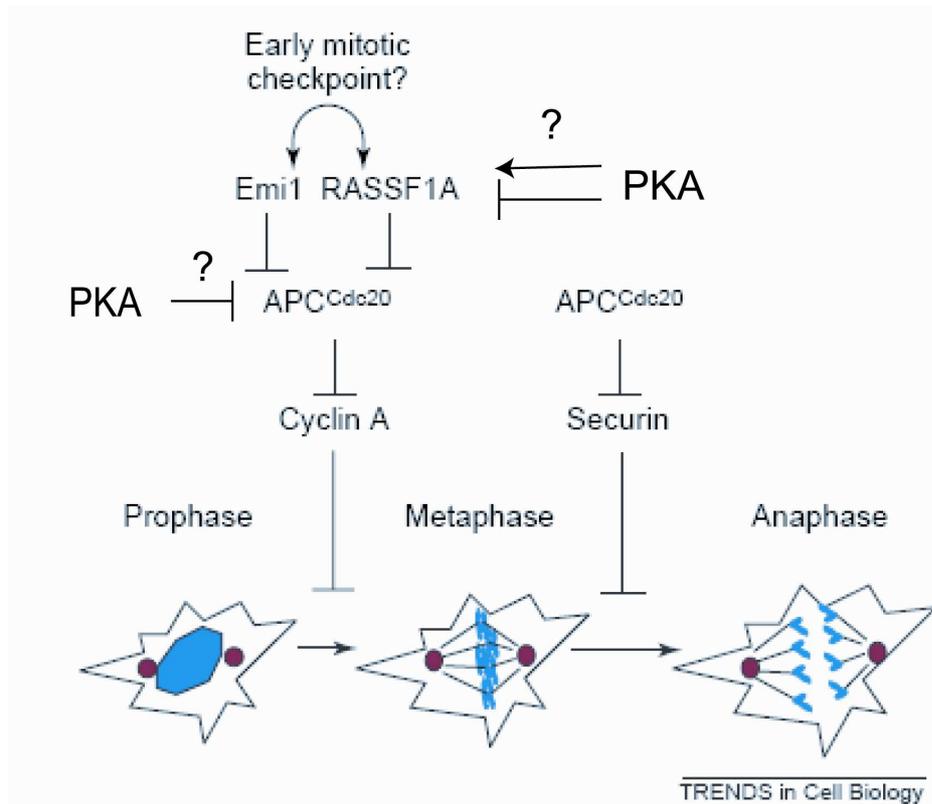


Abbildung 4.7: APC-CDC20 Komplex während der Mitose. Die Steuerung des Cyclin A-Abbaus durch APC-CDC20 findet nach dem Abbau von EMI1 statt und kann durch RASSF1A-CDC20-Interaktion inhibiert werden. Sowohl EMI1 als auch RASSF1A sind in der frühen Mitose an den Spindelpolen lokalisiert und könnten so die genaue Aktivität von APC koordinieren. PKA hat ebenfalls die Möglichkeit, den AP-Komplex zu inhibieren. Ein möglicher Einfluss von PKA auf RASSF1A und die Mitose: PKA phosphoryliert RASSF1A in Abhängigkeit des Zellzyklus in der G2/M-Phase. Eine Aktivierung von RASSF1A durch diese Phosphorylierung hätte in diesem Modell eine Zellzyklus-Inhibierung in der Prophase zur Folge. Eine Inhibierung durch eine Phosphorylierung würde den Zellzyklus in dieser Phase aktivieren [Grafik aus (Jackson, 2004) verändert].

Anhand von Abbildung 4.7 wäre eine Untersuchung von Interaktionspartnern von RASSF1A in phosphoryliertem und unphosphoryliertem Zustand interessant. Weitere Untersuchungen hinsichtlich des Funktionsunterschiedes dieser beiden RASSF1A-Formen sind notwendig, um zu zeigen, ob es sich bei der Phosphorylierung um eine Inhibierung der Interaktion zwischen RASSF1A und CDC20 handelt.

ATM-Kinase ist eine weitere Kinase, die in der Lage sein könnte, RASSF1A zu phosphorylieren (Shivakumar et al., 2002). Diese Kinase wird aktiviert, wenn in der Zelle DNA-Doppelstrangbrüche auftreten (McGowan and Russell, 2004). Solche Ereignisse können die Folge von ionisierender Strahlung sein (Röntgenstrahlung). Die ATM-Kinase kann durch die Phosphorylierung unterschiedlicher Faktoren, wie zum Beispiel p53 oder CHK1/2, den Zellzyklus während der G1-, S- oder G2/M-Phase anhalten, so dass die Integrität der DNA durch Reparaturmechanismen erhalten bleibt (Khanna and Chenevix-Trench, 2004). Eine Phosphorylierung von RASSF1A durch ATM-Kinase könnte so die Zellzyklus-inhibierende Wirkung von RASSF1A sowohl in

der G1- als auch in der G2/M-Phase bewirken. RASSF1A würde in diesem Fall in Abhängigkeit von DNA-Schädigungen tumorsuppressiv wirken.

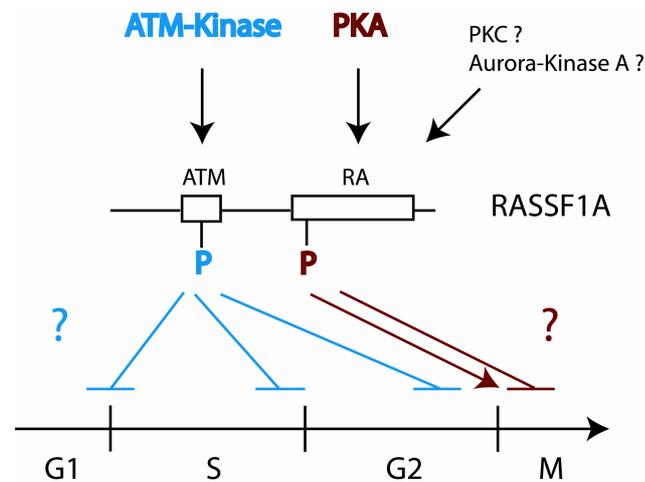


Abbildung 4.8: Die bisher identifizierten Phosphorylierungsstellen von RASSF1A werden von der ATM-Kinase und von PKA phosphoryliert. Die Auswirkungen dieser Phosphorylierungen konnte noch nicht aufgeklärt werden.

