

# Die Funktion des Tumorsuppressors RASSF1A mit besonderer Berücksichtigung der epigenetischen Inaktivierung in Weichteilsarkomen

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 Frau Dipl. Biochem. Claudia Seidel  
geboren am 23.11.1978 in Karl-Marx-Stadt

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Schulz
2. Gutachter: Prof. Dr. Karin Breunig

Verteidigung am 25.01.07

**urn:nbn:de:gbv:3-000011320**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011320>]



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	i
Abbildungsverzeichnis.....	iii
Tabellenverzeichnis .....	xi
Abkürzungsverzeichnis.....	xi
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Tumorsuppressor <i>RAS Association Domain Family 1</i> (RASSF1).....	1
1.1.1 Funktion von RASSF1 .....	3
1.2 Weichteilsarkom .....	14
1.3 Bronchialkarzinom.....	14
1.4 Epigenetische Inaktivierung .....	15
1.4.1 Epigenetische Inaktivierung als Ursache der Krebsentstehung.....	15
1.4.2 Epigenetische Inaktivierung des Promoters von <i>RASSF1A</i> .....	17
1.5 Ziele der Arbeit .....	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material .....	19
2.1.1 Chemikalien .....	19
2.1.2 Geräte.....	22
2.1.3 Gebrauchswaren.....	24
2.1.4 Gebrauchslösungen.....	24
2.1.5 Sterilisation/Autoklavieren von Lösungen und Geräten.....	31
2.1.6 Molekulargewichtsstandards .....	32
2.1.7 Enzyme .....	32
2.1.8 Antikörper .....	32
2.1.9 Vorgefertigte Systeme .....	33
2.1.10 Vektoren.....	33
2.1.11 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials.....	34
2.1.12 Firmen .....	35
2.2 Methoden .....	37

---

2.2.1	Untersuchung epigenetischer Inaktivierung.....	37
2.2.2	Mutationssanalyse mittels SSCP.....	41
2.2.3	Funktionelle Untersuchungen zur Funktion von RASSF1.....	42
3	Ergebnisse .....	52
3.1	Epigenetische Inaktivierung in Weichteilsarkomen.....	52
3.1.1	Epigenetische Inaktivierung krebsrelevanter Gene.....	52
3.1.2	Epigenetische Inaktivierung von <i>MST1</i> , <i>MST2</i> , <i>WW45</i> , <i>LATS1</i> und <i>LATS2</i>	56
3.2	Epigenetische Inaktivierung der Gene <i>MST</i> , <i>LATS</i> und <i>WW45</i> im Bronchialkarzinom.....	60
3.2.1	Epigenetische Inaktivierung im nicht kleinzelligen Lungenkarzinom....	60
3.2.2	Epigenetische Inaktivierung in kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien	62
3.3	Mutationsanalyse von <i>RASSF1A</i> , <i>B-RAF</i> und <i>K-RAS</i> in Weichteilsarkomen.	63
3.3.1	<i>RASSF1A</i> .....	63
3.3.2	<i>B-RAF</i> .....	63
3.3.3	<i>K-RAS</i> .....	64
3.4	Untersuchungen zur Funktion von RASSF1 .....	65
3.4.1	Proliferationsverhalten stabil transfizierter Klone .....	66
3.4.2	Migrationsverhalten der stabilen Klone RASSF1A, RASSF1AMut203, RASSF1AMut133 und RASSF1ADelSARAH.....	74
3.4.3	Lokalisationsuntersuchungen .....	76
3.4.4	Apoptoserate.....	79
3.4.5	Interaktionsstudien .....	85
3.4.6	Untersuchung der Phosphorylierung von RASSF1A mittels phosphoserinspezifischer Antikörper .....	88
4	Diskussion .....	89
4.1	Epigenetische Inaktivierung .....	89
4.1.1	Epigenetische Inaktivierung tumorrelevanter Gene in Weichteilsarkomen	89
4.1.2	Epigenetische Inaktivierung der Gene <i>MST</i> , <i>WW45</i> und <i>LATS</i> in Weichteilsarkomen.....	91

4.1.3	Epigenetische Inaktivierung der Gene <i>MST</i> , <i>WW45</i> und <i>LATS</i> im Bronchialkarzinom.....	93
4.2	Mutationsanalyse .....	94
4.2.1	<i>RASSF1A</i> Polymorphismus Codon 133.....	94
4.2.2	Mutationsanalyse des Codons 600 von <i>B-RAF</i> .....	94
4.2.3	Mutationsanalyse des Codons 12 von <i>K-RAS</i> .....	95
4.3	Funktion von <i>RASSF1</i> .....	96
4.3.1	Funktionelle Unterschiede der Transkripte <i>RASSF1A</i> , <i>RASSF1C</i> und <i>RASSF1F</i> .....	97
4.3.2	Funktion der C1 Domäne von <i>RASSF1A</i> .....	100
4.3.3	Funktion der ATM Domäne von <i>RASSF1</i> .....	103
4.3.4	Funktion der RA Domäne von <i>RASSF1</i> .....	105
4.3.5	Funktion der SARAH Domäne von <i>RASSF1</i> .....	107
4.3.6	Einordnung der funktionellen Zusammenhänge.....	111
4.4	Einordnung der experimentellen Vorgehensweise .....	112
4.4.1	Methylierungsuntersuchungen.....	112
4.4.2	Funktionelle Untersuchungen.....	113
5	Zusammenfassung .....	114
5.1	Epigenetische Untersuchungen.....	114
5.2	Funktionelle Analysen .....	115
6	Ausblick.....	116
7	Literaturverzeichnis .....	a

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Aufbau des Gens *RASSF1* und der 3 Haupttranskripte *RASSF1A*, *RASSF1C* und *RASSF1F* im Überblick. Mit 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2 $\alpha\beta$ , 2 $\gamma$ , 3, 4, 5, 6 wurden die 7 Exons des Gens bezeichnet, C1 stellt die diacylglycerolbindende Domäne, ATM die ATM-Phosphorylierungsstelle, RA die Ras Association Domain und SARAH die SARAH Domäne dar. .... 2

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

- Mad2, die die Mitose in dem Übergang von der G2-zur Prophase bzw. in der Metaphase arretieren, ist auch RASSF1A als neuer Regulator der Mitose beschrieben, der durch die Bindung von CDC20 einen Arrest in der Prometaphase bewirkt.....7
- Abbildung 3. Schema des Signalweges, in den RASSF1A, MST, WW45 und LATS involviert sind. Die Interaktionen zwischen RASSF1A und RAS, RASSF1A und MST, MST und WW45 sowie die Phosphorylierung von LATS durch MST sind in der Literatur beschrieben (Siehe 1.1.1.2 und 1.1.1.5.1). Die Interaktion von RASSF1A mit LATS ist hypothetisch. Folgende Interaktionsdomänen sind gekennzeichnet: Die RAS-Assoziationsdomäne des Proteins RASSF1A, die SARAH-Domäne der Proteine RASSF1A, WW45 und MST, die C1 Domäne (LIM ähnlich) von RASSF1A und die LIM-bindende Domäne von LATS..... 10
- Abbildung 4. Schema des Wirkmechanismus von RASSF1A im Apo2L/TRAIL Signalweg und über die TNF-Rezeptoren (TNF-R). Die Aktivierung von RASSF1A und dessen Bindungspartner MAP1/MOAP1 kann durch die Rezeptoren DR4/5, aktiviert durch den APO2L/TRAIL und TNF-R, aktiviert durch TNF erfolgen. Daraus resultiert die Aktivierung von Bax, das im Mitochondrium die Ausschüttung von Cytochrom C vermittelt und damit die Apoptose induziert. Alternativ wird Bax durch die Aktivierung der Caspasen 8 und 10 aktiviert..... 12
- Abbildung 5. Überblick über die in der Literatur beschriebenen Interaktionspartner von RASSF1A und die Signalwege, in die RASSF1A involviert ist (Siehe Kapitel 1.1.1.7.)..... 13
- Abbildung 6. Methylation Specific PCR der Gene RASSF1A, p16 und ER $\alpha$  in primären Weichteilsarkomen. Es wurden Primer, die nach Bisulfit Behandlung der Tumor DNA, spezifisch ursprünglich methylierte (m) und unmethylierte (u) CpGs detektieren, im jeweiligen PCR Ansatz eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrolle wurden eine in vitro methylierte Kontroll-DNA (Meth.; Siehe 2.2.1.4) und eine unmethylierte Kontrolle (HeLa bzw. A549) mitgeführt. Die Produktlängen betragen bei der MSP von RASSF1A 93bp für das methylierte bzw. 105bp für das unmethylierte Produkt. Die Produktlängen der MSP von p16 betragen 150bp für das methylierte bzw. 151bp für das unmethylierte Produkt und die der MSP für ER $\alpha$  159bp für das methylierte bzw. 161 für das unmethylierte PCR-Produkt. Mit M ist der 100 bp Marker gekennzeichnet.....52
- Abbildung 7. Combined Bisulfit Restriction Analysis der Gene MSH2 und MLH1 in Weichteilsarkomen. Die zu untersuchenden Abschnitte wurden durch PCR amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen TaqI (COBRA MLH1) und HpyCH4IV (COBRA MSH2) geschnitten. Die Restriktionen (+) und ungeschnittene PCR Produkte (-) wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrollen wurde eine in vitro methylierte Kontrolle (Meth.; Siehe 2.2.1.4 ) und

- eine unmethylierte Kontrolle (HeLa) mitgeführt. Mit M ist der 100 bp DNA Längenstandard gekennzeichnet. .... 53
- Abbildung 8. RASSF1A Expressionsanalysen in der Rhabdomyosarkomzelllinie RD und in Weichteilsarkomen. (A) Die Reexpression von RASSF1A nach Behandlung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD mit 0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin wurde mittels real-time-RT-PCR (Produktgröße 239 bp) analysiert. Die Expression des Ansatzes nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin wurde in einer komparativen Auswertung als 100% angenommen. Zellen, die nicht mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelt wurden zeigen nur 2% der Expression. Als Kontrolle diente die Expression des Genes GAPDH (Größe des PCR Produktes 176 bp). (B) Real-time-RT-PCR Analyse der Expression von RASSF1A in Weichteilsarkomproben, die einen methylierten (m) bzw. unmethylierten (u) Promoter von RASSF1A aufwiesen. Mit M ist der 100 bp DNA Längenstandard gekennzeichnet..... 55
- Abbildung 9. Kaplan-Meier Überlebensanalyse für Weichteilsarkompatienten mit methyliertem bzw. unmethyliertem RASSF1A Promoter. Patienten, deren Tumor in die Stadien zwei und drei klassifiziert wurden, wurden in die Analyse einbezogen. Signifikant ( $p=0,0284$ ; Log-Rank-Test) höher war die Überlebenszeit für Patienten, die keine RASSF1A Promoterhypermethylierung des Tumors aufwiesen. .... 56
- Abbildung 10. Methylation Specific PCR der Gene MST1, MST2, LATS1, LATS2 und WW45 in Weichteilsarkomen. Es wurden Primer, die nach Bisulfit Behandlung der Tumor DNA, spezifisch ursprünglich methylierte (m) und unmethylierte (u) CpGs detektieren, im jeweiligen PCR Ansatz eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrolle wurden eine in vitro methylierte Kontroll-DNA (Meth.; Siehe 2.2.1.4) und eine unmethylierte Kontrolle (HF53, HeLa bzw. 6/93) mitgeführt. Die Produktlängen betragen bei der MSP von MST1 120 bp für das methylierte bzw. 125 bp für das unmethylierte Produkt. Die Produktlängen der MSP von MST2 betragen 99 bp für das methylierte bzw. 108 bp für das unmethylierte Produkt und die der MSP für LATS1 125 bp für methyliertes und unmethyliertes PCR Produkt, für LATS2 150 bp für methyliertes und unmethyliertes Produkt und für WW45 116 bp für das methylierte bzw. 131 bp für das unmethylierte Produkt. Mit M ist der 100 bp DNA Längenstandard gekennzeichnet..... 57
- Abbildung 11. MST1 Expressionsanalyse in SKLMS. Die Expression von MST1 nach Behandlung der Leiomyosarkomzelllinie SKLMS mit 0  $\mu$ M und 10  $\mu$ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin wurde nach RNA Isolation mittels RT-PCR (200 bp) analysiert. Als Kontrolle dient die Expression des Genes GAPDH (Größe des PCR Produktes 176 bp). .... 59
- Abbildung 12. Analyse der Überlebenszeit mittels Cox`proportional hazard regression model für Weichteilsarkompatienten nach Methylierungsstatus des MST1

- Promoters. Patienten, deren Tumor in die Stadien zwei und drei klassifiziert wurden, wurden in die Analyse einbezogen. Signifikant (RR=8.2; p=0.036) höher war die Überlebenszeit für Patienten, die eine MST1 Promoterhypermethylierung des Tumors aufwiesen. ....60
- Abbildung 13. Methylation Specific PCR der Gene MST1, MST2, LATS1, LATS2 und WW45 in Lungenkarzinomen (T) und Normalgewebekontrollen (N). Es wurden Primer, die nach Bisulfit Behandlung der Tumor DNA, spezifisch ursprünglich methylierte (m) und unmethylierte (u) CpGs detektieren, im jeweiligen PCR Ansatz eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrolle wurden eine in vitro methylierte Kontroll-DNA (Meth.; Siehe 2.2.1.4) und eine unmethylierte Kontrolle (HF53) mitgeführt. Die Produktlängen betragen bei der MSP von MST1 120 bp für das methylierte bzw. 125 bp für das unmethylierte Produkt. Die Produktlängen der MSP von MST2 betragen 99 bp für das methylierte bzw. 108 bp für das unmethylierte Produkt und die der MSP für LATS1 125 bp für methyliertes und unmethyliertes PCR Produkt, für LATS2 150 bp für methyliertes und unmethyliertes Produkt und für WW45 116 bp für das methylierte bzw. 131 bp für das unmethylierte Produkt. Mit M ist der 100 bp DNA Längenstandard gekennzeichnet. ....61
- Abbildung 14. SSCP Analyse des Codons 133 des Gens RASSF1A in Weichteilsarkomtumoren. Die Analyse der PCR Produkte auf Polymorphismen erfolgte im 16%igen Acrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Als Kontrolle (K1) diente DNA aus Blut eines heterozygoten Trägers des Polymorphismus G/TCT. Mit wt sind die Proben gekennzeichnet, die keinen Polymorphismus tragen. Als DNA Längenstandard wurde der 100 bp DNA Marker (M) mitgeführt. ....63
- Abbildung 15. Sequenzanalyse des Codons 600 des Gens B-RAF. Die Kontrollen der SSCP SKMEL (heterozygot GAG/GTG) und Blut-DNA (wt GTG) sowie die Kontrollsequenzierung der Weichteilsarkomprobe STS 20 (heterozygot GAG/GTG) wurden dargestellt. ....64
- Abbildung 16. SSCP Analyse des Codons 600 des Gens B-RAF in Weichteilsarkomtumoren. Die Analyse der PCR Produkte auf Polymorphismen erfolgte im 17%igen Acrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Als Kontrolle (SKMEL) diente DNA der Melanomzelllinie SKMEL, die heterozygot die Mutation GAG (GAG/GTG) trägt. Mit wt sind die Proben gekennzeichnet, die homozygot das Codon 600 GTG aufwiesen. ....64
- Abbildung 17. SSCP Analyse des Gens K-RAS in Weichteilsarkomtumoren. Die Analyse der PCR Produkte auf Polymorphismen erfolgte im 15%igen Acrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Als Wildtyp-Kontrolle (K, GGT/GGT) diente DNA aus Blut. Die Pankreaskarzinomzelllinien CAPAN1 (GTT/GTT), HUP-T3 (CGT/GGT) und PaCa-2 (TGT/TGT) wurden als Kontrollen

- für die Mutationsereignisse GTT, CGT und TGT eingesetzt. Als DNA Längenstandard wurde der 100 bp DNA Marker (M) mitgeführt. .... 65
- Abbildung 18. Nachweis der stabilen Expression von RASSF1A, RASSF1C, RASSF1F, der mutagenisierten Formen von RASSF1A (Siehe Tabelle 13) sowie der deletierten Formen RASSF1ADelC1, RASSF1ADelC1ATM und RASSF1ADelSARAH mittels RT-PCR. Eingesetzt wurden die Primer FlagF (Flag-Tag) und L27111, die PCR Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel analysiert. Als DNA Längenstandard dient ein 100 bp Marker. .... 67
- Abbildung 19. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1F exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. .... 68
- Abbildung 20. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C, die Formen RASSF1AMut52 und RASSF1AMut53 (Klone 1 und 3) exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. (A) zeigt Wachstumskurven, die in zinkfreiem Optimem (1% FCS) aufgenommen wurden, während im Ansatz (B) dem Optimem (1% FCS) 10  $\mu$ M Zinkionen zugegeben wurden. .... 69
- Abbildung 21. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C, RASSF1AMut131 und RASSF1AMut132 exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. .... 70
- Abbildung 22. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1AMut133 (3 Klone) exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. .... 70
- Abbildung 23. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C RASSF1AMut246 und RASSF1AMut257 exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. .... 71
- Abbildung 24. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1AMut203 (drei Klone) exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). In drei unabhängigen Experimenten wurden 150000 Zellen in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl ermittelt. .... 71
- Abbildung 25. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C RASSF1ADelC1 und RASSF1ADelC1ATM exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. .... 72