Wie in Abbildung 4.8 dargestellt ist, kann RASSF1A nach bisherigem Kenntnisstand an zwei Positionen phosphoryliert werden. Unklar ist bis jetzt noch die Auswirkung dieser Phosphorylierungen. Die ATM-Kinase ist in der Lage, den Zellzyklus in verschiedenen Stadien zu inhibieren und könnte dies durch die Phosphorylierung von RASSF1A erreichen.

Welche Auswirkungen eine Phosphorylierung von RASSF1A durch PKA hat, ist ebenfalls nicht geklärt. Nach dem Modell, das in Abbildung 4.7 dargestellt ist, kann die Phosphorylierung sowohl eine Inhibition als auch eine Aktivierung zur Folge haben.

Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass dies alle Kinasen sind, die RASSF1A phosphorylieren können. Wie in Kapitel 4.3.2 diskutiert, könnten aufgrund der Position und des Zeitpunktes der Phosphorylierung am Serin 203 sowohl die PKC als auch die Aurora-Kinase A für eine Phosphorylierung in Frage kommen.

5 Zusammenfassung

5.1 Promotor-Methylierung von Tumorsuppressorgenen in malignen Melanomen

In einem invasiven Hautkrebs, dem malignen Melanom, wurde die Methylierung in den Promotorregionen der Tumorsuppressorgene *Ras Association Domain Family 1 (RASSF1A)*, *Inhibitor der Protein-Kinase 4a (p16^{INK4a})*, *Death Associated Protein Kinase (DAPK)*, *O(6)-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT)* sowie *Retinoblastom (Rb)* untersucht. Die mehrfache Probennahme pro Tumor ermöglichte zusätzlich die Bestimmung eines intratumoralen Methylierungsmusters dieser Tumorsuppressorgene.

Eine homogene Methylierung sowohl von primären Tumoren als auch von Metastasen war nur in wenigen Proben von *RASSF1A* (Primärtumor: 13% und Metastase: 9%) und *p16^{INK4a}* (Primärtumor: 9% und Metastase: 33%) zu finden. Die anderen drei untersuchten Tumorsuppressorgene, *Rb*, *MGMT* und *DAPK* wiesen keine homogene Promotor-Methylierung auf.

Eine intratumorale inhomogene Methylierung der entsprechenden Promotoren war bei allen untersuchten Genen in unterschiedlicher Häufigkeit zu sehen. *RASSF1A* wies mit 6% der Primärtumore den geringsten inhomogenen Anteil auf, während *Rb* in Metastasen mit 57% inhomogener Promotor-Methylierung den größten Anteil aufwies.

Ungeachtet der intratumoralen Homogenität der Promotor-Methylierung weisen 64% der Primärtumore und 77% der Metastasen eine Methylierung des *p16^{INK4a}*-Promotors auf. *Rb* ist dem gleichen Signalweg wie *p16^{INK4a}* zuzuordnen und beeinflusst die Zellproliferation, die durch Cyclin D1 gesteuert wird. Während in primären Tumoren die Promotor-Methylierung mit 20% im Bereich der Gene *RASSF1A*, *MGMT* und *DAPK* liegt, ist die Promotor-Methylierung in Metastasen mit 57% deutlich höher. Diese stärkere Inaktivierung in Metastasen deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Tumorprogression und der Inaktivierung von *Rb* hin. Die verschiedenen Promotor-Methylierungen bei der Entstehung von malignen Melanomen könnten auf einen unterschiedlichen Einfluss des Tumorsuppressorgens zurückzuführen sein.

Die Promotor-Methylierung von *RASSF1A* liegt mit 20% bei Primärtumoren und 26% bei Metastasen im Bereich der Gene *MGMT* und *DAPK*. Aus den Ergebnissen der Methylierungsuntersuchungen lässt sich schlussfolgern:

1. die Promotor-Methylierung von Tumorsuppressorgenen ist ein häufiges Ereignis in der Tumorgenese von malignen Melanomen

2. die Promotor-Methylierung in primären Tumoren und Metastasen tritt intratumoral homogen und inhomogen auf
3. die Häufigkeit und die intratumorale Heterogenität der Promotor-Methylierung weisen auf die Bedeutung der Tumorsuppressorgene *RASSF1A*, *p16^{INK4a}*, *Rb* und *DAPK* bei der Entwicklung von malignen Melanomen hin.

5.2 Proteinexpression von RASSF1A in malignen Melanomen

Die Promotor-Methylierung des *RASSF1A*-Gens wurde durch Immunhistochemie mit verschiedenen Antikörpern gegen RASSF1A überprüft. Bei diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob sich die Methylierungsdaten von *RASSF1A* auch auf Proteinebene in entsprechenden Schnitten von malignen Melanomen abbilden lassen und welche Antikörper hierfür geeignet sind.

Der kommerziell verfügbare Antikörper eB114 gegen RASSF1A von eBioscience zeigt an Paraffinschnitten die deutlichste Färbung. Der Antikörper 2A10, der in der Arbeitsgruppe von Dr. Weber hergestellt wurde, zeigte ebenfalls eine Färbung in Paraffinschnitten, die jedoch schwächer war als mit eB114. Beide Antikörper färbten die gleichen Zellstrukturen an, so dass sich die Färbung nur in ihrer Intensität unterschied. Für die Färbungen mit denen die Methylierungsergebnisse überprüft wurden, diente der Antikörper eB114 als Primärantikörper.

In normalem Hautgewebe war RASSF1A in allen Zellen zu sehen. Endothelzellen zeigten im Vergleich zu anderen Zelltypen in der Haut eine besonders starke Färbung und damit eine hohe RASSF1A-Expression. Ein Grund könnte die geringe Proliferation von Endothelzellen sein, die durch die antiproliferative Wirkung von RASSF1A am Wachstum gehindert werden könnten.

Zur Überprüfung der Methylierungsergebnisse des RASSF1A-Promotors wurden Schnitte ausgewählt, die eine homogene, inhomogene oder keine intratumorale Methylierung des *RASSF1A*-Promotors aufwiesen. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass sich die Methylierungsdaten auf Proteinebene in Paraffinschnitten abbilden lassen. Es konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben mit und ohne Promotor-Methylierung festgestellt werden. Bei Proben ohne methylierten *RASSF1A*-Promotor waren deutlich mehr RASSF1A-positive Zellen zu sehen als bei Proben, die eine Promotor-Methylierung zeigten. Auf histochemischer Ebene konnte aber nicht zwischen homogen und inhomogen methylierten Proben unterschieden werden.

5.3 Funktion von RASSF1A

Nach den Methylierungs- und Expressionsuntersuchungen des *RASSF1A*-Gens und Proteins in malignen Melanomen wurde die Funktion dieses Tumorsuppressorgens näher charakterisiert. Ein funktioneller Aspekt ist die Phosphorylierung des RASSF1A-Proteins, das nach bisherigen Untersuchungen den Zellzyklus beeinflusst. Die Experimente hinsichtlich der Funktion von RASSF1A wurden daher mit MBP-RASSF1A-Fusionsproteinen durchgeführt. Durch verschiedene Datenbankanalysen wurde die Protein-Kinase A-Phosphorylierungsstelle in der RA-Domäne an Serin 203 identifiziert. Diese wurde durch eine gerichtete Mutation gegen Phenylalanin ausgetauscht. Die bekannte Phosphorylierungsstelle der ATM-Kinase wurde durch eine gerichtete Mutagenese entfernt. So konnten an folgenden Fusionsproteinen die Phosphorylierung untersucht werden:

- MBP-RASSF1A
- MBP-RASSF1A-NT (N-Terminus von RASSF1A [AS 1-121])
- MBP-RASSF1A- Δ ATM (RASSF1A ohne ATM-Kinase-Domäne [ohne AS 125-138])
- MBP-RASSF1A-S203F (RASSF1A; Serin 203 gegen Phenylalanin ausgetauscht)
- MBP-RASSF1A- Δ ATM-S203F (RASSF1A ohne ATM-Kinase-Domäne und mit S203F-Mutation)
- MBP-RASSF1C
- MBP-RASSF1C-NT (N-Terminus von RASSF1C [AS 1-52])

Bei *in vitro*-Phosphorylierungsuntersuchungen mit Zellextrakt von IGR1-Zellen und γ -³²P-ATP zeigten lediglich die Mutationen, mit dem Aminosäureaustausch S203F keine radioaktiv phosphorylierte Bande auf dem Phosphorschirm.

Das gleiche Ergebnis konnte mit rekombinanter Protein-Kinase A in einem zellfreien *in vitro*-Versuch gezeigt werden.

Da RASSF1A den Zellzyklus beeinflusst, wurde das Phosphorylierungssignal auch in Abhängigkeit des Zellzyklus untersucht. Hierfür wurden IGR1-Zellen mit Methotrexat in der G0/G1 Phase synchronisiert. Nach Entfernung des Methotrexats waren die Zellen für etwa neun Stunden im gleichen Zellzyklusabschnitt, so dass ihr Zellextrakt zellzyklusspezifische Kinaseaktivität aufwies.

Die zellzyklusspezifischen Zellextrakte zeigten eine schwache Phosphorylierungsaktivität von MBP-RASSF1A in der G1/G0-Phase, die bis zu der

stärksten Phosphorylierung in der G2/M-Phase zunahm, wo sie bei gleicher Proteinmenge dreimal so stark war.

Da die Phosphorylierung durch rekombinante Protein-Kinase A gezeigt werden konnte, wurde nun die Aktivität von Protein-Kinase A in Abhängigkeit des Zellzyklus untersucht. Das Ergebnis war eine vom Zellzyklus unabhängige Aktivität von Protein-Kinase A. Aus diesen Resultaten lässt sich ist folgendes schließen:

1. MBP-RASSF1A wird an Serin 203 phosphoryliert
2. MBP-RASSF1A kann durch Protein-Kinase A phosphoryliert werden
3. die Phosphorylierung von MBP-RASSF1A ist zellzyklusabhängig und tritt in der G2/M-Phase am stärksten auf

6 Ausblick

6.1 Intratumorale Promotor-Methylierung von Tumorsuppressorgenen

Die Analyse von mehreren Proben pro Tumor ist ein arbeitsaufwendiges Verfahren, durch welches man jedoch Erkenntnisse hinsichtlich der tumorspezifischen Deaktivierung von Genen durch Promotor-Methylierung erlangen kann. Eine Fortsetzung dieser Probenanalyse würde statistisch repräsentative Daten von inaktivierten Genen in Tumoren liefern.

Die Proben, die zur Analyse von Promotor-Methylierung verwendet wurden wiesen eine gemeinsame Schnittkante mit einem Paraffinschnitt auf. Dies ermöglichte, die Methylierungsdaten auch auf Proteinebene im histologischen Schnitt darzustellen. Durch diese Art der Probenvorbereitung könnten neue molekularbiologische und histologische tumorspezifische Marker identifiziert werden.

6.2 Funktion von RASSF1A

Weitere Untersuchungen zur Funktion von RASSF1A sind nötig, um seine Rolle bei der Proliferation von Zellen einordnen zu können. Um die vom Zellzyklus abhängige Phosphorylierung von RASSF1A genauer zu untersuchen, könnten die Interaktionspartner in den einzelnen Zellzyklusstadien durch Pulldown-Versuche näher charakterisiert werden. Hierfür könnten die im Comassie-gefärbten SDS-Gel erhaltenen Proteinbanden ausgeschnitten und durch MALDI-TOF-Analysen bestimmt werden. Solche Pulldown-Versuche sollten zellzyklusabhängig mit dem phosphorylierten Fusionsprotein MBP-RASF1A und MBP-RASSF1A-S203F durchgeführt werden, um zu zeigen, welchen Einfluss die Phosphorylierung von RASSF1A auf die Interaktion mit Bindungspartnern hat.

Weiterhin wäre es sinnvoll, den Zeitpunkt der Phosphorylierung während der G2/M-Phase genauer zu charakterisieren. Dieser kann mit synchronisierten Zelllinien untersucht werden. Das Zellextrakt dieser Zelllinien kann außerdem auf seine Kinase-Aktivität hinsichtlich der MBP-RASSF1A-Phosphorylierung untersucht werden. Parallel zu der Phosphorylierungsreaktion kann durch Westernblotanalysen von zellzyklusabhängigen Proteinen, zum Beispiel den Cyclinen A und B sowie von Securin (siehe Abbildung 4.6) der Zeitpunkt der Phosphorylierung eingegrenzt werden.