- Abbildung 26. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1ADelSARAH (zwei Klone) exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). In drei unabhängigen Experimenten wurden 150000 Zellen in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl ermittelt. ....72
- Abbildung 27. Mittlere Koloniegrößen der im weichen Agar gebildeten Kolonien nach 4 Wochen Wachstum. Es wurden die Größen von mindestens 20 Kolonien je Klon vermessen und der Mittelwert bestimmt. ....73
- Abbildung 28. Koloniebildung in weichem Agar verschiedener stabil transfizierter A549 Zellen, die RASSF1A, RASSF1C, RASSF1AMut257, RASSF1ADelC1, RASSF1ADelC1ATM, RASSF1AMut53, RASSF1ADelSARAH, RASSF1F und RASSF1AMut133 exprimierten im Vergleich zur Vektorkontrolle. Die Zellen wurden in weichem Agar gegossen und wuchsen über vier Wochen zu Kolonien aus, die nach der Färbung mit Iodonitrotetrazoliumchlorid am Mikroskop Leica DMIRB mit dem Programm MetaVue vermessen wurden. Die Abbildung zeigt Beispielkolonien, zur Auswertung wurden mindestens 20 Kolonien pro Ansatz herangezogen.....74
- Abbildung 29. Migrationsgeschwindigkeiten in  $\mu$ /min von stabil transfizierten Zellen, die RASSF1A, RASSF1ADelSARAH (A), RASSF1AMut203 (B) und RASSF1AMut133 (C) exprimierten sowie der Vektorkontrolle. Die Zellen wurden in eine künstliche Kollagenmatrix gegossen und bis zu zwei Tagen unter dem Mikroskop beobachtet, alle 10 min wurde ein Bild aufgenommen. ....75
- Abbildung 30. Lokalisation von RASSF1C, RASSF1CDeSARAH, RASSF1A, RASSF1ADelSARAH, und RASSF1AMut203 in HEK293 nach transienter Transfektion in HEK293 Zellen. Die Ansätze wurden mit Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern und DAPI (Kernfärbung) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen. ....77
- Abbildung 31. Abnorme Spindeln, Spindelpolanordnungen und Chromosomenungleichverteilungen in HEK293 nach transienter Expression von RASSF1ADelSARAH. Es wurde mit Anti- $\alpha$ -Tubulin- Antikörper und DAPI (Kernfärbung) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen. Trotz der Kolo-kalisation zu Tubulin, zeigten sich starke Veränderungen beim Verlauf der Mitose. ....78
- Abbildung 32. Anteil Mitosen bzw. abnormer Mitosen nach Expression von YFP-RASSF1A bzw. YFP-RASSF1ADelSARAH in HEK293. Ca. 1000 Transfizierte Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten ausgezählt und der Anteil mitotischer Zellen, sowie abnormer mitotischer Zellen wurde bestimmt.....78
- Abbildung 33. Apoptoserate nach transienter Transfektion von Flag-RASSF1A, Flag-RASSF1C, Flag-RASSF1F und der mutagenisierten RASSF1A-Konstrukte sowie der Vektor-Kontrolle (pCMV-Tag1) in A549 Zellen. Apoptotische Zellkerne

- wurden mit Hilfe der TUNEL Färbung fluoreszenzmarkiert und im Verhältnis zu DAPI gefärbten Zellkernen ausgezählt. .... 79
- Abbildung 34. Apoptoserate nach transienter Expression von Flag-RASSF1A, Flag-RASSF1AMut53, Flag-RASSF1AMut131 und Flag-RASSF1AMut246 sowie der Vektor-Kontrolle (pCMV-Tag1) in A549 Zellen in Vierfachbestimmung. Apoptotische Zellkerne wurden mit Hilfe der TUNEL Färbung fluoreszenzmarkiert und im Verhältnis zu DAPI gefärbten Zellkernen ausgezählt. .... 80
- Abbildung 35. TUNEL Experiment in A549 Zellen. Transient YFP-RASSF1ADelSARAH exprimierende A549 Zellen wurden mit TUNEL und DAPI gefärbt. A stellt eine transfizierte (grüne Fluoreszenz), apoptotische (rote TUNEL Fluoreszenz) Zelle dar, während B eine transfizierte, nicht apoptotische Zelle und C eine nicht transfizierte, nicht apoptotische Zelle zeigt. .... 81
- Abbildung 36. Apoptoserate nach transienter Expression der Proteine YFP-RASSF1C, YFP-RASSF1A, YFP-RASSF1ADelSARAH und YFP-RASSF1AMut203 in A549. Mit TUNEL markierte Zellen wurden im Verhältnis zu transfizierten Zellen ausgezählt. Das Experiment erfolgte in einer Dreifachbestimmung. .... 81
- Abbildung 37. Stabilisierung der Tubulinstrukturen durch YFP-RASSF1A, YFP-RASSF1C und YFP-RASSF1ADelSARAH in HEK293 während der Mitose und nach Behandlung mit Nocodazol, verglichen mit YFP exprimierenden Zellen. HEK293 Zellen wurden transient transfiziert und nach 24 h für 1h mit 20  $\mu$ M Nocodazol behandelt. Die Ansätze wurden mit Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern und DAPI (Kernfärbung) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen. .... 83
- Abbildung 38. Stabilisierung der Tubulinstrukturen durch YFP-RASSF1A und YFP-RASSF1C in A549 nach Behandlung mit Nocodazol, verglichen mit YFP exprimierenden Zellen. A549 Zellen wurden transient transfiziert und nach 24 h für 1h mit 20  $\mu$ M Nocodazol behandelt. Die Ansätze wurden mit Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern und DAPI (Kernfärbung) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen. .... 84
- Abbildung 39. Paclitaxel-induzierte Apoptose in stabil transfizierten A549 Zellen, die RASSF1A, RASSF1C, RASSF1F, RASSF1AMut133, RASSF1AMut203 bzw. RASSF1ADelSARAH exprimieren, sowie der Vektorkontrolle (Flag-Vektor) und A549. Die Rate apoptotischer Zellkerne wurde nach 18 h Behandlung mit 0,1  $\mu$ M Paclitaxel der stabil transfizierten A549 Zellen durch Auszählung der mit Hoechst33342 gefärbten Zellkerne am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Die Ansätze wurden in Vierfach- bzw. Doppelbestimmung durchgeführt. .... 85
- Abbildung 40. In vitro Interaktion der Proteine K-RAS und RASSF1A. Die Proteine MPB-K-RAS (71 kDa) und MPB (45 kDa, Kontrolle) wurden 4 h in E.Coli überexprimiert, das Gesamtprotein (A) wurde isoliert, der Proteingehalt bestimmt

- und grosenanteilig die gleiche Proteinmenge MPB-K-RAS und MPB an Amylose Resin gebunden für die Präzipitation des radioaktiv markierten RASSF1A (B und C) eingesetzt. Mit M wurde der Proteinmarker bezeichnet, Banden der molekularen Masse von 50 und 75 kDa wurden gekennzeichnet. Die Detektion des radioaktiv markierten RASSF1A erfolgte am Phosphoimager. Eine Bindung von RASSF1A erfolgte an MPB-K-RAS jedoch nicht bzw. schwächer an MPB. Es wurde eine Doppelbestimmung (B und C) durchgeführt. ....86
- Abbildung 41. Interaktion der Proteine RASSF1A und RASSF1C mit MST1 und MST2 über die SARAH Domäne und Interaktion zwischen MST1 und WW45. Die zu untersuchenden Interaktionspartner wurden in HEK293 als Fusionsproteine koexprimiert, das Gesamtprotein wurde 48 h nach Transfektion isoliert und die GST-Fusionsproteine wurden mittels GSH-Sepharose präzipitiert. Kopräzipitiert wurden Flag-markierte Interaktionspartner. Die Detektion erfolgte im Westen Blot sowohl mit Anti-Flag-Antikorpfern (Flag-Blot) als auch mit Anti-GST-Antikorpfern (GST-Blot). Mitgeführt wurde ein Protein-Molekulargewichtsstandard (M).....87
- Abbildung 42. Untersuchung der putativen Phosphorylierungsstelle Serin 203 des Proteins mit phospho-spezifischen Antikorpfern. GST-RASSF1A und GST-RASSF1AMut203 wurden in HEK293 überexprimiert, das Gesamtprotein wurde nach 48 h isoliert und die GST-Fusionsproteine wurden mit GSH-Sepharose aufgereinigt. Im Western Blot wurde mit phospho-serinspezifischen Antikorpfern und zur Kontrolle mit Anti-GST-Antikorpfern (GST-Blot) detektiert. Mit Pfeilen sind die Proteine GST-RASSF1A, GST-RASSF1AMut203 und GST im Western Blot markiert, bei dem mit phospho-serinspezifischen Antikorpfern detektiert wurde. GST-RASSF1A und GST-RASSF1AMut203 hatten eine molekulare Masse von 69 kDa. GST wurde als Kontrolle mitgeführt und migrierte bei 30 kDa. Mitgeführt wurde ebenfalls ein Protein-Molekulargewichtsstandard (Marker). ...88
- Abbildung 43. Vergleich der LIM Domänen der LATS bindenden Proteine Zyxin (LIM I und LIM II, die beide essentiell für die LATS Bindung sind und Ajuba (LIM) mit der C1 Domäne von RASSF1A. Die Zinkfinger motive der LIM Domänen und der C1 Domäne bestehen aus Cysteinen und Histidinen (blaue Balken) in bestimmten AS Abständen. Mit rotem Balken wurden die Cysteine der LIM Domänen markiert, die in der C1 Domäne durch ein Aspartat (brauner Balken) ersetzt werden könnte. ....101
- Abbildung 44. Mögliche regulatorische Funktion von RASSF1A durch Bindung von MST und LATS. RASSF1A könnte über die Interaktion mit MST und LATS an der Entscheidung, ob die Zelle proliferiert, arretiert bzw. in die Apoptose geht, beteiligt sein. ....110



---

Apo2L/TRAIL	<i>Apo2 ligand or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
C1	<i>protein kinase C conserved region 1</i>
CDC20	<i>cell division cycle 20 homolog</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CNK1	<i>connector enhancer of KSR</i>
COBRA	<i>Combined Bisulfite Restriction Analysis</i>
DAG	Diacylglycerol/Phorbolster Bindedomäne
DAP4	<i>death associated protein 4</i>
Diap1	<i>Drosophila inhibitor of apoptosis</i>
DISC	<i>Death Inducing Signalling Complex</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Emi1	<i>early mitotic arrest 1</i>
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
ER $\alpha$	<i>estrogen receptor <math>\alpha</math></i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- dehydrogenase
GCK	<i>germinal center kinases</i>
GFP	<i>Green fluoreszent protein</i>
GSH	<i>glutathione</i>
GST	<i>glutathione S-transferase</i>
Hpo	Hippo
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LATS	<i>large tumor suppressor</i>
LIM	<i>Zinc-binding domain present in LIN-11, Isl1, MEC-3</i>

---

MAGD	<i>mitochondrial aggregation and genome destruction</i>
MAP1/ MOAP1	<i>modulator of apoptosis 1, entspricht MOAP1</i>
MAP1B	<i>microtubule-associated protein 1B</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinases</i>
MFH	Malignes fibröses Histiozytome
MLH1	<i>mutL homologue 1</i>
MPB	maltose binding protein
MSH2	<i>mutS homologue 2</i>
MSH3	<i>mutS homologue 3</i>
MSP	<i>Methylation Specific PCR</i>
MST1	<i>Mammalian STE20 like Kinase</i>
NORE1	<i>novel Ras effector 1</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKC	Protein Kinase C
PMCA4b	<i>plasma membrane calmodulin-dependent calcium ATPase 4b</i>
PMS2	<i>postmeiotic segregation increased 2</i>
RA	<i>RAS association (RalGDS/AF-6) domain</i>
<i>RASSF1</i>	<i>RAS Association domain family 1</i>
Rb1	Retinoblastoma
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>
SARAH	Sav/RASSF1/Hippo
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
STS	<i>soft tissue sarcomas</i>
TUNEL	<i>Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling</i>
Wts	Warts
WW45	<i>45 kDa WW domain protein</i>
XPA	Xeroderma Pigmentosum, <i>complementation group A</i>
YFP	yellow fluoreszent protein



# 1 Einleitung

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

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

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

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

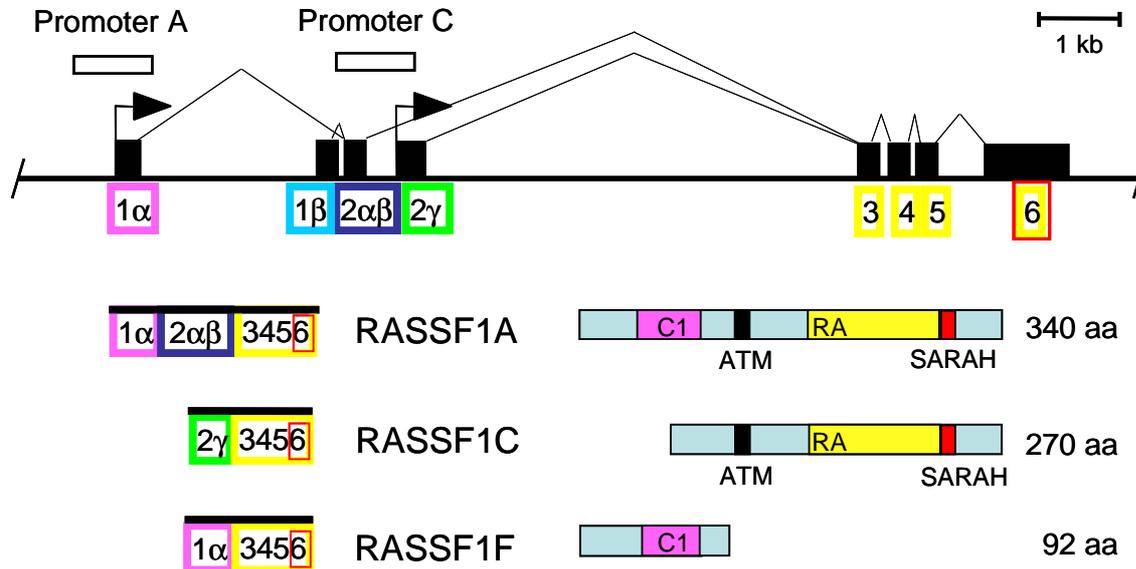


Abbildung 1. Aufbau des Gens RASSF1 und der 3 Haupttranskripte RASSF1A, RASSF1C und RASSF1F im Überblick. Mit 1α, 1β, 2αβ, 2γ, 3, 4, 5, 6 wurden die 7 Exons des Gens bezeichnet, C1 stellt die diacylglycerolbindende Domäne, ATM die ATM-Phosphorylierungsstelle, RA die Ras Association Domain und SARAH die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

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

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

### 1.1.1 Funktion von RASSF1

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

#### 1.1.1.1 Lokalisation von RASSF1

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

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

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

#### 1.1.1.2 Interaktion von RASSF1A mit RAS

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

### 1.1.1.3 Das Homolog NORE1

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

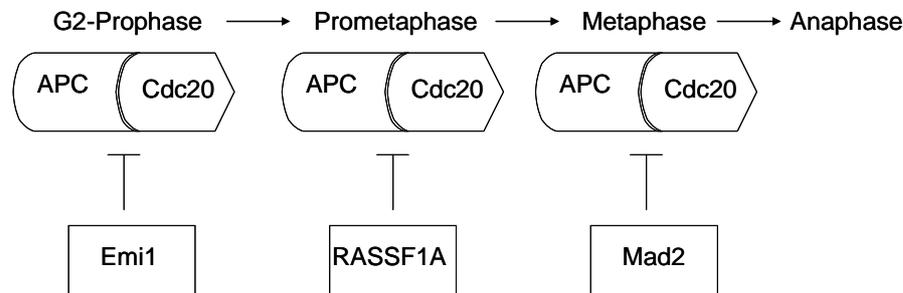
### 1.1.1.4 Zellzyklusregulation und Migration

In der Brustkrebszelllinie MCF7 wurde 24 bzw. 48 h nach transienter Überexpression von RASSF1A ein Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus detektiert, während nach 72 h Überexpression ein Arrest in der G<sub>2</sub>-M-Phase festgestellt wurde (Rong *et al.* 2004). Zellen der humanen, embryonalen Nierenzelllinie 293T, die endogenes RASSF1A exprimieren, arretierten nach zusätzlicher Überexpression von exogenem RASSF1A oder RASSF1C ebenfalls in der G<sub>2</sub>-M-Phase (Rong *et al.* 2004). Song *et al.* zeigten auch einen G<sub>2</sub>-M-Arrest nach Überexpression von RASSF1A, der jedoch in diesem Fall nicht durch RASSF1C hervorgerufen werden konnte (Song *et al.* 2004). RASSF1A inhibiert den Zellzyklus, die mutagenisierten Formen RASSF1AMut65 und RASSF1AMut257 zeigten jedoch eine signifikant niedrigere Inhibierung verglichen zu RASSF1A (Dallol *et al.* 2004). Die Form RASSF1AMut131 (S→F) zeigte dabei jedoch keine Veränderungen verglichen mit RASSF1A (Vos *et al.* 2004). Die Überexpression von RASSF1A resultierte weiterhin in einer verlangsamten Migration und einer veränderten Morphologie der Zellen (Dallol *et al.* 2005). Ebenso wurde gezeigt, dass auch eine Herabregulation der RASSF1A Expression zur ungewöhnlichen Zellmorphologie, verminderten Zell-Zell-Adhäsion und zur verstärkten Migration der Zellen führte (Dallol *et al.* 2005). Der Inhibitor der Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase LY294002 konnte den Effekt einer erhöhten Migrationsfähigkeit nach Herabregulation der RASSF1A Expression aufheben und zusätzlich wurde eine erhöhte Phosphorylierung von AKT verzeichnet (Dallol *et al.* 2005). Die Erhöhung des Cyclin

D1 Levels nach Herabregulation von RASSF1A kann durch den Inhibitor LY294002 verhindert werden (Dallol *et al.* 2005). Die Hemmung der Akkumulation von Cyclin D1 bei Expression von RASSF1A war von Shivakumar *et al.* bereits beschrieben (Shivakumar *et al.* 2002), ebenso, wie die Möglichkeit den Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase, hervorgerufen durch Reexpression von RASSF1A in der humanen Lungenkrebszelllinie H1299, durch Überexpression von E7 (aus Papillomavirus) oder Cyclin A zu umgehen (Shivakumar *et al.* 2002). Die mutagenisierten Formen RASSF1AMut133 (A→S) und RASSF1AMut131 (S→F) arretierten den Zellzyklus ebenso wie RASSF1A (Shivakumar *et al.* 2002). Eine funktionelle Auswirkung auf den Zellzyklusarrest nach Mutation des Codons 131 und 133 liegt nicht vor, obwohl eine Abnahme der Phosphorylierung im Western Blot detektiert wurde (Shivakumar *et al.* 2002). RASSF1A scheint somit in den Rb Signaltransduktionweg involviert zu sein. Rb1, ein Tumorsuppressorgen, das in Retinoblastoma inaktiviert vorliegt, stellt einen Regulator des Übergangs von der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus zur S-Phase dar und ist somit entscheidend für die Regulation der Proliferation der Zelle. Liegt Rb1 aktiv (lediglich an zwei Stellen phosphoryliert) vor, so bindet es die Transkriptionsfaktoren E2F1, E2F2 und E2F3, wird es jedoch hyperphosphoryliert, so wird es inaktiviert, E2F wird nicht mehr gebunden und die Transkription von Proteinen, die den Übergang zur S-Phase initiieren, wird eingeleitet (Ho and Dowdy 2002; Sherr 2004; Schulz 2005). Phosphoryliert wird Rb durch die CDK4/Cyclin D bzw. durch die CDK2/Cyclin E. Gezeigt wurde, dass die Herabregulation von RASSF1A das Cyclin D1 Level erhöht (Shivakumar *et al.* 2002). Eine Erhöhung des Cyclin D1 Levels könnte regulatorische Effekte auf Rb haben und so möglicherweise den von Rong *et al.* beschriebenen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase verursachen. Die exogene Expression von RASSF1A rief eine verminderte Phosphorylierung von JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) und eine verminderte Expression von Cyclin D1 hervor und auch die JNK Substrate ATF-2 und c-Jun wurden nicht mehr phosphoryliert (Whang *et al.* 2005), woraus die Gruppe die Regulation des Cyclin D1 Levels durch RASSF1A, den wachstumsinhibierenden Effekt von RASSF1A und den G<sub>1</sub>-Arrest durch den JNK Signalweg vermittelt sieht (Whang *et al.* 2005).

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

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



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

Abbildung 2. Schema der Wirkweise von RASSF1A in der Zellzyklusregulation durch Inhibierung des APC-CDC20 Komplexes. Neben Emi1 (*early mitotic arrest1*) und Mad2, die Mitose in dem Übergang von der G<sub>2</sub>-zur Prophase bzw. in der Metaphase arretieren, ist auch RASSF1A als neuer Regulator der Mitose beschrieben, der durch die Bindung von CDC20 einen Arrest in der Prometaphase bewirkt.

Eine weiterer Mechanismus der Zellzyklusregulation durch RASSF1A wurde postuliert, nachdem die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor p120<sup>E4F</sup> gezeigt wurde, die über den N-Terminus von RASSF1A geht (Fenton *et al.* 2004). Die Koexpression von RASSF1A und p120<sup>E4F</sup> bewirkte eine Erniedrigung des Anteils an Zellen in der S-Phase und eine Erhöhung der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase (Fenton *et al.* 2004). Die Gruppe konnte zeigen, dass die Regulation des Zellzyklus dabei von der Expression des Cyclin A2 abhängen könnte und dass RASSF1A dabei die Bindung von p120<sup>E4F</sup> am Promoter von Cyclin A2 reguliert und somit dessen Expression (Ahmed-Choudhury *et al.* 2005). Cyclin A2 ist im Übergang der Zelle zur S-Phase und in den G<sub>2</sub>-M-Übergang involviert.

#### 1.1.1.5 RASSF1A und Apoptose

Die Rolle von RASSF1 in apoptotischen Prozessen ist verschieden beschrieben. So wurde gezeigt, dass die Transfektion von RASSF1C in die embryonale Fibroblastenzelllinie der Maus NIH 3T3 Zellen Apoptose induziert, und dass dieser auch wachstumsinhibierender Effekt verstärkt wurde, wenn konstitutiv aktives Ha-RAS(G2V) koexprimiert wurde (Vos *et al.* 2000). Mit RASSF1A transient transfizierte H1299 Zellen zeigten keinerlei apoptotische Reaktion (Shivakumar *et al.* 2002). Nach Expression von GFP-RASSF1A in MCF7 und 293T Zellen jedoch wurde im zeitlichen Verlauf von 24 h bis 72 h ein Anstieg der Zellkerne in der Sub-G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-Phase, die apoptotisch sind, festgestellt (Rong *et al.* 2004).

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

#### 1.1.1.5.1 RASSF1A und dessen Interaktionspartner MST

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

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

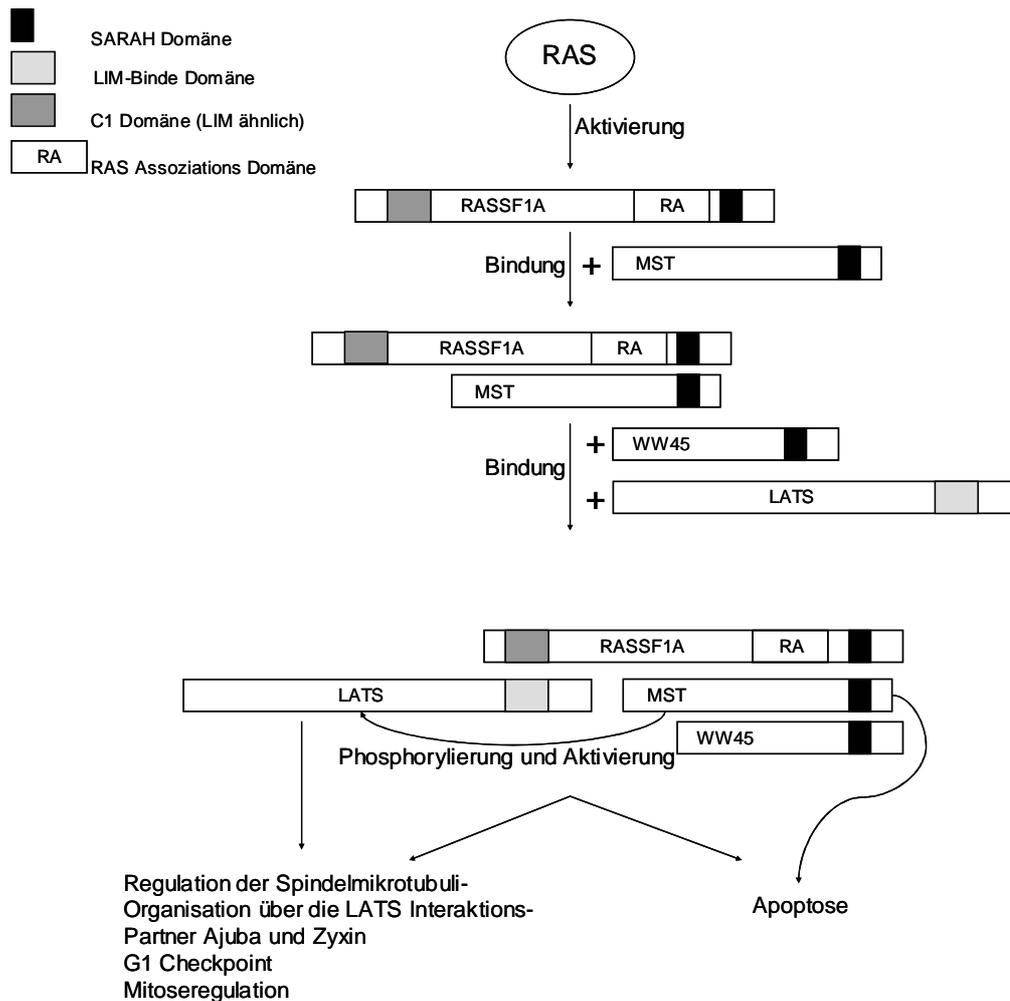


Abbildung 3. Schema des Signalweges, in den RASSF1A, MST, WW45 und LATS involviert sind. Die Interaktionen zwischen RASSF1A und RAS, RASSF1A und MST, MST und WW45 sowie die Phosphorylierung von LATS durch MST sind in der Literatur beschrieben (Siehe 1.1.1.2 und 1.1.1.5.1). Die Interaktion von RASSF1A mit LATS ist hypothetisch. Folgende Interaktionsdomänen sind gekennzeichnet: Die RAS-Assoziationsdomäne des Proteins RASSF1A, die SARAH-Domäne der Proteine RASSF1A, WW45 und MST, die C1 Domäne (LIM ähnlich) von RASSF1A und die LIM-bindende Domäne von LATS.

Für LATS1 wurde ebenfalls ein Interaktionspartner, Zyxin, gefunden wobei die Interaktion von 2 LIM Domänen im Protein Zyxin abhängig ist (Hirota *et al.* 2000). LATS1 ist während der Interphase an Centrosome und während der Metaphase und Anaphase in den Spindeln lokalisiert (Hirota *et al.* 2000). Zyxin ist in mitotischen Zellen mit LATS1 kolokalisiert und wird während der Mitose durch Cdc2 phosphoryliert, was für eine Bindung von LATS1 essentiell ist (Hirota *et al.* 2000). Es wurde gezeigt, dass LATS1 auch durch Cdc2 phosphoryliert wird und die phosphorylierte Form die Lokalisation an Centrosome und Spindeln zeigt (Morisaki *et al.* 2002). Zudem wurde publiziert, dass LATS an der Regulation des G<sub>1</sub>-Checkpoints beteiligt ist und für die normale Progression der Mitose von Bedeutung ist (Abbildung 3), fehlt LATS, so kommt es zur Polyploidie und der G<sub>1</sub>-Checkpoint ist aufgehoben (Iida *et al.* 2004).

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

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

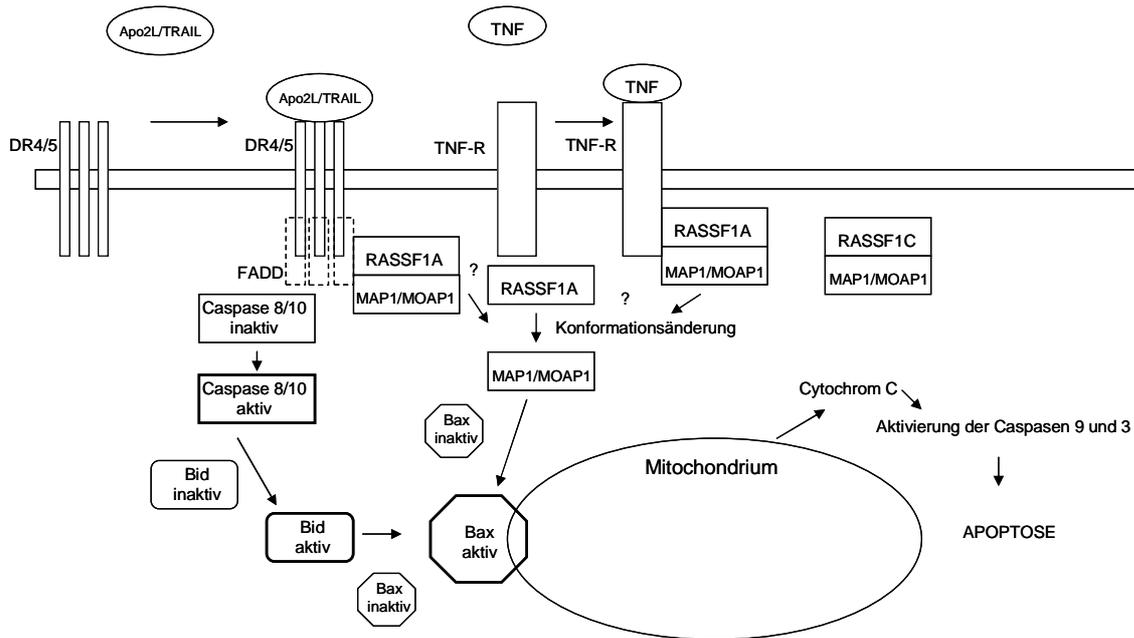


Abbildung 4. Schema des Wirkmechanismus von RASSF1A im Apo2L/TRAIL Signalweg und über die TNF-Rezeptoren (TNF-R). Die Aktivierung von RASSF1A und dessen Bindungspartner MAP1/MOAP1 kann durch die Rezeptoren DR4/5, aktiviert durch den Apo2L/TRAIL und TNF-R, aktiviert durch TNF erfolgen. Daraus resultiert die Aktivierung von Bax, das im Mitochondrium die Ausschüttung von Cytochrom C vermittelt und damit die Apoptose induziert. Alternativ wird Bax durch die Aktivierung der Caspasen 8 und 10 aktiviert.

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

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

#### 1.1.1.6 Weitere funktionelle Zusammenhänge

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

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

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

#### 1.1.1.7 Zusammenfassung der Funktion von RASSF1A

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

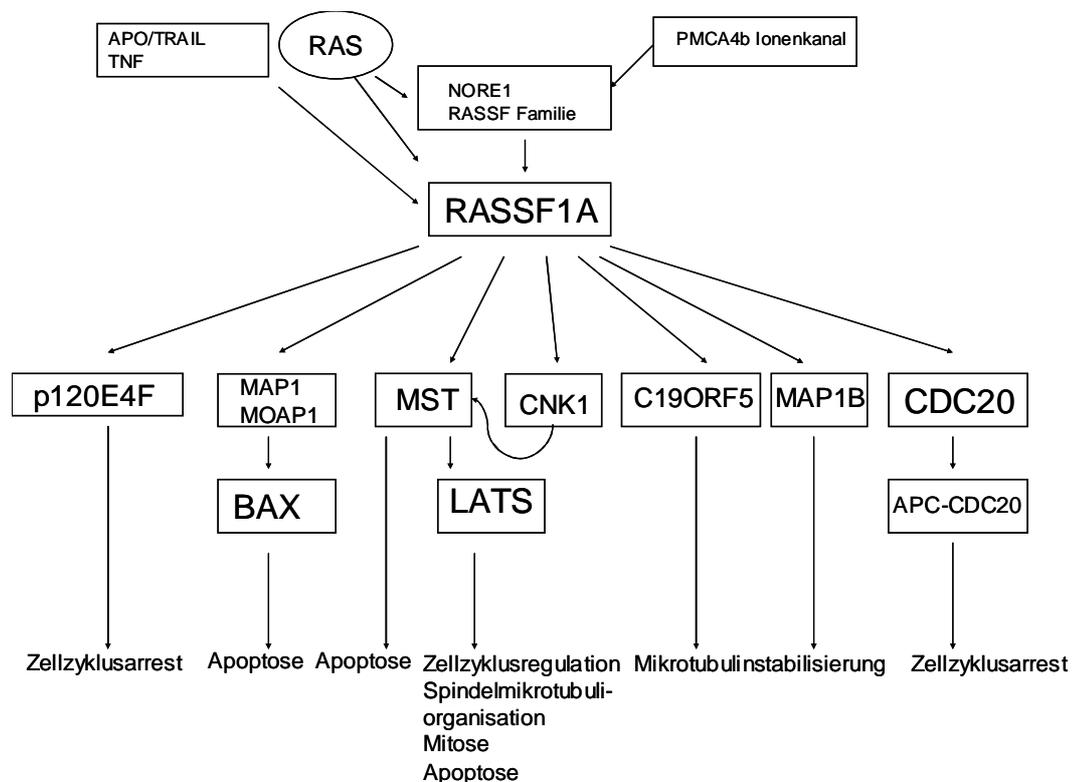


Abbildung 5. Überblick über die in der Literatur beschriebenen Interaktionspartner von RASSF1A und die Signalwege, in die RASSF1A involviert ist (Siehe Kapitel 1.1.1.7.).

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

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

## 1.2 Weichteilsarkom

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

## 1.3 Bronchialkarzinom

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

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

## 1.4 Epigenetische Inaktivierung

### 1.4.1 Epigenetische Inaktivierung als Ursache der Krebsentstehung

#### 1.4.1.1 Allgemeine Aspekte

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

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

#### 1.4.1.2 Tumorrelevante Kandidatengene

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

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

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

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

#### 1.4.2 Epigenetische Inaktivierung des Promoters von *RASSF1A*

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

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

## 1.5 Ziele der Arbeit

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

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

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

5-Aza-2'-Deoxycytidine	Sigma
Acrylamid	Merck
(Bacto)Agar	BD
Agarose	Cambrex
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ammoniumacetat	Merck
Amphotericin	Gibco
Ampicillin	Sigma
Amylose Resin	NEB
Bactopepton	BD
Bactotrypton	BD
Bactoyeastextract w/o aa	BD
BCIP/NBT	Sigma
Betain	Sigma
Borsäure	Roth
Bovine Serum Albumin	NEB
Bradford Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Cap Analog (m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G)	Ambion
Chloroform	Merck
Citronensäure-1-hydrat	Merck
Coomassie Brilliant Blau	Roth
Complete Proteinaseinhibitormix	Roche

---

Deoxycholic acid (Sodium Salt)	Sigma
DEPC-Wasser	Roth
D-Glucose	Merck
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Roth
dNTPs	Invitek
Eisessig	Merck
Ethanol	Merck/Roth
Ethanolamin	Sigma
Ethidiumbromid	Merck
Ethylenediamin Tetraacetic Acid (EDTA)	Roth
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA-Laboratories
Formaldehyd	Roth
Formamid	Serva
Geneticin (G418)	PAA-Laboratories
Giemsa-Lösung	Fluka
Glutathion (red.)	Sigma
Glutathione Sepharose™ 4B	Amersham Biosciences
Glycerol	Sigma
Glycogen	Roche
Hoechst 33342	Cambrex
Hydrochinon	Merck
Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT)	Fluka
Isopropanol	Roth
Isopropylthio-β-D-Galactosid (IPTG)	Sigma

---

Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogensulfat	Merck
Kanamycin	Sigma
Lipofectamin 2000	Invitrogen
L-Methionin, ( <sup>35</sup> S)	ICN
L-Tyrosin	Serva
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchlorid	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
Mowiol 4-88 Reagent	Merck
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
N'-N'- Bis-Methylenacrylamid	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumborhydrid	Roth
Natruimbicarbonatpuffer	Biochrom AG
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Natruimhydroxid	Merck
Nonidet P40 (NP 40)	Fluka
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Phenol	Merck

---

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglycol 4000	Serva
Propidiumiodid	Sigma
S-Adenosylmethionin (SAM)	NEB
Salzsäure	Merck
Silbernitrat	Merck
SYBR Green I	Bio Whittaker
Tris HCl	Roth
Triton X-100	Roth
Trizol	Gibco
Tryptonpepton	Difco
Tween 20	Roth
Vitrogen	Cohesion Technologies
X-Gal (S-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid)	Sigma
Xylencyanol	Merck
Yeastextract	BD
Zinksulfat-Heptahydrat	Roth