Neben der Betrachtung solcher Zellzyklus abhängigen Proteine in verschiedenen Zelllinien könnte der Zellzyklus in weiteren Stadien analysiert werden. Die schonendste Methode der Synchronisierung ist der Serumentzug im Medium, der zu einer

Synchronisation in der G0/G1-Phase führt. Durch verschiedene pharmakologische Wirkstoffe lässt sich der Zellzyklus auch zu definierten Zeitpunkten arretieren (siehe Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.). Das Problem solcher Inhibitoren ist, dass sie Apoptose auslösen können und dass nicht alle Zelltypen gleich auf die Inhibitoren reagieren.

Durch Inhibierung von Protein-Kinase A und anderen Kinasen im Zellextrakt kann untersucht werden, welche Kinasen für eine Phosphorylierung in Frage kommen. Durch eine Zellzyklusabhängigkeit solcher Untersuchungen könnte auch die Phosphorylierung genauer bestimmt werden. Wenn mehrere Kinasen RASSF1A phosphorylieren können, kann durch zellzyklusabhängige Inhibierung die Abfolge dieser Phosphorylierung bestimmt werden.

Die Phosphorylierung der ATM-Domäne innerhalb des RASSF1A-Proteins, von der man annimmt, dass sie durch ATM-Kinase phosphoryliert wird, könnte ebenfalls genauer untersucht werden. Durch die Zugabe von Inhibitoren sollte die Phosphorylierung unterdrückt werden. Die ATM-Kinase liegt in Zellen als Homodimer vor und ist in der Lage, sich durch Autophosphorylierung zu aktivieren. Solche Autophosphorylierung wurde nach der Bestrahlung mit UV-Licht beobachtet, nach der die ATM-Kinase-Aktivität ansteigt (McGowan and Russell, 2004). Sollte die ATM-Kinase RASSF1A phosphorylieren, so würde man nach Induktion durch UV-Licht die höchste Aktivität erwarten. Vorausgesetzt sowohl Protein-Kinase A als auch ATM-Kinase können RASSF1A phosphorylieren, ist die Funktion jeder einzelnen Phosphorylierung weiterhin ungeklärt. Möglicherweise könnten sich diese Phosphorylierungen auch ausschließen, was mit entsprechenden Interaktionsstudien nachgewiesen werden müsste.

Durch das Ausschalten des Gens *RASSF1A* mittels siRNA könnten weitere Funktionsuntersuchungen an Zellen durchgeführt werden, deren Wachstum nicht auf der Inaktivierung von *RASSF1A* beruht. So könnten zum Beispiel die Lebensdauer der Cycline A und B durch Westernblotanalysen überprüft werden. Denkbar wäre auch die Beobachtung des Zellzyklusverhaltens von synchronisierten Zellen im Vergleich zu Zellen, die *RASSF1A* exprimieren.

Die funktionellen Untersuchungen des Tumorsuppressorgens *RASSF1A* sind essentiell für das Verständnis der tumorsuppressiven Wirkung dieses Gens. Die weitere Aufklärung solcher tumorsuppressiven Mechanismen kann zur frühen Tumordiagnose sowie zu neuen Therapieansätzen führen.

7 Literaturverzeichnis

- Ahmed-Choudhury, J., Agathangelou, A., Fenton, S. L., Ricketts, C., Clark, G. J., Maher, E. R., and Latif, F. (2005). Transcriptional regulation of cyclin A2 by RASSF1A through the enhanced binding of p120E4F to the cyclin A2 promoter. *Cancer Res* 65, 2690-2697.
- Ahrendt, S. A., Chow, J. T., Xu, L. H., Yang, S. C., Eisenberger, C. F., Esteller, M., Herman, J. G., Wu, L., Decker, P. A., Jen, J., and Sidransky, D. (1999). Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, 332-339.
- Archer, V. E., Breton, J., Sanchez-Garcia, I., Osada, H., Forster, A., Thomson, A. J., and Rabbitts, T. H. (1994). Cysteine-rich LIM domains of LIM-homeodomain and LIM-only proteins contain zinc but not iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 316-320.
- Azzi, A., Boscoboinik, D., and Hensey, C. (1992). The protein kinase C family. *Eur J Biochem* 208, 547-557.
- Baksh, S., Tommasi, S., Fenton, S., Yu, V. C., Martins, L. M., Pfeifer, G. P., Latif, F., Downward, J., and Neel, B. G. (2005). The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death. *Mol Cell* 18, 637-650.
- Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D. M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 15, 102-111.
- Belinsky, S. A., Nikula, K. J., Palmisano, W. A., Michels, R., Saccomanno, G., Gabrielson, E., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (1998). Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11891-11896.
- Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.
- Bolanos-Garcia, V. M. (2005). Aurora kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1572-1577.
- Cairns, P., Esteller, M., Herman, J. G., Schoenberg, M., Jeronimo, C., Sanchez-Cespedes, M., Chow, N. H., Grasso, M., Wu, L., Westra, W. B., and Sidransky, D. (2001). Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res* 7, 2727-2730.