### 2.1.2 Geräte

Absaugpumpe	HLC
Autoklav	Schütt
Bilddokumentationssystem/Transilluminator	Herolab
Durchflusszytometer Calibur	BD
Elektrophoresekammern	BioRad

Heizblock	Eppendorf
Inkubatoren	Haereus
Magnetrührer MR3001	Heidolph
Mikroliterpipetten	Gilson
Mikroskope	
Axioplan10	Zeiss
Axioplan2	Zeiss
Leica DM IRB	Visitron Systems
NIKON ECLIPSE TS 100	NIKON
Wilovert S	Hund
Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System	peqlab
Mini Trans-Blot Cell	BioRad
pH-Meter, Typ CG810	Schott
<i>Phosphoscreen</i>	GE Healthcare
Phospho-und Fluoroimager	GE Healthcare
Rotor-Gene 2000	Corbett Research
Schüttelinkubator Inova (4000) Edison	New Brunswick Scientific,
Spannungsgeräte	Biorad,
Sterilbank Nuaire	Zapf
Thermocycler:	
PTC-100	MJ Research. Inc.
Robocycler	Stratagene
MasterCyclerGradient	Eppendorf
Thermomixer	Eppendorf
UV-Spektrometer GeneQuant pro	AmershamPharmacia Biotech
Vortexer	Heidolph
Waagen	Sartorius
Zentrifugen:	
Biofuge pico	Heraeus

EBA 12 R	Hettich
Megafuge 1.0 R	Heraeus
Unicen FR	Herolab

### 2.1.3 Gebrauchswaren

Filterpapier	Schleicher & Schüll
Gewebekulturschalen	TPP
Glaswaren	Schott, Jena
Küvetten	Brand
Parafilm	Brand
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastikwaren	Sarstedt, Greiner, Nalgene
Sterilfilter	Sarstedt
Transfermembran (Immobilon-P)	Millipore

### 2.1.4 Gebrauchslösungen

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit Wasser aus dem *Milli-Q-Water-System* von Millipore hergestellt

#### 2.1.4.1 Stammlösungen, Lösungen und Puffer

<u>Acrylamid/Bis (100ml)</u>	29,2 g Acrylamid
	0,8 g N`-N`-Bis-Methylenacrylamid

<u>Amylose Waschpuffer</u>	20 mM Tris pH 7,4
	200 mM NaCl
	10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
	1 mM EDTA pH 8

#### Antibiotikastammlösungen/Fungizidstammlösungen

Amphotericin	250 $\mu$ g/ml
Ampicillin	50 mg/ml

---

Kanamycin	10 mg/ml
Penecilin/Streptomycin	10000 Units/ml bzw. 10000 µg/ml
Geneticin	50 mg/ml
<u>Antifading</u>	100 mg p-Phenylendiamin in 2 ml PBS  pH 8,0 mit Carbonat-Hydrogencarbonat-Puffer einstellen und mit PBS auf 10ml auffüllen; 100 µl dieser Lösung zu je 900 µl sterilem Glycerin geben; bei -20°C aufbewahren
<u>Blotting Puffer (Western Blot) I</u>	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% v/v Methanol pH 8,3
<u>Blotting Puffer (Western Blot) II</u>	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6,5
<u>CaCl<sub>2</sub>-Mix zum Herstellen von chemisch kompetenten Zellen</u>	60 mM CaCl <sub>2</sub> 15% Glycerol 10 mM PIPES (pH 7,0)
<u>Detektion mit Flag-Antikörper, Lösungen</u>	
Blockierungslösung	3% Magermilchpulver in TBS
Waschlösung	0,05% Tween 20 in TBS

Detektion mit GST-Antikörpern, Lösungen

Blockierungslösung	5% Magermilchpulver 0,1% Tween 20 in PBS
Waschlösung	0,1% Tween 20 in PBS

Glutathion-Elutionspuffer

10 mM red. Glutathion  
50 mM Tris-HCl (pH 8)

Ladepuffer

Proteinladepuffer (6x)	0,35 M Tris HCl 10,28% w/v SDS 36% Glycerol 5% $\beta$ -Mercaptoethanol 0,012% Bromphenolblau
------------------------	---

## DNA-Ladepuffer

45% Sucrose  
20 mM TrisHCl pH 7,6  
50 mM EDTA  
0,25% Bromphenolblau  
0,25% Xylene Cyanol

Laufpuffer PAGE 10x

30,3 g Tris  
144,0 g Glycine  
10,0 g SDS  
pH 8,3  
bei 4°C lagern

Lokalisation Lösungen zur Färbung

Permeabilisationslösung	0,2% Triton X 100 in PBS
Blockierungslösung	1% Magermilchpulver in PBS

---

<u>Mowiol</u>	10 g Mowiol in 90 ml PBS lösen, Zugabe von 2,5% DABIO (1,4-Diazabicyclo[2,2,2]-octan) und 40 ml Glycerin, über Nacht rühren, bei 20.000 rpm für 30 min. abzentrifugieren, zur Aufbewahrung aliquotieren und bei -20°C einfrieren.
<u>MPB-X-Y Bindepuffer</u>	50 mM Tris pH 7,6 150 mM NaCl 0,5% NP40 8% Glycerol 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,4 mM DTT 1 mM EDTA
<u>PBS (Phosphate Buffered Saline)</u>	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,3 einstellen und autoklavieren
<u>Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol</u>	25:24:1
<u>Proteinauflösungspuffer (<i>E. coli</i>)</u>	10 ml PBS 0,1 ml PMSF (100 mM) 0,2 ml EDTA (0,5 M)
<u>Proteinextraktionspuffer (humane Zelllinien) I</u>	50 mM Tris (pH 8) 500 mM KCl

0,5 mM EDTA

0,5 mM EGTA

2 mM DTT

1 mM PMSF

Proteinextraktionspuffer (humane Zelllinien)II (zur Präzipitation mit Flag-Agrose)

50 mM Tris HCl pH 7,4

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X 100

Complete Proteinaseninhibitormix

Proteinextraktionspuffer (humane Zelllinien)III RIPA

1 x PBS

1% NP40

0,5% Sodium Deoxycholate

0,1% SDS

Complete Proteinaseninhibitormix

Silberfärbung

Fixierer

50% v/v Methanol

10% v/v Essigsäure

Waschlösung

10% v/v Ethanol

0,5% v/v Essigsäure

Färbelösung

0,1 g AgNO<sub>3</sub>/100ml H<sub>2</sub>O

Entwickler

3g/200 ml H<sub>2</sub>O

0,02 g NaBH<sub>4</sub>/200 ml H<sub>2</sub>O

---

	810 µl Formaldehyd/200 ml H <sub>2</sub> O
Stopper	0,75 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /100 ml H <sub>2</sub> O
<u>SSCP Stopper</u>	95% Formamid 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
<u>TBE-Puffer</u>	121,1 g/l Tris 51,4 g/l Borsäure 3,7 g/l EDTA pH 8,5
<u>TBS Tris Buffered Saline</u>	3,03 g/l Tris 8,76 g/l NaCl pH 7,5
<u>TBS-Tween</u>	TBS 0,1% v/v Tween 20
<u>TE</u>	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH 7,5
<u>Tris-HCl-Lösungen (PAGE)</u>	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Trenngelpuffer) 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Sammelgelpuffer)
<u>TUNEL Lösungen</u>	
Fixationslösung	3,7% Formaldehyd in PBS

Permeabilisationslösung	10 µl Natriumcitrat-Lsg. (100 mg/ml)
	10 µl Triton X-100
	989 µl H <sub>2</sub> O
DAPI Lösung	2 µl einer 10 mg/ml Stocklösung in 10 ml PBS

Zitronensäure/Tween 20 (Zellkernextraktion humane Zellen, 14 Tage haltbar)

2,1 g Zitronensäure/ 0,5 g Tween 20
100 ml H <sub>2</sub> O

2.1.4.2 Medien und Nährböden

2.1.4.2.1 Medien und Nährböden zum Kultivieren von Bakterien

<u>LB (Luria-Bertani)-Medium</u>	10 g/l Tryptonpepton
	5 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl
	1 g/l Glucose

Zum Anziehen von *E. Coli* auf Agarplatten werden zusätzlich 1,5% Agar zugegeben und nach dem Autoklavieren werden sterile Platten gegossen.

Meist ist eine Selektion durch Antibiotika erforderlich. Dazu wird in das Medium mit Agar nach dem Autoklavieren bei 60°C ein bestimmtes Volumen an Stammlsg. des jeweiligen Antibiotikums gegeben.

Ampicillin            1,2 ml einer 50 mg/ml Stammlsg. in einen Liter

Kanamycin            5 ml einer 10 mg/ml Stammlsg. in einen Liter

Um eine Blau-Weiß-Selektion von Bakterienkolonien nach Klonierungen zu erreichen, werden auf die schon fertige Platte je 40 µl IPTG (0,2 g/ml) und X-Gal (20 mg/ml) plattiert.

Die Lagerung von LB-Platten erfolgt bei 4°C.

<u>SOB</u>	20 g/l Baktotrypton
	5 g/l Baktohefeextrakt

0,5 g/l NaCl

10 ml einer 250 mM KCl

Nach dem Autoklavieren bzw. kurz vor Gebrauch werden 5 ml sterile MgCl<sub>2</sub>-Lsg. (2 M) zugegeben.

### SOC

SOB-Medium mit 20 mM Glucose, die in Form einer 2 M sterilfiltrierten Glucoselsg. zugesetzt wird.

### NZY<sup>+</sup>Broth

10 g/l NZ Amin (Caseinhydrolysat)

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

pH 7,5 (mit NaOH einstellen)

nach dem Autoklavieren werden weiterhin folgende sterile Lösungen zugegeben:

12,5 ml einer 1M MgCl<sub>2</sub>

12,5 ml einer 1M MgSO<sub>4</sub>

10 ml einer 2 M Glucose-Lsg.

(sterilfiltriert)

#### 2.1.4.2.2 Medien zum Kultivieren von humanen Zellen

Je nach Zelllinie werden die adhären wachsenden Zellen in 10 ml Medium/ 10 cm Ø Zellkulturschale kultiviert. Zu 500 ml Medium werden 50 ml FCS und 5 ml PS zugesetzt.

Verwendete Medien:	DMEM	Biochrom AG
	Optimem	Gibco
	RPMI	Biochrom AG

### 2.1.5 Sterilisation/Autoklavieren von Lösungen und Geräten

Lösungen, die keine hitzeempfindlichen Chemikalien und Stoffe enthalten, sowie Gebrauchswaren wurden bei 120°C und 10<sup>5</sup> Pascal für 20 min autoklaviert.

Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert. Die Porengröße des Sterilfilters betrug 0,22 µm.

### 2.1.6 Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandards      Lambda DNA/Hind III Marker, NEB  
Gene Ruler<sup>RT</sup> 100 bp DNA Ladder Plus, MBI Ferm.

Protein-Molekulargewichtsstandard

*Precision Protein Standard (prestained)*, Bio-Rad

### 2.1.7 Enzyme

Accutase

*Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)* MBI Fermentas

FastStart Taq DNA Polymerase 5 U/μl      Roche

M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/μl) Promega

*Pfu Turbo* DNA-Polymerase (2,5 U/μl)      Stratagene

Restriktionsendonukleasen                  New England Biolabs

RNaseA (1 mg/ml)                                  Roche

RNasin (40 U/μl)                                  Promega

T4 DNA Ligase                                      MBI Fermentas

T7 RNA Polymerase                              New England Biolabs

Taq-Polymerase                                      Invitek

Trypsin 0,5%/EDTA 0,2% (in 10 x PBS)      Biochrom AG

### 2.1.8 Antikörper

Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 *goat anti mouse* (2 mg/ml)      Invitrogen  
(Molecular Probes)

Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 *goat anti rabbit* (2 mg/ml)      Invitrogen  
(Molecular Probes)

Anti-Flag M2 (*monoclonal*, 4,6 mg/ml)                  Sigma

Anti-Flag-Affinitätsgel                                  Sigma

Anti-Human RASSF1A (0,5 mg/ml)                      eBioscience

Anti-mouse IgG alkaline phosphatase (1,4 mg/ml)      Sigma

Anti-α-Tubulin (*bovine*) *Mouse IgG* (200 μg/ml)      Molecular Probes

Anti-Phosphoserine *Rabbit Polyclonal* (0,25mg/ml)      Stressgen/Biomol

GST (B-14) sc-138 *mouse monoclonal* (200 μg/ml)      Santa Cruz

### 2.1.9 Vorgefertigte Systeme

ECF Western blotting Kit	Amersham Pharmacia
<i>In-Situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel
pGEM <sup>®</sup> -T und pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector Systems	Promega
QIAfilter <sup>™</sup> Plasmid Maxi Kit	Quiagen
QIAquick PCR Purification Kit/Nucleotide Removal Kit/Gel Extraction Kit	Quiagen
QuickChange <sup>®</sup> XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen
Thermo Sequenase <sup>™</sup> Dye Terminator Cycle Sequencing Pre-Mix-Kit	Amersham Pharmacia
TNT <sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
Wizard <sup>®</sup> DNA Clean-Up System	Promega
Wizard <sup>®</sup> <i>Plus</i> SV Minipreps	Promega

### 2.1.10 Vektoren

#### 2.1.10.1 Expressionsvektoren

##### 2.1.10.1.1 Bakterielle Expressionsvektoren

pCMVT <sub>N</sub> T <sup>™</sup>	Promega
pCR <sup>®</sup> 2.1	Invitrogen
pGEM <sup>®</sup> -5Zf(+)	Promega
pGEM <sup>®</sup> -T	Promega
pMAL-p2X	NEB

##### 2.1.10.1.2 Eukaryotische Expressionsvektoren

pcDNA3.1	Invitrogen
pCMV-Tag 1	Stratagene
pEBG	

## 2.1.10.2 Fluoreszenzvektoren

pEYFP-C2	Clontech
pEYFP	Clontech

**2.1.11 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials**

## 2.1.11.1 Bakterienstämme

Escherichia Coli	JM109	
	DH5 $\alpha$	
	XL10-Gold <sup>®</sup> Ultracompetent Cells	Stratagene
	TAM1	Activ Motif

## 2.1.11.2 Humane Zelllinien

## 2.1.11.2.1 Krebszelllinien

6/93	Leiomyosarkomzelllinie
A204	Rhabdomyosarkomzelllinie
A549	Nicht-Kleinzell-Lungenkrebszelllinie
Capan1	Pankreaskrebszelllinie
HUP-T3	Pankreaskrebszelllinie
LMS20/93	Leiomyosarkomzelllinie
LMS6-93	Leiomyosarkomzelllinie
PaCa2	Pankreaskrebszelllinie
RD	Rhabdomyosarkomzelllinie
Saos2	Osteosarkomzelllinie
SKLMS	Leiomyosarkomzelllinie
SKMEL	Melanomzelllinie
US8-93	Zelllinie eines undifferenzierten Sarkoms
ZR75-1	Brustkrebszelllinie

## 2.1.11.2.2 Weitere humane Zelllinien

HEK293	Humane embryonale Nierenzellen
HF53	Humane Fibroblasten

### 2.1.11.2.3 Weichteilsarkomproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 84 histologisch untersuchte Weichteilsarkomproben erwachsener Patienten untersucht. Diese wurden in 22 Liposarkome, 18 Leiomyosarkome, 18 *malignant fibrous histiocytomas* (MFHs), 6 Rhabdomyosarkome, 6 neurogene Sarkome, 6 synoviale Sarkome, 3 Fibrosarkome, 3 maligne Hemangiopericytome, 1 malignes Mesotheliom und nicht klassifizierte Sarkome klassifiziert. Sie wurden von der chirurgischen Klinik I der Universität Leipzig über eine Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität zur Verfügung gestellt. Die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten liegt vor und die Studie wurde durch den Ethikrat genehmigt. Das Tumormaterial wurde direkt nach der Operation in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Klassifizierung erfolgte nach dem System von van Unnik und den UICC Richtlinien (van Unnik *et al.* 1993).

### 2.1.11.2.4 RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin)-Klone

cDNA	MST1	IRAKp961C0282Q
	MST2	IRAKp961I0613Q
	WW45	IRAKp961L0427Q

### 2.1.12 Firmen

Abcam	Cambridge	Großbritannien
Active Motif	Rixensart	Belgien
Ambion	Austin	USA
Amersham Biosciences	Uppsala	Schweden
AngioTech® Bio Materials	Palo Alto	USA
AppliChem	Darmstadt	Deutschland
BD Biosciences	Erembodegem	Belgium
Biochrom AG	Berlin	Deutschland
BioRad	Hercules	USA
BioWhittaker	Walkersville	USA
Brand	Wertheim	Deutschland
Cambrex	Rockland	USA
clontech	Mountain View	USA
Cohesion Technologies	Palo Alto	USA
Corbett Research	Cambridge	Großbritannien

---

eBioscience	San Diego	USA
Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Fluka	Ulm	Deutschland
GE Healthcare	München	Deutschland
Gibco	Karlsruhe	Deutschland
Gilson	Middleton	USA
Greiner	Frickenhausen	Deutschland
Haraeus	Hanau	Deutschland
Herolab	Wiesloch	Deutschland
Hettich	Tuttlingen	Deutschland
HLC	Bovenden	Deutschland
Hund Wetzlar	Wetzlar	Deutschland
ICN	Asse-Relegem	Belgien
InViTek GmBH	Berlin	Deutschland
Invitrogen	Carlsbad	USA
Macalaster Bicknell Co.	New Haven	USA
Macherey-Nagel	Düren	Deutschland
MBI Fermentas	St. Leon-Rot	Deutschland
Merck	Darmstadt	Deutschland
Millipore	Schwalbach	Deutschland
MJ Research Inc.	Waltham	Deutschland
Nalgene	Rochester	USA
NEB	Frankfurt a. M.	Deutschland
New Brunswick Scientific	Edison	USA
NIKON	Düsseldorf	Deutschland
PAA-Laboratories	Pasching	Deutschland
Peqlab	Erlangen	Deutschland
Promega	Mannheim	Deutschland
Qiagen	Hilden	Deutschland
Roche	Mannheim	Deutschland
Roth	Karlsruhe	Deutschland

Santa Cruz	Santa Cruz	USA
Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
Sartorius	Göttingen	Deutschland
Schott	Mainz	Deutschland
Schütt	Göttingen	Deutschland
Serva	Heidelberg	Deutschland
Sigma	Steinheim	Deutschland
Stratagene	La Jolla	USA
TPP	Trasadingen	Schweiz
Visitron Systems	Puchheim	Deutschland
Whatman Schleicher Schüll	Dassel	Deutschland
Zapf	Sarstedt	Deutschland
Zeiss	Jena	Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Untersuchung epigenetischer Inaktivierung

#### 2.2.1.1 Bisulfit-Behandlung

Ca. 1-2  $\mu\text{g}$  genomische DNA wurden in 18  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen, es wurden 2  $\mu\text{l}$  einer 3M NaOH-Lösung (frisch, Endkonzentration 0,3M) zugegeben. Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, und anschließend wurden 208  $\mu\text{l}$  einer 3,6M Natrium-Bisulfit (pH 5) und 12  $\mu\text{l}$  einer 0,1 M Hydrochinonlösung zupipettiert. Bei 55°C wurden die Proben 16 h inkubiert. Eine Aufreinigung der Bisulfit-behandelten DNA erfolgte über das Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up System, die aufgereinigte DNA wurde in 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und nach Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  3M NaOH für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die DNA wurde nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Glycogen (2 mg/ml), 50  $\mu\text{l}$  Ammoniumacetat (7,5 M) und 250  $\mu\text{l}$  Ethanol bei Raumtemperatur und 13000 U/min 10 min gefällt, das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 50  $\mu\text{l}$  TE-Puffer aufgenommen.