- Chow, L. S., Lo, K. W., Kwong, J., Wong, A. Y., and Huang, D. P. (2004). Aberrant methylation of RASSF4/AD037 in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep* 12, 781-787.
- Coleman, M. L., Marshall, C. J., and Olson, M. F. (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 355-366.
- Comincini, S., Castiglioni, B. M., Foti, G. M., Del Vecchio, I., and Ferretti, L. (2001). Isolation and molecular characterization of rasfadin, a novel gene in the vicinity of the bovine prion gene. *Mamm Genome* 12, 150-156.
- Cox, A. D., and Der, C. J. (2003). The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* 22, 8999-9006.
- Dallol, A., Agathangelou, A., Fenton, S. L., Ahmed-Choudhury, J., Hesson, L., Vos, M. D., Clark, G. J., Downward, J., Maher, E. R., and Latif, F. (2004). RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics. *Cancer Res* 64, 4112-4116.
- Dammann, R., Li, C., Yoon, J. H., Chin, P. L., Bates, S., and Pfeifer, G. P. (2000). Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 25, 315-319.
- Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Liu, L., Otto, N., Gimm, O., Dralle, H., Boehm, B. O., Pfeifer, G. P., and Hoang-Vu, C. (2003a). Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 22, 3806-3812.
- Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Strunnikova, M., Rastetter, M., Seidel, C., Liu, L., Tommasi, S., and Pfeifer, G. P. (2003b). Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol Histopathol* 18, 665-677.
- Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
- Deng, Z. H., Zhou, J. H., Cao, H. Q., Sheng, M., and Weng, J. F. (2005). [Proliferation inhibition of human lung adenocarcinoma cell line A549 transfected by RASSF1A gene]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 30, 193-196.
- Dhillon, A. S., Meikle, S., Yazici, Z., Eulitz, M., and Kolch, W. (2002). Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *Embo J* 21, 64-71.
- Dougherty, M. K., Muller, J., Ritt, D. A., Zhou, M., Zhou, X. Z., Copeland, T. D., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lu, K. P., and Morrison, D. K. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* 17, 215-224.

- Dulaimi, E., Uzzo, R. G., Greenberg, R. E., Al-Saleem, T., and Cairns, P. (2004). Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res* *10*, 1887-1893.
- Dumaz, N., and Marais, R. (2005). Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *Febs J* *272*, 3491-3504.
- Esteller, M., and Herman, J. G. (2004). Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* *23*, 1-8.
- Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (1999). Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* *59*, 67-70.
- Farrell, W. E., and Clayton, R. N. (2003). Epigenetic change in pituitary tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer* *10*, 323-330.
- Fenton, S. L., Dallol, A., Agathangelou, A., Hesson, L., Ahmed-Choudhury, J., Baksh, S., Sardet, C., Dammann, R., Minna, J. D., Downward, J., *et al.* (2004). Identification of the E1A-regulated transcription factor p120 E4F as an interacting partner of the RASSF1A candidate tumor suppressor gene. *Cancer Res* *64*, 102-107.
- Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T., and Pestell, R. G. (2004). Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* *145*, 5439-5447.
- Fujimoto, A., Morita, R., Hatta, N., Takehara, K., and Takata, M. (1999). p16INK4a inactivation is not frequent in uncultured sporadic primary cutaneous melanoma. *Oncogene* *18*, 2527-2532.
- Giet, R., Petretti, C., and Prigent, C. (2005). Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol* *15*, 241-250.
- Gonzalvo, M. L., Bender, C. M., You, E. H., Glendening, J. M., Flores, J. F., Walker, G. J., Hayward, N. K., Jones, P. A., and Fountain, J. W. (1997). Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors. *Cancer Res* *57*, 5336-5347.
- Helmbold, P., Altrichter, D., Klapperstuck, T., and Marsch, W. (2005). Intratumoral DNA stem-line heterogeneity in superficial spreading melanoma. *J Am Acad Dermatol* *52*, 803-809.

- Hess, J., Angel, P., and Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117, 5965-5973.
- Hoon, D. S., Spugnardi, M., Kuo, C., Huang, S. K., Morton, D. L., and Taback, B. (2004). Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene* 23, 4014-4022.
- Hsu, J. Y., Reimann, J. D., Sorensen, C. S., Lukas, J., and Jackson, P. K. (2002). E2F-dependent accumulation of hEml1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol* 4, 358-366.
- Huang, L., Hofer, F., Martin, G. S., and Kim, S. H. (1998). Structural basis for the interaction of Ras with RalGDS. *Nat Struct Biol* 5, 422-426.
- Huang, L., Weng, X., Hofer, F., Martin, G. S., and Kim, S. H. (1997). Three-dimensional structure of the Ras-interacting domain of RalGDS. *Nat Struct Biol* 4, 609-615.
- Ishikawa, T., Zhang, S. S., Qin, X., Takahashi, Y., Oda, H., Nakatsuru, Y., and Ide, F. (2004). DNA repair and cancer: lessons from mutant mouse models. *Cancer Sci* 95, 112-117.
- Jackson, P. K. (2004). Linking tumor suppression, DNA damage and the anaphase-promoting complex. *Trends Cell Biol* 14, 331-334.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- Jones, P. A. a. B., S. B. (2002). The Fundamental Role Of Epigenetic Events in Cancer. *Nature Reviews* 3, 415-428.
- Jung, E. G., Bahmer F.A., Bojanovsky A., Boonen H., Forsewite U., Girbig P., Grimm M., Herz E., Hofmann H., Miller X., Moll I., Rauterberg A., Voigtländer V., Weiß J. (1995). *Dermatologie*, 3. Auflage edn, Hppiokrates Verlag GmbH, Stuttgart).
- Khanna, K. K., and Chenevix-Trench, G. (2004). ATM and genome maintenance: defining its role in breast cancer susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 247-262.
- Kido, M., Shima, F., Satoh, T., Asato, T., Kariya, K., and Kataoka, T. (2002). Critical function of the Ras-associating domain as a primary Ras-binding site for regulation of *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 277, 3117-3123.

- Kim, S. T., Lim, D. S., Canman, C. E., and Kastan, M. B. (1999). Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem* 274, 37538-37543.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation an Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68, 820-823.
- Laird, P. W. (2005). Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet* 14 *Spec No 1*, R65-76.
- Liao, Y., Kariya, K., Hu, C. D., Shibatohe, M., Goshima, M., Okada, T., Watari, Y., Gao, X., Jin, T. G., Yamawaki-Kataoka, Y., and Kataoka, T. (1999). RA-GEF, a novel Rap1A guanine nucleotide exchange factor containing a Ras/Rap1A-associating domain, is conserved between nematode and humans. *J Biol Chem* 274, 37815-37820.
- Liu, J., and Lin, A. (2005). Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* 15, 36-42.
- Liu, L., Tommasi, S., Lee, D. H., Dammann, R., and Pfeifer, G. P. (2003). Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene* 22, 8125-8136.
- Liu, L., Vo, A., Liu, G., and McKeegan, W. L. (2005a). Distinct structural domains within C19ORF5 support association with stabilized microtubules and mitochondrial aggregation and genome destruction. *Cancer Res* 65, 4191-4201.
- Liu, L., Vo, A., Liu, G., and McKeegan, W. L. (2005b). Putative tumor suppressor RASSF1 interactive protein and cell death inducer C19ORF5 is a DNA binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 670-676.
- Liu, L., Vo, A., and McKeegan, W. L. (2005c). Specificity of the methylation-suppressed A isoform of candidate tumor suppressor RASSF1 for microtubule hyperstabilization is determined by cell death inducer C19ORF5. *Cancer Res* 65, 1830-1838.
- Lotem, M., Yehuda-Gafni, O., Butnaryu, E., Drize, O., Peretz, T., and Abeliovich, D. (2003). Cytogenetic analysis of melanoma cell lines: subclone selection in long-term melanoma cell cultures. *Cancer Genet Cytogenet* 142, 87-91.
- McGowan, C. H., and Russell, P. (2004). The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16, 629-633.
- Mercer, K. E., and Pritchard, C. A. (2003). Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 1653, 25-40.