#### 2.2.1.2 Methylation Specific PCR (MSP)

Um die Methylierung der Promoterregion eines Genes zu untersuchen, wurden sowohl methylierungsspezifische Primer als auch Primer, die eine nichtmethylierte Sequenz nach Bisulfit-Behandlung detektieren, generiert, indem die betroffenen CpGs in der Primerregion positioniert wurden.

Tabelle 1. Primersequenzen für MSPs verschiedener Promoterregionen. Mit (m) sind die methylierungs-spezifischen Primer und mit (u) die spezifischen Primer für die unmethylierte Sequenz gekennzeichnet.

Gen	m /u	Forward Primer (5`-3`)	Reverse Primer (5`-3`)
<i>RASSF1A</i>	m	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	AACCCCGCGAACTAAAAACGA
	u	TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	CAAACCCACAAACTAAAAACAA
<i>p16</i>	m	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGCGACCGTAA
	u	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA
<i>MST1</i>	m	GCGGGGCGGGTTTAGGAGGTTC	CCAATAACCCCTCACCGACGC
	u	TTTGTGGGGTGGGTTTAGGAGGTTTGT	AACCAATAACCCCTCACCAACACAACAA
<i>MST2</i>	m	CGGGAGGGAGATTCGTCGCG	AAACCGAAACACCGACCGACCG
	u	TTTTAAGTGGGAGGGAGATTGTGTGG	AAAAACCAAAACACCAACCAACCAAAACC
<i>WW45</i>	m	GATAGTCGTAGTTCGGCGGGGAC	GCAACGCGAACC GCCG
	u	TGAGGATAGTTGTAGTTTGGTGGGGAT	AAAAACTCAACACAACACAACCAACCA
<i>LATS1</i>	m	GAACGATTAGAGTTGCGGGCGAC	AACATTTCCCGACGTCGCTTACG
	u	TGAATGATTAGAGTTGTGGGTGATGT	AAACATTTCCCAACATCACTTACACA
<i>LATS2</i>	m	TTCGTTCCGATTGGTATGCGGTC	CCATCTTCCCGAAACGCTCACG
	u	GGTGTTTTGTGGATTGGTATGTGGTT	CATCTTCCCAAAACTCACACCACA
<i>ER<math>\alpha</math></i>	m	GATACGGTTTGTATTTGTTTCGC	AACGATTCAAAAACCTCCAACCTCG
	u	GGATATGGTTTGTATTTGTTTGT	AACAATTCAAAAACCTCCAACCTCA

Tabelle 2. PCR-Bedingungen für MSP verschiedener Promoterregionen. Mit (m) sind die methylierungs-spezifischen Primer und mit (u) die spezifischen Primer für die unmethylierte Sequenz gekennzeichnet.

Gen	m/u	Produkt in bp	T <sub>m</sub> in °C	Zyklen
<i>RASSF1A</i>	m	93	60	34
	u	105	60	33
<i>p16</i>	m	150	65	38
	u	151	60	38
<i>MST1</i>	m	120	63	38
	u	125	63	40
<i>MST2</i>	m	99	59	39
	u	108	61	40
<i>WW45</i>	m	116	62	40
	u	131	62	40
<i>LATS1</i>	m	125	60	40
	u	125	60	40
<i>LATS2</i>	m	150	60	40
	u	150	60	40
<i>ER<math>\alpha</math></i>	m	159	55	38
	u	161	53	38

Lag eine Methylierung vor, so wurde diese methylierten Cytosine im CpG Kontext durch die Bisulfit-Behandlung nicht in Thymin umgewandelt, die Cytosine blieben erhalten und die methylierungsspezifischen Primer konnten binden. Lag keine Methylierung der Region vor, wurden die Cytosine zu Thyminen umgewandelt. Die Primer, die spezifisch an die unmethylierte Sequenz binden, gaben ein Produkt in der PCR. 100 ng Bisulfit-behandelter DNA wurden in einem 25 µl Reaktionsansatz, der 0,2 mM dNTP-Mix, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol jedes Primers und Taq-Polymerase (2 U) enthielt, amplifiziert und die Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Promoterregionen der Gene *RASSF1A* (Schagdarsurengin *et al.* 2002), *p16* (Herman *et al.* 1996), *MST1*, *MST2*, *WW45*, *LATS1*, *LATS2* und *ERα* (Liu *et al.* 2005) mit MSP untersucht. Die Primersequenzen, die jeweiligen PCR-Bedingungen wie *Annealing* Temperaturen sowie die Produktgröße wurden in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt. Zur Kontrolle wurden je eine unmethylierte Probe und eine *in vitro* methylierte (Siehe 2.2.1.4) Probe mitgeführt.

### 2.2.1.3 Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

Nach Bisulfit Behandlung der DNA erfolgte die Amplifikation des zu untersuchenden DNA Fragmentes in einem 25 µl Ansatz, der 0,2 mM dNTP-Mix, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol jedes Primers und Taq-Polymerase (2 U) enthielt. Eingesetzt wurden 100 ng genomischer bisulfitbehandelter DNA. Von Vorteil war es bei schlechter Amplifikation, eine zweite PCR (*seminested* oder *nested*) durchzuführen, bei der als Template Produkt aus PCR 1 genutzt wurde. Die PCR Produkte wurden nach Analyse in einem 2%igen Agarose Gel mit einem Enzym (z.B. TaqI; Schnittstelle 5`TCGA`3) geschnitten, dass das zu untersuchende CpG in der Erkennungssequenz trug. Lagen die Cytosine unmethyliert vor, so erfolgte in der Bisulfitbehandlung der DNA die Umwandlung zu Thymidinen, die Restriktionsschnittstelle ging verloren. Blieben die Cytosine jedoch erhalten, d.h. war das entsprechende Cytosin methyliert, so wurde es vom Enzym geschnitten und im 2%igen Agarosegel wurden die Restriktionsfragmente analysiert.

Tabelle 3. Primersequenzen für COBRA-PCR für Promoterregionen der Gene *MLH1* und *MSH2*

Gen	Semi-nested	Forward Primer (5`-3`)	Reverse Primer (5`-3`)
<i>MLH1</i>	PCR1	GTAAGGGGAGAGGAGTTTGAGAAG	ACCTTCAACCAATCACCTCAATACCTC
	PCR2		CATCCAACCCACCCTTCAAC
<i>MSH2</i>	PCR1	GTAGTTTTGGAAGTTGATTGGGTGTGGT	ACCCATATACTTAATCACCCCTAAAT
	PCR2	GGGAAATAGTTTAGTGGGTGTGGGT	

Mittels COBRA wurden im Rahmen dieser Arbeit die Promoterregionen der Gene *MLH1* und *MSH2* untersucht. Die Primersequenzen, PCR Bedingungen und Restriktionsenzyme wurden in Tabelle 3 und Tabelle 4 zusammengefasst. Zur Kontrolle wurden je eine unmethylierte und eine *in vitro* methylierte (Siehe 2.2.1.4) Probe mitgeführt.

Tabelle 4. PCR-Bedingungen für COBRA-PCRs für Promoterregionen der Gene *MLH1* and *MSH2*

Gen	PCR1/2	Produkt in bp	T <sub>m</sub> in °C	Zyklen	Enzym (NEB)	Schnittprod. in bp
<i>MLH1</i>	1	368	59	20		
	2	308	59	39	Taq I	120, 188
<i>MSH2</i>	1	340	60	20		
	2	270	60	39	HpyCH4IV	95, 175

#### 2.2.1.4 *In vitro* Methylierung von DNA

Zu Kontrolle von COBRA und MSP Reaktionen wurden je eine unmethylierte und eine methylierte DNA mitgeführt. Die methylierte Kontrolle wurde mit Hilfe des Enzyms Sss I (CpG) Methylase (NEB) hergestellt. Zu 20 µg genomischer DNA (z.B. aus HF53) wurden 20 µl NEBuffer 2, 1 µl S-adenosylmethionine (SAM, 160 µM) und 15 µl Sss I (CpG) Methylase (4 U/ µl) zugegeben. Der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf 200 µl aufgefüllt. Über Nacht erfolgte eine Inkubation bei 37°C im Wasserbad, wobei nach 2-3 h ein weiterer µl SAM zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurden 100 µl TE-Puffer zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend mit 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Nach 3 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte die Zugabe von 300 µl Chloroform und nach kräftigem Mischen die Zentrifugation für 3 min bei 13000rpm. Die obere Phase wurde abgenommen, mit 30 µl Natriumacetat (3M, pH 5,2) und 750 µl Ethanol wurde die DNA durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min gefällt. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wurde es in 40 µl TE aufgenommen, je 4 µl des Ansatzes wurden für eine Bisulfit Behandlung eingesetzt.

#### 2.2.1.5 Analyse der Expression in epigenetisch inaktivierten Tumorproben und in Zelllinien ohne und nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidine

Zur Analyse der Expression von *RASSF1A* in der Rhabdomyosarkomzelllinie RD, die einen hypermethylierten *RASSF1A* Promoter trug, und der Expression von *MST1* in der Leiomyosarkomzelllinie SKLMS, die einen hypermethylierten *MST1* Promoter aufwies, wurde die Gesamt-RNA mit Trizol isoliert und die Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Diese beiden Zelllinien wurden zusätzlich vier Tage mit 5 µM bzw. 10 µM 5-Aza-2'-Deoxycytidine behandelt und es wurde ebenfalls RNA isoliert. Zusätzlich wurde aus Tumormaterial, das eine Methylierung im entsprechenden Promoter aufwies, RNA isoliert. 1 µg RNA wurde in einem 20 µl Ansatz eingesetzt, der 0,9 mM dNTP-Mix, 20 pmol eines oligo dT Primers, 20 Units RNasin (Promega), 100 Units AMV-Reverse Transkriptase (Promega) enthielt, für eine Stunde bei 42°C inkubiert, es erfolgte ein Umschreiben der mRNA in cDNA. Für die quantitative PCR zur Untersuchung der Expression von *RASSF1A* wurden 2 µl des RT-Ansatzes in 25 µl eingesetzt, 0,2 mM dNTP-Mix, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol der Primer L27111 (5'TCCTGCAAGGAGGGTGGCTTC`3) und HeU2αβ

(5`GGCTGGGAACCCGCGGTG`3) und FastStart Taq DNA Polymerase (2 U) wurden zugegeben. Die Annealing Temperatur betrug 60°C und es wurde in 33 Zyklen amplifiziert (Schagdarsurengin *et al.* 2002). Bei Analyse durch *real-time*-RT-PCR wurde dem Reaktionsansatz 0,2x SYBR Green zugesetzt. Die gleichen PCR Bedingungen galten für die RT-PCR zur Expressionsanalyse von *MST1*, die Primer MST1FW (5`CATGCAGCCTGCGAAACCATCC`3) und MSTRW (5`TGGGGTCCAGGGCCAAGAGC`3) wurden in 27 Zyklen zur Amplifikation eingesetzt. Die Analyse erfolgte über 2%ige Agarosegele bzw. bei *real-time*-RT-PCR in einer komparativen Auswertung. Zur Kontrolle wurde eine *real-time*-RT-PCR durchgeführt, die die Expression des Gens *GAPDH* analysierte und damit den mRNA Gehalt verifizierte. Verwendet wurden dazu die Primer LGAP535 (5`GACCTTGGCCAGGGGTGCTA) and UGAP389 (5`TGGAGAAGGCTGGGGCTCAT) bei einer *Annealing* Temperatur von 60°C.

### 2.2.2 Mutationssanalyse mittels SSCP

In Weichteilsarkomen wurde die Mutationsrate verschiedener Gene in bestimmten Codons mittels *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) Analyse im Polyacrylamidgel untersucht. Dabei wurde die Mutationsraten des Codons 133 des Gens *RASSF1A* (Schagdarsurengin *et al.* 2005), des Codons 600 des Gens *B-RAF* (Davies *et al.* 2002) und des Codons 12 von *K-RAS* (Dammann *et al.* 2003) ermittelt.

#### 2.2.2.1 PCR zur Amplifikation von *RASSF1A*, *B-RAF* und *K-RAS* Fragmenten

100 ng genomischer DNA wurde in einem 25 µl Ansatz, der 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 10 pmol der jeweiligen Primer und Taq Polymerase (2 U) enthielt, amplifiziert (Tabelle 5, Tabelle 6). Bei der Amplifikation des Abschnittes von *K-RAS* wurde eine weitere PCR durchgeführt, bei der das Produkt aus der ersten PCR als Template diente und ein Primer ausgetauscht wurde (*seminested*). Die Amplifikation wurde in einem 2% Agarosegel kontrolliert. In Tabelle 5 und Tabelle 6 wurden die Primersequenzen und PCR-Bedingungen zusammengestellt. Als Kontrollen dienten für die SSCP von *RASSF1A* genomische DNA aus Blut von heterozygoten Trägern des Polymorphismus im Codon 133, für die SSCP von *B-RAF* die Melanomzelllinie SKMEL und für die SSCP von *K-RAS* die Pankreaskrebszelllinien PaCa2, Capan1 und HUP-T3.

Tabelle 5. Primersequenzen für PCRs zur Amplifikation vor SSCP-Analyse

Gen		Forward Primer (5`-3`)	Reverse Primer (5`-3`)
<i>RASSF1A</i>		ACGAGCCTGTGGAGTGGGAG	AGAGGTTGCTGTTGATGTGGGC
<i>B-RAF</i>		TCATAATGCTTGCTCTGATAGGAAAA	GTAAGTCAGCAGCATCTCAGGG
<i>K-RAS</i>	PCR1	CCTTATGTGTGACATGTTCTAATATA	CGTCCACAAAATGATTCTGAATTAGCTGTA
	PCR2	GTCAC	TC AGGCCTGCTGAAAATGAC

Tabelle 6. PCR Bedingungen der PCR-Amplifikationen vor SSCP-Analyse

Gen		Produkt in bp	T <sub>m</sub> in °C	Zyklen	Formamid in %
<i>RASSF1A</i>		93	58	28	6
<i>B-RAF</i>		243	55	27	-
<i>K-RAS</i>	PCR1	156	60	20	4
	PCR2	104	57	30	8

#### 2.2.2.2 Aufarbeitung des PCR Produktes

Die PCR Produkte wurden mit Natriumacetat und Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung des Pellets in 2 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach Lösung der DNA wurden 8 µl SSCP Stopper (Siehe 2.1.4.1) zugesetzt. Der Ansatz wurde 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert.

#### 2.2.2.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Je 5 µl des denaturierten Ansatzes wurden auf ein Polyacrylamidgel geladen. Für ein 15% PAGE Gel wurden 5 ml Acrylamid/Bis (30%)-Lösung, 1 ml 10 x TBE, 3,9 ml H<sub>2</sub>O, 70 µl APS und 10 µl TEMED vermischt und das Gel wurde gegossen. Die Laufbedingungen variierten stark für die Auftrennung der verschiedenen Produkte. Sie wurden in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7. SSCP Laufbedingungen der PAGE

Gen	Acylamid/Bis in %	Spannung in V	Zeit in min
<i>RASSF1A</i>	16	350 (4°C)	90
<i>B-RAF</i>	17	200 (4°C)	225
<i>K-RAS</i>	15	200	120

#### 2.2.2.4 Silberfärbung der Acrylamidgele

Nach Auftrennung der Fragmente im SSCP-PAGE Gel, wurde das Gel 10 min im Fixierer inkubiert, 2 x 5 min mit Waschlösung gewaschen und 10 min in der Färbelösung belassen. Die Entwicklung (Entwickler) erfolgte so lange, bis die Banden deutlich und stark sichtbar waren, dann wurde die Färbung in der Stopperlösung abgebrochen. Die Zusammensetzungen der Lösungen wurden in Kapitel 2.1.4.1 beschrieben.

### 2.2.3 Funktionelle Untersuchungen zur Funktion von RASSF1

#### 2.2.3.1 Mutagenesen zur Veränderung von RASSF1

Um die Auswirkung von bestimmten Aminosäuren und Domänen von RASSF1A und RASSF1C auf die Funktionsfähigkeit zu untersuchen, wurden mit Hilfe des QuickChange<sup>®</sup> XL Site-Directed Mutagenesis Kit Aminosäuren ausgetauscht und Domänen deletiert. Als Grundlage wurden die Konstrukte pCMV-Tag1-RASSF1A und

pCMV-Tag1-RASSF1C genutzt. In Tabelle 8 wurden die Primersequenzen zur Mutation bzw. Deletion von Domänen von RASSF1A aufgeführt.