- Muller, H. M., Widschwendter, A., Fiegl, H., Ivarsson, L., Goebel, G., Perkmann, E., Marth, C., and Widschwendter, M. (2003). DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res* 63, 7641-7645.
- Nakayama, T., Taback, B., Turner, R., Morton, D. L., and Hoon, D. S. (2001). Molecular clonality of in-transit melanoma metastasis. *Am J Pathol* 158, 1371-1378.
- Nasmyth, K. (2002). Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297, 559-565.
- Oka, M., and Kikkawa, U. (2005). Protein kinase C in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24, 287-300.
- O'Neill, T., Dwyer, A. J., Ziv, Y., Chan, D. W., Lees-Miller, S. P., Abraham, R. H., Lai, J. H., Hill, D., Shiloh, Y., Cantley, L. C., and Rathbun, G. A. (2000). Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. *J Biol Chem* 275, 22719-22727.
- Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1989). Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4868-4871.
- Ortiz-Vega, S., Khokhlatchev, A., Nedwidek, M., Zhang, X. F., Dammann, R., Pfeifer, G. P., and Avruch, J. (2002). The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene* 21, 1381-1390.
- Pfeifer, G. P., and Dammann, R. (2005). Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Mosc)* 70, 576-583.
- Ponting, C. P., and Benjamin, D. R. (1996). A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci* 21, 422-425.
- Praskova, M., Khokhlatchev, A., Ortiz-Vega, S., and Avruch, J. (2004). Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochem J* 381, 453-462.
- Rabizadeh, S., Xavier, R. J., Ishiguro, K., Bernabeortiz, J., Lopez-Illasaca, M., Khokhlatchev, A., Mollahan, P., Pfeifer, G. P., Avruch, J., and Seed, B. (2004). The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. *J Biol Chem* 279, 29247-29254.
- Reifenberger, J., Knobbe, C. B., Sterzinger, A. A., Blaschke, B., Schulte, K. W., Ruzicka, T., and Reifenberger, G. (2004). Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. *Int J Cancer* 109, 377-384.

- Reimann, J. D., Freed, E., Hsu, J. Y., Kramer, E. R., Peters, J. M., and Jackson, P. K. (2001a). Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* *105*, 645-655.
- Reimann, J. D., Gardner, B. E., Margottin-Goguet, F., and Jackson, P. K. (2001b). Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. *Genes Dev* *15*, 3278-3285.
- Repasky, G. A., Chenette, E. J., and Der, C. J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* *14*, 639-647.
- Rodolfo, M., Daniotti, M., and Vallacchi, V. (2004). Genetic progression of metastatic melanoma. *Cancer Lett* *214*, 133-147.
- Rong, R., Jin, W., Zhang, J., Sheikh, M. S., and Huang, Y. (2004). Tumor suppressor RASSF1A is a microtubule-binding protein that stabilizes microtubules and induces G2/M arrest. *Oncogene* *23*, 8216-8230.
- Sakamoto, N., Terai, T., Ajioka, Y., Abe, S., Kobayasi, O., Hirai, S., Hino, O., Watanabe, H., Sato, N., Shimoda, T., and Fujii, H. (2004). Frequent hypermethylation of RASSF1A in early flat-type colorectal tumors. *Oncogene* *23*, 8900-8907.
- Sanchez-Cespedes, M., Esteller, M., Wu, L., Nawroz-Danish, H., Yoo, G. H., Koch, W. M., Jen, J., Herman, J. G., and Sidransky, D. (2000). Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* *60*, 892-895.
- Satyanarayana, A., and Rudolph, K. L. (2004). p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age. *J Clin Invest* *114*, 1237-1240.
- Schagdarsurengin, U., Gimm, O., Hoang-Vu, C., Dralle, H., Pfeifer, G. P., and Dammann, R. (2002). Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma. *Cancer Res* *62*, 3698-3701.
- Schagdarsurengin, U., Wilkens, L., Steinemann, D., Flemming, P., Kreipe, H. H., Pfeifer, G. P., Schlegelberger, B., and Dammann, R. (2003). Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* *22*, 1866-1871.
- Scheel, H., and Hofmann, K. (2003). A novel interaction motif, SARAH, connects three classes of tumor suppressor. *Curr Biol* *13*, R899-900.
- Schulz, W. A. (2005). *Molecular Biology of Human Cancers*, Springer).