Tabelle 8. Primersequenzen zum Einfügen von Mutationen/Deletionen in RASSF1A

Mutation/ Deletion	Codon/Domäne	Primer (5`-3`)
52	CAC→CAA	CCCTGGCCGTGGCCAA CGCTTCCAGCCC
53	CGC→TGC	GGCCGTGGCCACTGCTTCCAGCCCGCG
90	CAC→CAG	GCAAGTTCACCTGCCAGTACCGCTGCCGC
131	TCT→TTT	GGGAGACACCTGACCTTTTCAAGCTGAGATTGAGC
132	CAA→GCA	GGGAGACACCTGACCTTCTG CAGCTGAGATTGAGC
133	GCT→TCT	GGAGACACCTGACCTTCTCAATCTGAGATTG
203	TCC→TTC	GTCAGGCGCCGCACTTTC TTTTACCTGCC
246	GAG→AAG	CGCAAGTTTGCACCTCTTTAAGCGCGCTGAGC
257	CGG→CAG	GCCAAGTGTACTTG CAGAAGCTGTTGGATGATGAGC
DelC1	Deletion der C1-Domäne	GGGCCCCGGGACCAGATCTGGGAACCCGCGG
DelC1ATM	Deletion der C1- und ATM-Domäne	GGAGTACAATGCCCAGATCTACAGCAACCTCTTC
DelSARAH	Deletion der SARAH-Domäne	AGGAAAATGACTCTGGGCCCCTGGGTGACCTCT
RASSF1F	Spleißvariante	GGCCTGCAGTGCGCGGACGAGCCTGTGGAGTGG

Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung verifiziert. Bei der Deletion der C1- bzw. C1-ATM-Domänen wurde durch die Mutagenese eine Schnittstelle eingefügt. Die entsprechenden Plasmide wurden mit der Restriktionsendonuklease BglII geschnitten und religiert, um die Domänen zu deletieren. Zur Deletion der SARAH-Domäne und für die Generierung von RASSF1F wurden Primer kreiert, die die Deletion der entsprechenden Fragmente während der PCR-Reaktion verursachten. Nach erfolgter Mutagenese bzw. Deletion wurden die Ansätze in XL10-Gold E.Coli transformiert und aus Einzelkolonien Minipreps angeimpft. Aus den Übernachtskulturen wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit die Plasmid DNA isoliert und der Erfolg der Mutagenese durch Sequenzierung verifiziert. Unter Verwendung des QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit wurde eine hochkonzentrierte, für die Transfektion in humane Zellen geeignete Plasmidlösung aus E.Coli isoliert und die DNA Konzentration spektralphotometrisch bestimmt.

### 2.2.3.2 Transfektion in humane Zelllinien

Zur Transfektion einer 10 cm Ø Zellkulturschale wurden 8 µg Plasmid DNA in 1,5 ml Optimem gelöst. 25 µl Lipofectamin 2000 wurden in 2 ml Optimem aufgenommen. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lösungen vereinigt und wiederum für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der zu transfizierenden Zellen wurde abgesaugt und die Zellkulturschale mit den Zellen wurde mit 5 ml PBS gewaschen. Die DNA-Lipofectamin 2000-Optimem Lösung wurde auf

die Schale gegeben und 6 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Optimum abgesaugt und frisches Medium (zellabhängig) zugegeben.

#### 2.2.3.2.1 Transiente Transfektion

Experimente, Proteinisolation oder eine Untersuchung am Mikroskop erfolgten zwei bis drei Tage nach der Transfektion.

#### 2.2.3.2.2 Stabile Transfektion

Nach erfolgter Transformation wurde zur Zellkulturschale mit A549 Zellen Geneticin (Endkonzentration 1 mg/ml) zugegeben. Das verwendete Plasmid pCMV-Tag1 trug eine entsprechende Antibiotikaresistenz, so dass nur Zellen, die transformiert wurden, auswachsen konnten. Es erfolgte eine Koloniebildung aus den transformierten Zellen, nach 3-4 Wochen unter Selektion wurden die Kolonien gepickt und in je ein Well einer 6-Well-Schale überführt und wiederum unter Selektion gehalten. Klone die auswachsen wurden weiter kultiviert, es erfolgte eine RNA Isolation und jeder Klon wurde eingefroren.

##### 2.2.3.2.2.1 RNA Isolation und RT-PCR zur Kontrolle der stabilen Expression

Zur RNA Isolation aus transformierten A549 Zellen wurden die Zellen in 500 µl Trizol aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wurde der Ansatz kräftig geschüttelt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 min bei 4°C, woraus eine deutliche Phasentrennung resultierte. In der unteren, organischen Phase befanden sich die Proteine, in der oberen, wässrigen Phase die RNA, die Zwischenphase bildete die DNA. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 250 µl Isopropanol und Zentrifugation bei 10000 rpm für 10 min bei 4°C gefällt. Nachdem das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen wurde und nach Trocknung des Pellets, wurde es in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die RNA Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt.

1 µg RNA wurden in der reversen Transkriptionsreaktion in cDNA umgeschrieben. Der 20 µl Reaktionsansatz enthielt 0.9 mM dNTP-Mix, 20 pmol eines oligo dT Primers, 20 Units RNasin und 100 Units AMV-Reverse Transkriptase und wurde für 1 h bei 42°C inkubiert. Für die quantitative PCR zur Untersuchung der Expression der entsprechenden Konstrukte wurden 2 µl des RT-Ansatzes in 25 µl eingesetzt, 0.2 mM dNTP-Mix, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 M Betain, 20 pmol der Primer FlagF (5'TGGATTACAAGGATGACGACG'3) und L27111 (5'TCCTGCAAGGAGGGTGGCTTC'3) und Taq Polymerase wurden zugegeben. Die Annealing Temperatur betrug 60°C und es wurde in 35 Zyklen amplifiziert. Die PCR Produkte wurden in einem 2%igem Agarosegel analysiert.

### 2.2.3.3 Proliferationsuntersuchungen

#### 2.2.3.3.1 Aufzeichnen von Wachstumskurven

Die stabil transfizierten Zelllinien wurden auf Unterschiede in der Proliferationsrate untersucht. Dazu wurden je 150000 Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte gesät, es wurden je 6 Wells pro Klon angesetzt. Alle 24 h wurden die Zellen eines Wells abtrypsiniert und die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen des jeweiligen Wells wurden verworfen und am nächsten Tag ein weiteres Well zur Bestimmung genutzt. Zum Aufzeichnen von Wachstumskurven in zinkfreiem Optimum, wurde dem Medium 1% FCS zugesetzt und zur Kontrolle der Auswirkung von Zinkionen 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Zinksulfat (Stocklösung 100  $\mu$ M) zugesetzt.

#### 2.2.3.3.2 Wachstum in weichem Agar

In 6 cm  $\varnothing$  Zellkulturschalen wurde eine Agarose-Nährmedium-Unterschicht gegossen, die ein Anwachsen der Zellen an der Zellkulturschale verhindern sollte. Dazu wurden für 5 Platten 9,2 ml Medium (für A549 DMEM, vorgewärmt auf ca. 70°C), 2,5 ml 3% Agaroselösung (ca. 70-80°C), 1,6 ml FCS, 1,12 ml Geneticin, 140  $\mu$ l Penicillin/Streptomycin (PS) Lösung und 140  $\mu$ l Amphotericin (AP) gemischt und zügig je 3 ml pro Platte gegossen. Zum Giessen der Oberschicht, die die Zellen enthalten sollte, wurde zunächst für wieder 5 Ansätze 4,88 ml Medium, 1,6 ml FCS, 560  $\mu$ l Geneticin, 80  $\mu$ l PS, 80  $\mu$ l AP gemischt und im Wasserbad auf ca. 60°C vorgewärmt. Je 5000, 10000 und 20000 Zellen wurden in Reaktionsgefäße vorgelegt, 0,8 ml heiße 3% Agaroselösung wurde zum Nährmediumgemisch gegeben und durchmischt. Je 1,5 ml des Agarose-Nährmedium-Gemisches wurden zu je einem Zellansatz gegeben und nach erneutem Mischen wurde die Oberschicht gegossen. Im weichen Agar wurde das Wachstum der Zellen ohne Zell-Zell-Kontakte über 4-5 Wochen analysiert. Die Kolonien wurden durch Anfärbung über Nacht mit Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT, 5 mg/ml, 400  $\mu$ l/Schale) sichtbar gemacht. Die Bestimmung der Koloniegröße erfolgte am Mikroskop LEICA DMIRB mit Hilfe des Programmes MetaVue (Molekular Devices GmbH, München, Deutschland). Es wurden pro Ansatz 25 Kolonien vermessen.

#### 2.2.3.4 Migrationsverhalten

Um die Auswirkung einer stabilen Transfektion von RASSF1A und mutagenisierten Varianten von RASSF1A in A549 hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens zu untersuchen, wurden die Zellen in eine dreidimensionale, künstliche Kollagenmatrix gegossen und die Migrationsgeschwindigkeit über 2 Tage mit Hilfe einer Zeitraffer videomikroskopischen Aufnahme beobachtet. Der Reaktionsansatz bestand aus 50  $\mu$ l Medium (DMEM), 25  $\mu$ l Bicarbonatpuffer und 375  $\mu$ l Vitrogen (enthält aufgereinigtes, natives Kollagen). 66  $\mu$ l dieses Mix wurden zu 33  $\mu$ l Zellsuspension gegeben, wobei die Ablösung der Zellen zuvor mit Accutase (schonendes Gemisch aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen) erfolgte. Diese Ansätze wurden bei 4°C gekühlt und unter

sterilen Bedingungen angesetzt. In eine Migrationskammer bestehend aus Objektträger und Deckgläschen, das durch ein Paraffin/Vaseline-Gemisch auf dem Objektträger befestigt wurde, wurde das Zell-Kollagen-Gemisch gegossen und zum Erstarren 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Migrationskammer wurde anschließend mit DMEM aufgefüllt und mit dem Paraffin/Vaseline-Gemisch abgedichtet. Die Migration der Zellen wurde bei 37°C unter dem Mikroskop (NIKON, ECLIPSE TS 100) bei 10facher Vergrößerung für 2 Tage verfolgt, wobei durch das Programm Multitrack 4.2 (Mediquant, Halle, Deutschland) alle 10 min eine Aufnahme gemacht wurde.

#### 2.2.3.5 Bestimmung der Apoptoserate mittels TUNEL

Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte 1-2 Tage nach transienter Transfektion von verschiedenen Plasmiden in A549 mit Hilfe des *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red*. Eine Eigenschaft apoptotischer Zellen, nämlich die Fragmentierung der DNA wurde genutzt, um diese Zellen sichtbar zu machen. Dabei wurden an die Fragmentenden durch die *Terminal deoxynucleotidyl transferase* rot fluoreszierende Nucleotide gekoppelt, die Zellen waren durch rote Färbung am Fluoreszenzmikroskop erkennbar. Die Zellen wurden nach Ablösung von der Zellkulturschale auf Objektträger zentrifugiert und mit 3,7% Formaldehyd (in PBS) für eine Stunde fixiert. Anschließend wurde 2 x mit PBS gewaschen. Die Permeabilisationslösung (4°C) wurde auf die Zellen gegeben und für 2 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde das Enzym/Labelling-Gemisch (vor Zugabe gründlich durchmischt) bestehend aus je 22,5 µl Reagenz 2 (enthält das Fluoreszenz markierte Nucleotidgemisch in Reaktionspuffer) und 2,5 µl Reagenz 1 (enthält die *Terminal deoxynucleotidyl transferase*) auf je einen aufzentrifugierten Zellspot, der ca. 15000 Zellen enthält, pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Anschließend wurde 2 x mit PBS gewaschen, die DAPI Lösung auf die Zellen gegeben und für 5 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Objektträger getrocknet und mit *Antifading* und einem Deckgläschen bedeckt. Die Analyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan 2). Es wurden ca. 1000 Zellen pro Ansatz ausgewertet.

#### 2.2.3.6 Medikamenteninduzierte Apoptose

##### 2.2.3.6.1 Behandlung transient transfizierter Zellen mit Nocodazol

Die Zelllinien HEK293 und A549 wurden mit YFP-RASSF1A-Konstrukten transient transfiziert und nach einem Tag 1 h mit 20 µM Nocodazol behandelt. Anschließend wurden die Zellen, die auf Deckgläschen kultiviert worden waren fixiert und wie in 2.2.3.7. beschrieben mit Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern und DAPI gefärbt. Mit Nocodazol behandelte Zellen wurden mit unbehandelten Zellen am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan 2) verglichen und ausgewertet.

#### 2.2.3.6.2 Behandlung der stabil transfizierten Klone mit Paclitaxel

Die stabil transfizierten Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und 18 h mit 0,1  $\mu$ M Paclitaxel (Stamlösung: 1 mg/ml DMSO) inkubiert. Anschließend wurde mit PBS gewaschen und die Zellen wurden mit 70% Ethanol 1h fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden mit 1 mM Hoechst 33342 in PBS 30 min die Zellkerne gefärbt. Es wurde gründlich mit PBS gewaschen und mit Antifading wurden die Deckgläschen auf Objektträger gebettet. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan 2), ca. 1000 Zellkerne wurden ausgezählt.

#### 2.2.3.7 Lokalisationsuntersuchungen

Zur Untersuchung der Lokalisation von RASSF1A, RASSF1C, RASSF1F und mutagenisierter Formen wurden die Konstrukte in den Vektor pEYFP-C2 kloniert bzw. darin mutagenisiert. Diese Konstrukte wurden transient in A549 transfiziert, die zuvor auf Deckgläschen angewachsen waren. 1-2 Tage nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 15 min in 3,7% Formaldehyd Lösung (in PBS) fixiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Permeabilisationslösung zugegeben, für 20 min inkubiert und 3 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen in Blockierungslösung 15 min abgesättigt. Es erfolgte die Antikörperkolorierung gegen  $\alpha$ -Tubulin, wobei der erste Antikörper *anti- $\alpha$ -Tubulin (bovine) Mouse IgG 1: 200* in Blockierungslösung verdünnt wurde. Je 100  $\mu$ l pro Deckgläschen wurden aufgetragen. Die Inkubation erfolgte 45-60 min bei Raumtemperatur, anschließend wurde 3 x mit Blockierungslösung gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper *Alexa Fluor<sup>®</sup> goat anti mouse IgG* wurde 1: 250 verdünnt in Blockierungslösung eingesetzt, wobei wiederum 100  $\mu$ l pro Deckgläschen zugegeben wurden. Auch hier erfolgte die Inkubation über 45-60 min jedoch im Dunkeln. Nach einem Waschschrift mit Blockierungslösung wurde 2 x mit PBS gewaschen und anschließend die DAPI Färbung durchgeführt. Nachdem 3 x mit PBS gewaschen wurde, wurden die Deckgläschen mit je einem Tropfen Mowiol verkehrt herum auf einen Objektträger gelegt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan 2).

#### 2.2.3.8 Interaktionsstudien

Um Interaktionen von RASSF1A mit anderen Proteinen darzustellen, wurde ein *in vitro* System und ein *in vivo* System genutzt.

##### 2.2.3.8.1 Interaktionsstudien im *in vitro* System

Zur Untersuchung der Interaktion von RASSF1A und K-RAS wurde das *TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate System* genutzt. Dabei wurde RASSF1A radioaktiv markiert und in einem Präzipitationsansatz mit MPB und MPB-K-RAS auf Interaktion untersucht.

#### 2.2.3.8.1.1 mRNA Synthese und Aufreinigung

RASSF1A wurde in den Vektor pCMV<sub>N</sub>T<sup>TM</sup> (Promega) kloniert und das Konstrukt wurde mit der Restriktionsendonuklease BamH1 linearisiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Ethanol Fällung. Das Pellet wurde in DEPC- H<sub>2</sub>O aufgenommen. In einem 50 µl Reaktionsansatz, der je 0,5 mM ATP, CTP und UTP, 50 µM GTP, 0,5 mM Cap Analog (m7G(5')ppp(5')G, Ambion), 5 x BSA, 150 Units T7 RNA Polymerase, 60 Units RNasin und 1 x RNAPol Reaktionspuffer enthielt, wurde RNA von 2,5 µg linearisiertem Vektor synthetisiert. Die Inkubation erfolgte 90 min bei 37°C. Zum 50 µl Ansatz wurden 100 µl TE, 700 µl Trizol und 70 µl Chloroform gegeben, es wurde stark durchmischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 14000 U/min bei 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit einem Volumen Isopropanol gefällt 10 min auf Eis gefällt. Der Ansatz wurde erneut 20 min bei 14000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 20 Units RNasin aufgenommen. Die Effizienz der RNA-Synthese wurde in einem 1% Agarosegel verifiziert.

#### 2.2.3.8.1.2 In vitro Translation mit radioaktiver Markierung durch <sup>35</sup>S-Methionin

Zur *in vitro* Translation von radioaktiv markiertem Protein wurde der TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate System Kit eingesetzt. Der 50 µl Reaktionsansatz enthielt 33 µl *Rabbit Reticulocyte Lysate*, 1 µl Aminosäuremix (1 mM) ohne Methionin, 3 µl <sup>35</sup>S-Methionin (10 mCi/ml), 1,4 µl KCl-Lösung, 20 Units RNasin und 10 µl der synthetisierten RNA. Es wurde 90 min bei 30°C inkubiert und anschließend wurden 5 µl des Ansatzes denaturiert und in Proteinladepuffer aufgenommen. In einem 10% Polyacrylamidgel wurde die Probe aufgetrennt, das Gel wurde anschließend getrocknet. Auf einem *Phosphoscreen* wurde die radioaktive Strahlung visualisiert und mit dem Phospho- und Fluoroimager ausgewertet.

#### 2.2.3.8.1.3 Expression und Aufreinigung von in *E.Coli* exprimierten MPB-Fusionsproteinen

K-RAS wurde in den Vektor pMAL-p2X kloniert. In LB (100 µg/ml Ampicillin) wurde eine 10ml Übernackkultur der *E.Coli* Stämme, die pMAL-p2X allein und pMAL-p2X-K-RAS trugen, angeimpft, die am nächsten Tag in eine 50 ml Kultur überimpft wurde. Hatte diese Kultur eine OD von 0,9 erreicht, wurde mit 24 µl IPTG (0,5 M) induziert. Nach 5-6 h Wachstum wurden die *E.Coli* durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde in 2,5 ml PBS (0,5 M EDTA, 0,1 M PMSF) aufgenommen. Zur Kontrolle der Expression wurden während des Wachstums alle 2 h 2 ml Probe entnommen, abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl PBS (0,5 M EDTA, 0,1 M PMSF) aufgenommen. Der Aufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung bei 4°C.

100 µl Proben: 3 x 30 sek Pulsstufe 1 bei 40% und je 30 sek. Pause

2,5 ml Proben: 3 x 1 min Pulsstufe 1 bei 60% und je 1 min Pause

Anschließend wurde 1% Triton X 100 zugegeben und 1 h unter Schütteln bei 4°C inkubiert, zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand wurde aliquotiert eingefroren. Die Gesamtproteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. 20 bis 50 µg Gesamtprotein wurden in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung visualisiert.

Die Aufreinigung der MPB-Proteine erfolgte mit Hilfe der Amylose *Resin*, die jedoch zuvor mit Amylose Waschpuffer gewaschen werden musste. Zu 200 µl Gesamtproteinlösung wurden je 15 µl Amylose *Resin* gegeben und bei 4°C unter Schütteln 1 h inkubiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C, 3000 U/min für 3 min. Es wurde anschließend 3 x mit je 400 µl Amylose Waschpuffer und 1 x mit 200 µl MPB-X-Y Bindepuffer gewaschen.

#### 2.2.3.8.1.4 Bindungsassay

Zum Säulenmaterial, dass die MPB-Proteine gebunden hatte (2.2.3.8.1.4.), wurden 200 µl MPB-X-Y Bindepuffer und 10 µl des *in vitro* Translationsansatzes (2.2.3.8.1.2.), der das radioaktiv markierte Protein enthielt, gegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 4°C unter Schütteln für 1 h. Nach Zentrifugation für 3 min bei 3000 U/min bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und das Säulenmaterial 5 x mit Amylose Waschpuffer gewaschen. 8 µl Proteinladepuffer wurden zum Säulenmaterial gegeben und der Ansatz wurde 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte im 10% PAGE-Gel und nach Trocknung des Gels wurde es auf einem *Phosphoscreen* inkubiert, der dann wiederum am Phospho- und Fluoroimager ausgewertet wurde.

#### 2.2.3.8.2 Interaktionsstudien in humanen Zelllinien *in vivo*

Für die Interaktionsstudien wurden HEK293 genutzt.

##### 2.2.3.8.2.1 Klonierung von *MST1*, *MST2* und *WW45*

Beim RZPD wurden EST-Klone bestellt, die die entsprechenden cDNAs der Gene trugen. Mit cDNA spezifischen Primern (Tabelle 9), die zusätzlich Schnittstellen zur Klonierung in den Vektor pCMV-Tag1 trugen, wurden die cDNAs mit *Pfu Turbo* DNA-Polymerase amplifiziert, mit Taq DNA Polymerase wurde ein A-Anhang generiert und mit Hilfe der Kitsysteme pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems und TA Cloning® Kit wurden die PCR-Fragmente kloniert.

Tabelle 9. Primersequenzen zur Klonierung der Gene *MST1*, *MST2* und *WW45* aus EST-Klonen

Gen	Forward Primer (5`-3`)	Reverse Primer (5`-3`)
<i>MST1</i>	GAGGATCCCGCCATGGAGCAG	TGGGTCGACTCAAAAGTTTTGCTGCCTTCTTT
<i>MST2</i>	GAAGATCTGCGCCATGGAGACGGTACAGC	TGGGTCGACAGCCTGGCCTTGCTCAGAAGTT
<i>WW45</i>	GAAGATCTGAAGGATGCTGTCCCAGAAAGAAA	TGGGTCGACTCAGCTCAAAAATTTTTCCATGTTG

Die Vektoren wurden dann mit den Restriktionsendonukleasen BamHI bzw. BglII und SalI geschnitten und die Inserts in den Vektor pCMV-Tag1 kloniert. Bei dem Klon für MST1 befand sich ein Intron im Klon, das durch gerichtete Mutagenese mit dem QuickChange<sup>®</sup> XL Site-Directed Mutagenesis Kit deletiert wurde. Ebenso musste ein Stopcodon bei dem Klon WW45 mutiert werden.

#### 2.2.3.8.2.2 *Transfektion und Proteinisolation in und aus humanen Zellen*

Die Transfektion in HEK293 wurde wie in 2.2.3.3. mit Hilfe von Lipofectamin 2000 vorgenommen.

##### 2.2.3.8.2.2.1 Proteinisolation mit RIPA-Puffer

Zum Aufschluss der Zellen wurde RIPA-Puffer verwendet, dem ein Proteininhibitormix (Complete) zugesetzt wurde. Nachdem das Medium abgesaugt wurde und mit PBS gewaschen worden war, wurde 1 ml RIPA-Puffer auf die Zellkulturschale mit den Zellen gegeben. Die Platte mit RIPA-Puffer wurde 10 min bei 4°C inkubiert und anschließend wurde die Zell-Protein-RIPA-Puffer-Lösung durch eine 21 gauge Kanüle (mit Spritze) auf und abgezogen, was zum Aufschluss der Zellen führte. Die Proteinlösung wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 30 min bei 4°C unter Invertieren inkubiert. Die Zellmembranen und Rückstände wurden bei 10000 U/min und 4°C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

##### 2.2.3.8.2.2.2 Proteinisolation mit Flag-Aufschlusspuffer

Zellen, deren Protein isoliert werden sollte, wurden von der Zellkulturschale abtrypsiniert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 1 ml Flag-Proteinaufschlusspuffer aufgenommen und 30 min bei 4°C invertiert. Die Zellmembranen und Rückstände wurden bei 10000 U/min und 4°C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

#### 2.2.3.8.2.3 *(Immuno)Präzipitation*

##### 2.2.3.8.2.3.1 Präzipitation mit GSH-Sepharose

Pro Ansatz wurden 75 µl Glutathion-Sepharose genutzt, die durch zweimaliges Waschen mit PBS vorbereitet wurde. Je 75 µl GSH-Sepharose wurden zu 1 ml Proteinlösung (in RIPA-Puffer) zugegeben und 1 h bei 4°C invertiert. Anschließend wurde 4 min bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Glutathion-Sepharose, die GST-Fusionprotein gebunden haben sollte, wurde 2 x mit 300 µl PBS gewaschen, anschließend mit je 25 µl Proteinladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

#### 2.2.3.8.2.3.2 Präzipitation mit Flag-Agarose

Pro Ansatz wurden 50 µl Flag-Agarose eingesetzt, die durch zweimaliges Waschen mit TBS vorbereitet wurde. 50 µl Flag-Agarose wurden zu 1 ml Proteinlösung (in Flag-Proteinauflösungspuffer) gegeben und über Nacht bei 4°C invertiert. Anschließend wurde 5 sek bei 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Flag-Agarose, die die Flag-Fusionsproteine gebunden haben sollte, wurde 2 x mit 300 µl TBS gewaschen, anschließend mit je 25 µl Proteinladungspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

#### 2.2.3.8.2.4 Western Blot Analyse

20 µl der mit Ladepuffer versetzten und denaturierten Präzipitationsansätze wurden auf einem 10% PAGE-Gel aufgetrennt. Die Gele wurden in einem Western Blot eingesetzt und die Proteine wurden bei 4°C und 350 mA für 1 h in Western-Blot-Puffer II im *Mini Trans-Blot Cell System* (Biorad) auf eine PVDF-Membran übertragen.

##### 2.2.3.8.2.4.1 Detektion mit GST-Antikörpern

Zur Detektion mit GST-Antikörpern wurde die Membran mindestens 1 h in Blockierungslösung geblockt und 3 x mit Waschlösung für je 5 min gewaschen. 25 µg GST-Antikörper wurden in 5 ml Waschlösung verdünnt und der Blot wurde 1 h invertiert. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, gewaschen, 1,4 µg des *Anti-mouse IgG alkaline phosphatase* Antikörpers wurden in 5 ml Waschlösung verdünnt und der Blot wurde 1 h invertiert. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, gewaschen und die Detektion erfolgte mit BCIP/NBT.

##### 2.2.3.8.2.4.2 Detektion mit Flag-Antikörpern

Zur Detektion mit Flag-Antikörpern wurde die Membran mindestens 1 h in Blockierungslösung geblockt und mit Waschlösung für 5 min gewaschen. 180 µg Flag-Antikörper wurden in 25 ml Blockierungslösung verdünnt und der Blot wurde 30 min geschüttelt. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, gewaschen, 1,4 µg des *Anti-mouse IgG alkaline phosphatase* Antikörpers wurden in 25 ml Blockierungslösung verdünnt und der Blot wurde 1 h invertiert. Anschließend wurde 4 x 5 min mit Waschlösung gewaschen und die Detektion erfolgte mit BCIP/NBT.

##### 2.2.3.8.2.4.3 Detektion mit Phospho-Serinspezifischen Antikörpern

Zur Detektion mit Phospho-serinspezifischen Antikörpern wurde die gleichen Bedingungen genutzt, wie bei der Detektion mit GST-Antikörpern (2.2.3.8.2.4.1). Der phospho-serinspezifische Antikörper wurde in einer Konzentration von 1,5 µg/ml eingesetzt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Epigenetische Inaktivierung in Weichteilsarkomen

#### 3.1.1 Epigenetische Inaktivierung krebsrelevanter Gene

Um den Einfluss der epigenetischen Inaktivierung in Form von Promoterhypermethylierung der in die Tumorenstehung involvierter Gene *RASSF1A*, *p16*, *MLH1*, *MSH2*, *ERα* in Weichteilsarkomen zu analysieren, wurde genomische DNA aus Weichteilsarkomen isoliert und die DNA wurde Bisulfit behandelt.

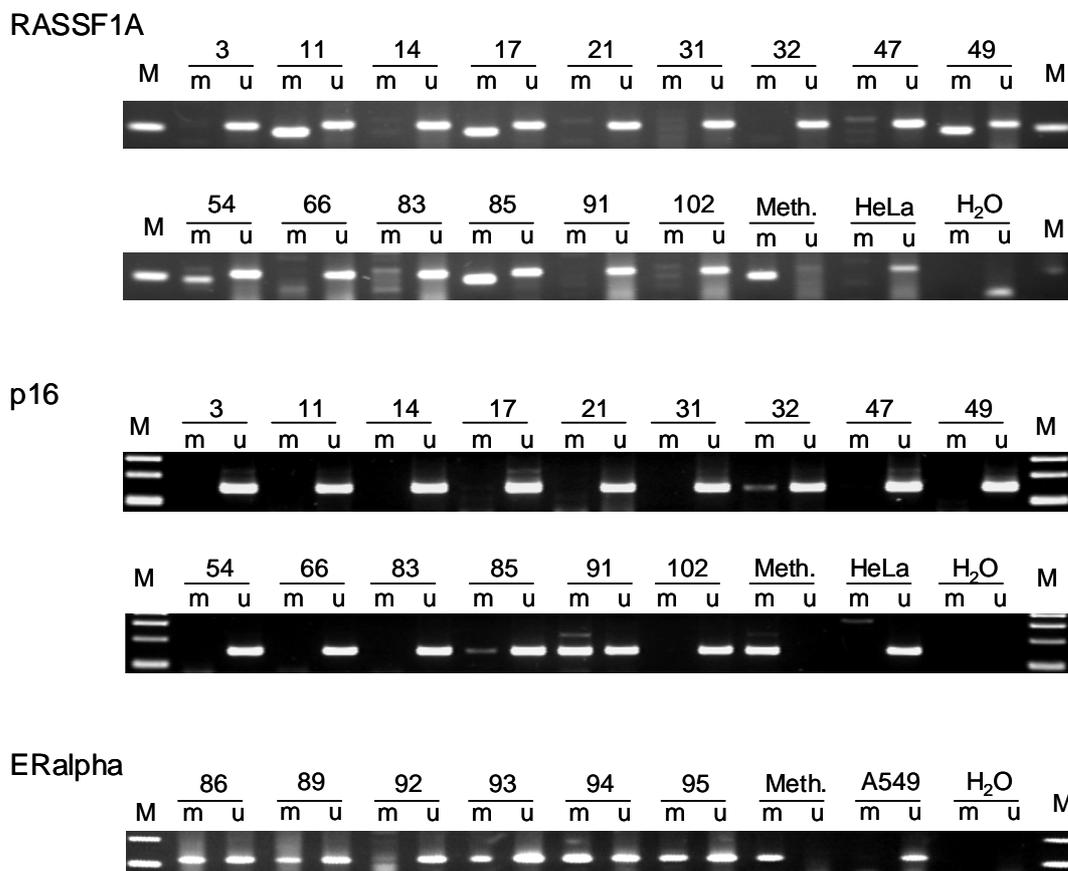


Abbildung 6. Methylation Specific PCR der Gene *RASSF1A*, *p16* und *ERα* in primären Weichteilsarkomen. Es wurden Primer, die nach Bisulfit Behandlung der Tumor DNA, spezifisch ursprünglich methylierte (m) und unmethylierte (u) CpGs detektieren, im jeweiligen PCR Ansatz eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrolle wurden eine in vitro methylierte Kontroll-DNA (Meth.; Siehe 2.2.1.4) und eine unmethylierte Kontrolle (HeLa bzw. A549) mitgeführt. Die Produktlängen betragen bei der MSP von *RASSF1A* 93bp für das methylierte bzw. 105bp für das unmethylierte Produkt. Die Produktlängen der MSP von *p16* betragen 150bp für das methylierte bzw. 151bp für das unmethylierte Produkt und die der MSP für *ERα* 159bp für das methylierte bzw. 161 für das unmethylierte PCR-Produkt. Mit M ist der 100 bp Marker gekennzeichnet.

Untersucht wurden 84 Weichteilsarkomproben, die in 22 Liposarkome, 18 Leiomyosarkome, 18 *malignant fibrous histiocytomas* (MFHs), 6 Rhabdomyosarkome,

6 neurogene Sarkome, 6 synoviale Sarkome, 3 Fibrosarkome, 3 maligne Hemangiopericytome, 1 malignes Mesotheliom und ein nicht klassifiziertes Sarkom klassifiziert worden waren. Die CpG Inseln der Promotoren von *RASSF1A* (*Ras Assoziation Domain Family 1A*), *p16* und *ERα* (*Estrogen Rezeptor α*) wurden mit Hilfe von *methylation specific PCR* (MSP) analysiert (Abbildung 6), während die Promotoren der Gene *MLH1* (*mutL Homologue 1*) und *MSH2* (*mutS Homologue 2*) mit *combined bisulfite restriction analysis* (COBRA) untersucht wurden (Abbildung 7).

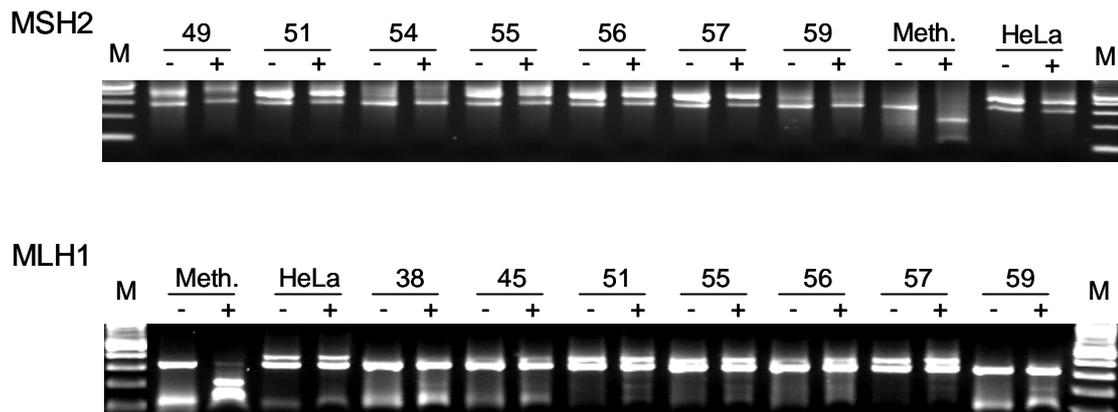


Abbildung 7. Combined Bisulfit Restriction Analysis der Gene *MSH2* und *MLH1* in Weichteilsarkomen. Die zu untersuchenden Abschnitte wurden durch PCR amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *TaqI* (COBRA *MLH1*) und *HpyCH4IV* (COBRA *MSH2*) geschnitten. Die Restriktionen (+) und ungeschnittene PCR Produkte (-) wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrollen wurde eine in vitro methylierte Kontrolle (Meth.; Siehe 2.2.1.4) und eine unmethylierte Kontrolle (HeLa) mitgeführt. Mit M ist der 100 bp DNA Längenstandard gekennzeichnet.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse und Methylierungshäufigkeiten dargestellt. Der Promoter des Gens *MSH2* zeigte keinerlei Methylierung in 54 untersuchten Proben, die Methylierungsfrequenz des Promoters von *MLH1* betrug 9% (7 von 81), wobei 3 von 21 Liposarkomen, 1 von 18 (6%) Leiomyosarkomen, 1 von 17 (6%) MFHs, 1 von 3 malignen Hemangiopericytomen und 1 malignes Mesotheliom betroffen waren. Der Promoter des Gens *ERα* zeigte mit 76% (48 von 63) eine hohe Methylierungsfrequenz ohne signifikante Unterschiede zwischen den Tumorentitäten. Die epigenetische Inaktivierung des Gens *p16* konnte in 27% (22 von 82) der Fälle detektiert werden, wobei auch hier keine signifikanten Unterschiede in den Unterarten der Tumore auftraten. 20% (17 von 84) der untersuchten Primärtumoren wiesen eine Methylierung des Promoters von *RASSF1A* auf. Dabei waren 18% (4 von 22) der Liposarkome und 6% (1 von 18) MFHs hypermethyliert, während im Vergleich dazu die Methylierungsfrequenz bei Leiomyosarkomen mit 39% (7 von 18) signifikant ( $p=0.152$ ; t-Test, bzw.  $p<0,015$ ; t-Test) höher war. In Normalgewebe lagen die Promotoren von *RASSF1A*, *MLH1* und *MSH2* unmethyliert vor. Mit 2 von 9 Proben waren für den Promoter von *p16* 22% der Normalgewebe methyliert und mit 4 von 8 Proben war die Promoterregion von *ERα* zu 50% hypermethyliert.