- Searle, J. S., Schollaert, K. L., Wilkins, B. J., and Sanchez, Y. (2004). The DNA damage checkpoint and PKA pathways converge on APC substrates and Cdc20 to regulate mitotic progression. *Nat Cell Biol* 6, 138-145.
- Seidel, C., Bartel, F., Rastetter, M., Bluemke, K., Wurl, P., Taubert, H., and Dammann, R. (2005). Alterations of cancer-related genes in soft tissue sarcomas: hypermethylation of RASSF1A is frequently detected in leiomyosarcoma and associated with poor prognosis in sarcoma. *Int J Cancer* 114, 442-447.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
- Shivakumar, L., Minna, J., Sakamaki, T., Pestell, R., and White, M. A. (2002). The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol* 22, 4309-4318.
- Shohat, G., Shani, G., Eisenstein, M., and Kimchi, A. (2002). The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases. *Biochim Biophys Acta* 1600, 45-50.
- Song, M. S., Chang, J. S., Song, S. J., Yang, T. H., Lee, H., and Lim, D. S. (2005). The centrosomal protein RAS association domain family protein 1A (RASSF1A)-binding protein 1 regulates mitotic progression by recruiting RASSF1A to spindle poles. *J Biol Chem* 280, 3920-3927.
- Song, M. S., and Lim, D. S. (2004). Control of APC-Cdc20 by the tumor suppressor RASSF1A. *Cell Cycle* 3, 574-576.
- Song, M. S., Song, S. J., Ayad, N. G., Chang, J. S., Lee, J. H., Hong, H. K., Lee, H., Choi, N., Kim, J., Kim, H., *et al.* (2004). The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol* 6, 129-137.
- Spugnardi, M., Tommasi, S., Dammann, R., Pfeifer, G. P., and Hoon, D. S. (2003). Epigenetic inactivation of RAS association domain family protein 1 (RASSF1A) in malignant cutaneous melanoma. *Cancer Res* 63, 1639-1643.
- Tommasi, S., Dammann, R., Jin, S. G., Zhang Xf, X. F., Avruch, J., and Pfeifer, G. P. (2002). RASSF3 and NORE1: identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1. *Oncogene* 21, 2713-2720.
- Vavvas, D., Li, X., Avruch, J., and Zhang, X. F. (1998). Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J Biol Chem* 273, 5439-5442.
- Vos, M. D., Ellis, C. A., Bell, A., Birrer, M. J., and Clark, G. J. (2000). Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *J Biol Chem* 275, 35669-35672.

- Vos, M. D., Ellis, C. A., Elam, C., Ulku, A. S., Taylor, B. J., and Clark, G. J. (2003a). RASSF2 is a novel K-Ras-specific effector and potential tumor suppressor. *J Biol Chem* 278, 28045-28051.
- Vos, M. D., Martinez, A., Ellis, C. A., Vallecorsa, T., and Clark, G. J. (2003b). The proapoptotic Ras effector Nore1 may serve as a Ras-regulated tumor suppressor in the lung. *J Biol Chem* 278, 21938-21943.
- Walker, G. J., and Hayward, N. K. (2002). Pathways to melanoma development: lessons from the mouse. *J Invest Dermatol* 119, 783-792.
- Whang, Y. M., Kim, Y. H., Kim, J. S., and Yoo, Y. D. (2005). RASSF1A suppresses the c-Jun-NH2-kinase pathway and inhibits cell cycle progression. *Cancer Res* 65, 3682-3690.
- Wolgemuth, D. J., Lele, K. M., Jobanputra, V., and Salazar, G. (2004). The A-type cyclins and the meiotic cell cycle in mammalian male germ cells. *Int J Androl* 27, 192-199.
- Wong, I. H., Lo, Y. M., Zhang, J., Liew, C. T., Ng, M. H., Wong, N., Lai, P. B., Lau, W. Y., Hjelm, N. M., and Johnson, P. J. (1999). Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 59, 71-73.
- Yao, R., Wang, Y., and You, M. (2001). Chromosome mapping and sequence variation of the murine Ras effector gene Nore1. *Cytogenet Cell Genet* 95, 126-128.
- Yu, M. Y., Tong, J. H., Chan, P. K., Lee, T. L., Chan, M. W., Chan, A. W., Lo, K. W., and To, K. F. (2003). Hypermethylation of the tumor suppressor gene RASSF1A and frequent concomitant loss of heterozygosity at 3p21 in cervical cancers. *Int J Cancer* 105, 204-209.

8 Anhang

Tabelle 8.10: Vergleich von RASSF1A Promotor-Methylierung mit RASSF1A-Expression durch immunhistochemische Färbung in ausgewählten Melanomen (3 primäre Tumore; 1 Lymphknotenmetastase; 3 subcutane Metastasen).

Fall	Tumor	Probe	RASSF1A Immunhistochemie		
			RASSF1A Promotor-Methylierung	Anzahl der positiven Tumorzellen (%) ¹	Homogenität der Probe
3	7	1	-	100	H
		2	-	76	I
		3	-	95	I
4	5	1	-	100	H
		2	-	72	H
13	3	1	+	5.7	I
		2	+	7	H
		3	+	3	H
		4	+	4.1	H
		5	+	9.7	I
16	4	1	+	6	H
		2	-	5.5	H
		3	+	0.5	H
		4	+	13	I
		5	+	1	H
		6	-	25	I
18	2	1	+	0	H
		2	+	15	H
		3	+	5.5	H
		4	+	30.5	I
		5	-	66.7	I
20a	6	1	-	98	H
		2	-	85	H
		3	-	81	I
21	1	1	+	19.5	I
		2	+	1	H
		3	+	13.5	I
		4	+	n.d.	

Legende: +, methyliert; -, unmethyliert; n.d., nicht detektiert; H, homogen, I, inhomogen; ¹in 10 HPF (außer Probe 1 des Falls 18: 2 HPF)

Tabelle 8.11: Patienten, Tumor-Kennzeichen (Typ und Ulceration), und Promotor-Methylierung in 15 primären Melanomen und 8 Fällen mit einzelner oder multipler Melanommetastase.

Fall	Alter/ Geschlecht	Tumor Typ	TD [mm], Ulceration (U)	Mitosen pro 10 HPF (gemittelt)	Anzahl der Proben	Gen Promotor-Methylierungsstatus				
						<i>RASSF1A</i>	<i>p16</i>	<i>DAPK</i>	<i>MGMT</i>	<i>Rb</i>
1	54/m	SSM	in situ		3	-/-		-/-	-/-*	-/+
2	50/m	SSM	0.35	0	2	-/+	-/-			
3	76/f	SSM	0.45	2	3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
4	52/f	SSM	0.45 (U)	1-3	2	-/-	*/-	-/-	-/-	-/-
5	45/m	SSM	0.56	0	2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
6	53/m	SSM	0.68	0-2	2	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-
7	51/f	SSM	0.90	0-1	3	-/-	+/+/-			
8	47/m	Naevoid	1.70 (U)	0-3	2	-/-	*/-	-/-	-/-	-/-
9	64/m	SSM	2.00	1-3	4	-/-/-	-/+/-	*+/-	-/-/-	*/-/-
10	66/m	NM	2.10 (U)	1-8	3	-/*/-	+/+/-			
11	74/m	SSM	2.20	3-7	3	-/-	-/-+	+/+/-	-/-	-/-
12	37/f	SSM+Nod.	5.60 (U)	1 ^x -137 ^y	3	+/+/-	-/*			
13	92/f	SSM+Nod.	7.05 (U)	4-16	5	+/+/-	+/+/-	-/-/-	-/-/-	-/+/-
14	83/f	NM	9.50 (U)	0-4	5	-/-/-*	-/+/-*			
15	92/f	LMM	10.10 (U)	3-17	10	-/-/-/-/-/-/-	-/-/-/-/-/-/-*	-/-/-/-/-/-/-*	*+/-/*+/-/*+/-/*+/-*	-/-/*/-/*/-/*/-*
16	51/f	Meta (LN)		1-4	6	+/+/-	+/+/-	-/+/-*	-/-/-/-	-/+/-
17a	65/m	Meta (LN)		12	4	-/*/*	-/+/-	-/*/*	-/*/*	-/*/*
b		Meta (LN)		15	2	-/-	+/+	-	*/-	-/+
c		Meta (LN)		15	1	-	+	-	+	+
d		Meta (LN)		15	2	-/-	-/+	-/+	-	-
18	92/f	Meta (SC)		4-26	5	+/+/-	*/*/*/*	*/-/*/-	*+/-/-	*/*/*/*
19a	57/f	Meta (SC)		3-14	2	-/-	*/-	-/-	-/-	+/+
b		Meta (SC)		5	1	-	-	-	-	-
c		Meta (SC)		22	1	+	-	-	-	-
20a	61/f	Meta (SC)		5-38	4	-/-/*	-/-/*	-/-/*	-/-/-	-/-/-
b		Meta (SC)		4	1	-	-	-	-	-
21	81/f	Meta (SC)		4-14	4	+/+/-	*/-/*/-			
22a	79/m	Meta (SC)		3-8	3	-/-	+/+/*			
b		Meta (SC)		2	2	-/-	+/+			
c		Meta (SC)		3	1	-	+			
d		Meta (SC)		1	1	-	+			
e		Meta (SC)		1	1	-	+			
f		Meta (SC)		0	1	-	-			
23	84/m	Meta (SC)		0-26	5	-/-/*/-	+/+/*/+			

Legende: Fälle mit methylierten Proben sind **fett** dargestellt; a, b, c, d, e und f bezeichnen unterschiedliche Metastasen bei Fällen mit mehreren Metastasen; m, männlich; f, weiblich; SSM, superfiziell spreitendes Melanom; Naevoid, Nevus Zell nevus-assoziiertes Melanom (Nevus wurde von der Analyse ausgeschlossen) SSM+Nod., superfiziell spreitendes Melanom mit nodularem Anteil; NM nodulares Melanom; LMM, Lentigo malignes-Melanoma; Meta (LN), Lymphknotenmetastase eines Melanoms; Meta (SC), subcutane Metastase eines Melanoms; TD, Tumordicke; U, Ulceration; HPF, high power field (mikroskopisches 40x Feld); +, methyliert; -, unmethyliert; *nicht auswertbar; ^xn coriale Nester; ^ynodularer Anteil

Tabelle 8.12: Verschiedene Zellzyklusinhibitoren, deren Wirkung und das Zellzyklusstadium, in dem das Zellwachstum arretiert wird

Inhibitor	Wirkung	Zellzyklusstadium der Zellkultur
Aciclovir	DNA Replikationsinhibitor	G1
Aktinomycin D	RNA Syntheseinhibitor	G1
Aphidicolin	DNA Replikationsinhibitor	G1/S
Colchecin	Mikrotubuli Depolymerisation	G2/M
Docetaxel	Mikrotubuli Stabilisierung	G2/M
Hydroxyurea	DNA Replikationsinhibitor	G1/S
L-Mimosine	DNA Replikationsinhibitor	G1/S
Lovastatin	Mevalonsäure Sythesehemmer	G1
Nocodazole	Mikrotubuli Depolymerisation	G2/M
Methotrexat	Dihydrofolatreduktase Inhibitor	G1
Paclitaxel	Mikrotubuli Stabilisierung	G2/M

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht und diese Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

Halle / Saale, den 01.03.06

Matthias Rastetter

Matthias Rastetter

Persönliche Informationen

- Familienstand: verheiratet
- Nationalität: deutsch
- Geburtsdatum: 08.04.1974
- Geburtsort: Mannheim

Schulbildung

09.1985 – 04.1994 Helmholtz-Gymnasium Karlsruhe, Abitur

Zivildienst

01.09.1994 – 30.09.1995 Universitätsklinikum der Johann-Wolfgang-von-Goethe-Universität Frankfurt (Main)

Studium

01.10.1995 – 25.07.2001 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studium und Abschluss zum Diplom Biochemiker in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Neubert

01.10.2001 – 30.10.2005 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Promotion als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG Tumorgenetik bei PD Dr. Reinhard Dammann

Veröffentlichungen

Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Seidel, C., Strunnikova, M., Rastetter, M., Baier, K., and Pfeifer, G. P. (2005a). The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update. *Histol Histopathol* 20, 645-663.

Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Strunnikova, M., Rastetter, M., Seidel, C., Liu, L., Tommasi, S., and Pfeifer, G. P. (2003). Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol Histopathol* 18, 665-677.

Dammann, R., Strunnikova, M., Schagdarsurengin, U., Rastetter, M., Papritz, M., Hattenhorst, U. E., Hofmann, H. S., Silber, R. E., Burdach, S., and Hansen, G. (2005b). CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma. *Eur J Cancer* 41, 1223-1236.

Knutter, I., Hartrodt, B., Theis, S., Foltz, M., Rastetter, M., Daniel, H., Neubert, K., and Brandsch, M. (2004). Analysis of the transport properties of side chain modified dipeptides at the mammalian peptide transporter PEPT1. *Eur J Pharm Sci* 21, 61-67.

Seidel, C., Bartel, F., Rastetter, M., Bluemke, K., Wurl, P., Taubert, H., and Dammann, R. (2005). Alterations of cancer-related genes in soft tissue sarcomas: hypermethylation of RASSF1A is frequently detected in leiomyosarcoma and associated with poor prognosis in sarcoma. *Int J Cancer* 114, 442-447.