Tabelle 10. Häufigkeiten der Promotermethylierung verschiedener Gene in Weichteilsarkomen. Bei Stichproben < 5 wurden keine prozentualen Anteile angegeben, ebenso bei Werten, bei denen keine Methylierung auftrat.

Tumorart	<i>RASSF1A</i>	<i>p16</i>	<i>MLH1</i>	<i>MSH2</i>	<i>ER<math>\alpha</math></i>
Liposarkome	4/22 (18%)	6/22 (27%)	3/21 (14%)	0/12	10/14 (71%)
Leiomyosarkome	7/18 (39%)	4/16 (25%)	1/18 (6%)	0/6	12/15 (80%)
MFH <i>Malignant fibrous histiocytomas</i>	1/18 (6%)	3/18 (17%)	1/17 (6%)	0/14	11/13 (85%)
Rhabdomyosarkome	0/6	2/6 (33%)	0/6	0/6	4/5 (80%)
Neurogene Sarkome	3/6 (50%)	2/6 (33%)	0/5	0/6	2/3
Synoviale Sarkome	2/6 (33%)	1/6 (17%)	0/6	0/5	4/6 (67%)
Fibrosarkome	0/3	1/3	0/3	0/2	3/3
Malign. Hemangiop.	0/3	1/3	1/3	0/1	0/2
Malig. Mesotheliom	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1
unklassifizierte Sarkome	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1
Gesamt	17/84 (20%)	22/82 (27%)	7/81 (9%)	0/54	48/63 (76%)
Normalgewebe	0/8	2/9 (22%)	0/9	0/9	4/8 (50%)

In fünf Weichteilsarkomzelllinien (RD, A204, 6/93, Saos2, US8-93) wurde die Methylierung des Promoters von *RASSF1A* untersucht und es zeigte sich, dass zwei Rhabdomyosarkomzelllinien RD und A204 sowie die Leiomyosarkomzelllinie 6/93 und die Osteosarkomzelllinie Saos2 methyliert waren, während die Zelllinie eines undifferenzierten Sarkoms US8-93 keine Methylierung aufwies (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.1.1 Induktion der Reexpression von *RASSF1A* in einer Weichteilsarkomzelllinie durch Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Die Rhabdomyosarkomzelllinie RD wurde 4 Tage mit dem DNA Methyltransferasehemmer 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelt und die Expression von *RASSF1A* wurde mittels RT-PCR analysiert. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit 5-

Aza-2'-Deoxycytidin zu einer Reexpression von *RASSF1A* führte (Abbildung 8A). In *real-time*-RT-PCR Analysen wurde gezeigt, dass die Expression von *RASSF1A* in den nicht mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten Zellen bei 2% der Expression der behandelten Zellen lag (Abbildung 8A). Die Kontrolle der RNA erfolgte durch Expressionsanalyse des Genes *GAPDH*, die in allen Proben gleich stark war.

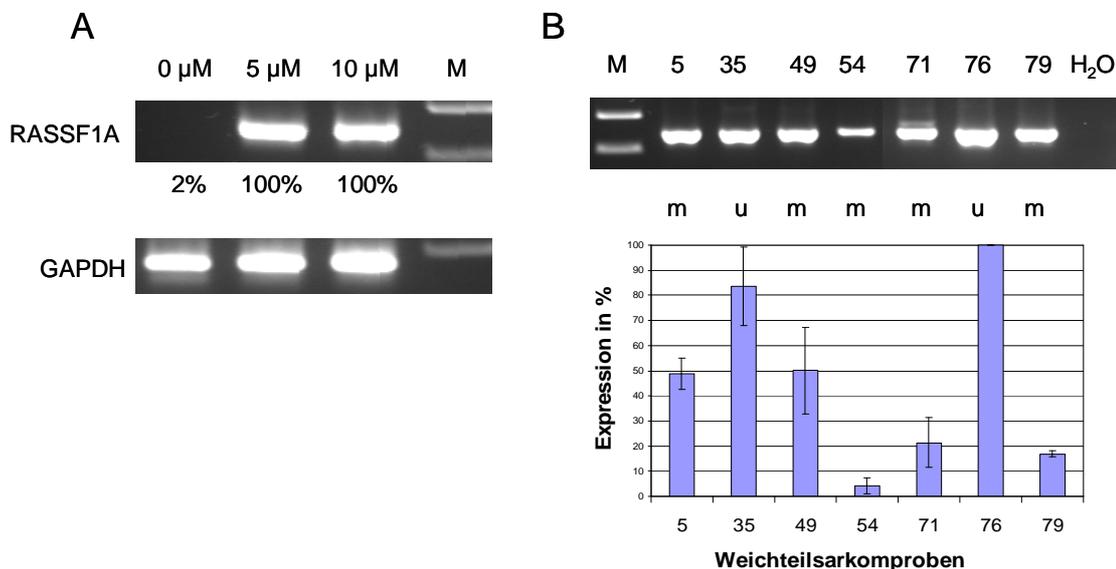


Abbildung 8. *RASSF1A* Expressionsanalysen in der Rhabdomyosarkomzelllinie RD und in Weichteilsarkomen. (A) Die Reexpression von *RASSF1A* nach Behandlung der Rhabdomyosarkomzelllinie RD mit 0 µM, 5 µM und 10 µM 5-Aza-2'-Deoxycytidin wurde mittels *real-time*-RT-PCR (Produktgröße 239 bp) analysiert. Die Expression des Ansatzes nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin wurde in einer komparativen Auswertung als 100% angenommen. Zellen, die nicht mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelt wurden zeigen nur 2% der Expression. Als Kontrolle diente die Expression des Genes *GAPDH* (Größe des PCR Produktes 176 bp). (B) *Real-time*-RT-PCR Analyse der Expression von *RASSF1A* in Weichteilsarkomproben, die einen methylierten (m) bzw. unmethylierten (u) Promoter von *RASSF1A* aufwiesen. Mit M ist der 100 bp DNA Längenstandard gekennzeichnet.

### 3.1.1.2 Untersuchung der Expression von *RASSF1A* im epigenetisch inaktivierten Weichteilsarkomproben mit *real-time*-RT-PCR

Zum Nachweis, dass die die Methylierung des Promoters von *RASSF1A* zur Abnahme der Expression führte, wurde RNA, isoliert aus Weichteilsarkomproben, zur Analyse mittels *real-time*-RT-PCR eingesetzt. Proben, die eine Methylierung der Promoterregion in der MSP ergaben, zeigten auch eine verminderte Expression von *RASSF1A*, so z.B. die Proben 5 und 49, die eine Verringerung der Expression um ca. 50% aufwiesen (Abbildung 8 B). Die Tumore 35 und 76 ergaben keine Methylierung des Promoters von *RASSF1A* in der MSP und zeigen auch die stärkste Expression in der Expressionsanalyse. Bei den Proben 54, 71 und 79, die in der MSP methyliert waren, entsprach die Expression nur noch 4% bis 20% verglichen mit Probe 76 (Abbildung 8 B).

### 3.1.1.3 Einfluss der Hypermethylierung des Promoters von *RASSF1A* auf die Prognose für Patienten

Die Überlebenszeit von Patienten in Abhängigkeit von der Promoterhypermethylierung von *RASSF1A* wurde mit Hilfe statistischer Analyseverfahren im Programm SPSS 11.0 analysiert. Dabei wurden jedoch nur Patienten mit Tumoren des 2. und 3. Tumorgades berücksichtigt, da die Patienten mit Tumorgad 1 noch nicht verstorben waren und die Patienten mit Tumorgad 4 aufgrund schneller Metastasierung binnen kürzester Zeit verstorben waren. Die Auswertung erfolgte mittels des *Cox`proportional hazard regression model* und der Kaplan Meier Überlebensanalyse. Letztere ergab für Patienten mit einem hypermethylierten Promoter von *RASSF1A* eine mittlere Überlebenszeit von 22 Monaten (Median 12 Monate), während Patienten, deren *RASSF1A* Promoter nicht methyliert war, mit einer mittleren Überlebenszeit von 58 Monaten (Median 52 Monate) eine signifikant ( $p=0,0284$ ; Log-Rank-Test) höhere Überlebensrate aufwiesen (Abbildung 9). Auch im *Cox`proportional hazard regression model* zeigte sich ein signifikant ( $RR=2,9$ ;  $p=0,037$ ) höheres Risiko, an der Krebserkrankung zu sterben, für Patienten, deren *RASSF1A* Promoter hypermethyliert war.

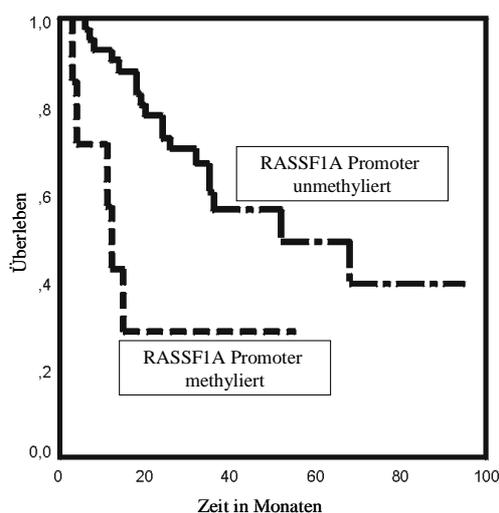


Abbildung 9. Kaplan-Meier Überlebensanalyse für Weichteilsarkompatienten mit methyliertem bzw. unmethyliertem *RASSF1A* Promoter. Patienten, deren Tumor in die Stadien zwei und drei klassifiziert wurden, wurden in die Analyse einbezogen. Signifikant ( $p=0,0284$ ; Log-Rank-Test) höher war die Überlebenszeit für Patienten, die keine *RASSF1A* Promoterhypermethylierung des Tumors aufwiesen.

### 3.1.2 Epigenetische Inaktivierung von *MST1*, *MST2*, *WW45*, *LATS1* und *LATS2*

*MST* wurde als Interaktionspartner von *RASSF1A* beschrieben (Praskova *et al.* 2004), der wiederum mit *WW45* interagiert und die Proteine *LATS* zu phosphorylieren vermochte (Chan *et al.* 2005). Die Untersuchung der epigenetischen Inaktivierung dieser Gene kann, sobald z.B. sich ausschließende Ereignisse auftreten, Aufschlüsse über antagonistische oder synergistische Wirkweisen im betroffenen Signaltransduktionsweg liefern. Die epigenetische Inaktivierung durch

Promotermethylierung von *MST1*, *MST2*, *WW45*, *LATS1* und *LATS2* wurde mit Hilfe von MSP (Abbildung 10 und Tabelle 11) in Weichteilsarkomen untersucht.

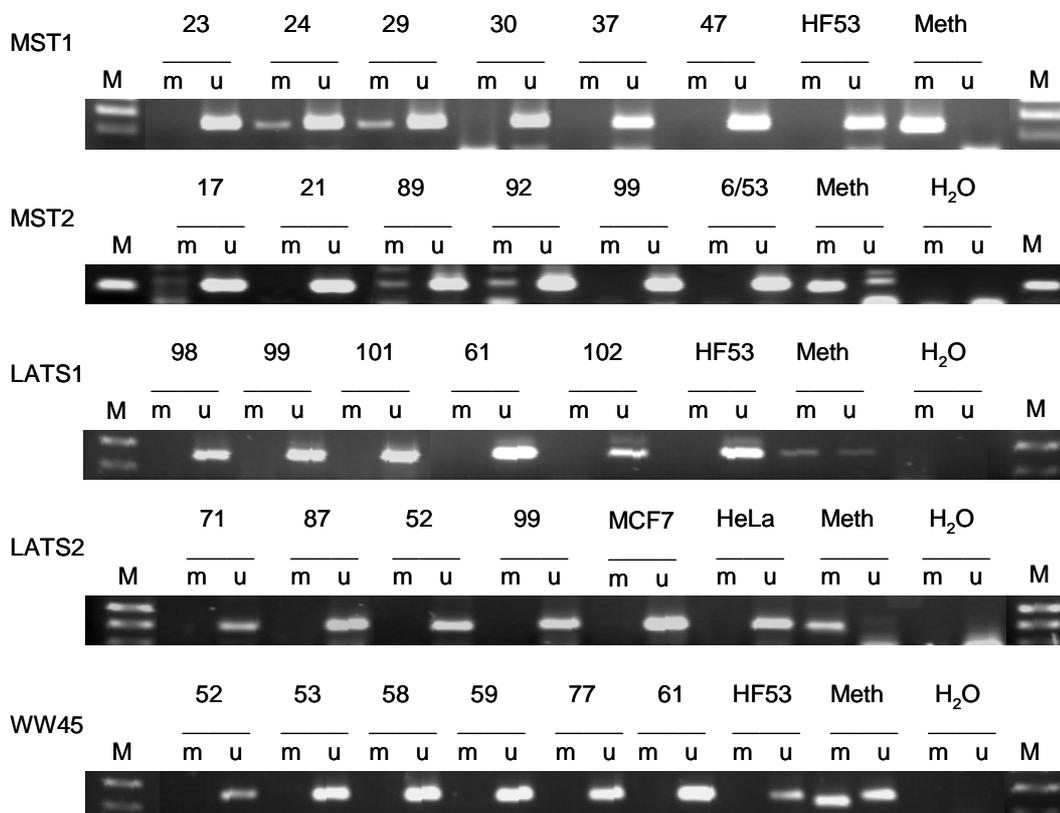


Abbildung 10. Methylation Specific PCR der Gene *MST1*, *MST2*, *LATS1*, *LATS2* und *WW45* in Weichteilsarkomen. Es wurden Primer, die nach Bisulfit Behandlung der Tumor DNA, spezifisch ursprünglich methylierte (m) und unmethylierte (u) CpGs detektieren, im jeweiligen PCR Ansatz eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrolle wurden eine in vitro methylierte Kontroll-DNA (Meth.; Siehe 2.2.1.4) und eine unmethylierte Kontrolle (HF53, HeLa bzw. 6/93) mitgeführt. Die Produktlängen betragen bei der MSP von *MST1* 120 bp für das methylierte bzw. 125 bp für das unmethylierte Produkt. Die Produktlängen der MSP von *MST2* betragen 99 bp für das methylierte bzw. 108 bp für das unmethylierte Produkt und die der MSP für *LATS1* 125 bp für methyliertes und unmethyliertes PCR Produkt, für *LATS2* 150 bp für methyliertes und unmethyliertes Produkt und für *WW45* 116 bp für das methylierte bzw. 131 bp für das unmethylierte Produkt. Mit M ist der 100 bp DNA Längenstandard gekennzeichnet.

Die Methylierungshäufigkeit lag bei *MST1* mit 37% (19 von 52) relativ hoch. Dabei waren 25% (2 von 8) der untersuchten Liposarkome, 50% (5 von 10) der Leiomyosarkome, 17% (2 von 11) der MFHs und 80% (4 von 5) der Rhabdomyosarkome betroffen (Tabelle 11). In der Promoterregion von *MST2* zeigten 20% (12 von 60) der Proben eine Hypermethylierung, dabei waren 15% (2 von 13) der Liposarkome, keine der 13 untersuchten Leiomyosarkome, 31% (4 von 13) MFHs, 17% (1 von 6) der Rhabdomyosarkome und 50% (3 von 6) der Synovialen Sarkome betroffen (Tabelle 11). Die Untersuchung des Promoters von *LATS1* zeigte eine niedrige Methylierungshäufigkeit, es waren 7% (3 von 44) der Weichteilsarkome methyliert, dabei handelte es sich um ein Liposarkom, ein Leiomyosarkom und ein nicht

klassifiziertes Sarkom. Für die Promotoren der Gene *LATS2* und *WW45* konnte in 43 bzw. 47 untersuchten Proben keinerlei Promoterhypermethylierung festgestellt werden.

Tabelle 11. Methylierungsfrequenzen der Promotoren von *MST1* und *MST2* in Weichteilsarkomen. Bei Stichproben < 5 wurden keine prozentualen Anteile angegeben, ebenso bei Werten, bei denen keine Methylierung auftrat.

Tumorart	MST1	MST2
Liposarkome	2/8 (25%)	2/13 (15%)
Leiomyosarkome	5/10 (50%)	0/13 (0%)
MFH	2/11 (17%)	4/13 (31%)
Rhabdomyosarkome	4/5 (80%)	1/6 (17%)
Neurogene Sarkome	1/2	0/3
Synoviale Sarkome	1/6 (17%)	3/6 (50%)
Fibrosarkome	1/3	0/2
Nicht klassifizierte	2/6 (33%)	2/4
gesamt	19/52 (37%)	12/60 (20%)
Normalgewebe	1/7 (14%)	0/4

In den Leiomyosarkomen war der Promoter von *MST1* signifikant ( $p=0,007$ ; Exakter Test nach Fischer) häufiger methyliert, verglichen mit der Promotermethylierung von *MST2* (Tabelle 11). Auch die Promotermethylierung von *RASSF1A* ist signifikant ( $p=0,025$ ; Exakter Test nach Fischer) häufiger, verglichen mit der von *MST2* (Tabelle 10, Tabelle 11).

Die Untersuchung von Weichteilsarkomzelllinien (SKLMS, Saos2, A204, 6/93, RD und US8-93) ergab eine Hypermethylierung des *MST1* Promoters in 3 von 6 Fällen und betraf die Zelllinien SKLMS, Saos2 und A204. Für den Promoter von *MST2* konnte in keiner der Zelllinien eine Hypermethylierung detektiert werden.

### 3.1.2.1 Induktion der Reexpression von *MST1* in einer Weichteilsarkomzelllinie durch Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Die Weichteilsarkomzelllinie SKLMS (Leiomyosarkom) wurde vier Tage mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelt und die Expression von *MST1* wurde mittels RT-PCR analysiert. Da bei dieser Zelllinie der Promoter von *MST1* nur partiell hypermethyliert vorlag, wurde die Expression von *MST1* durch die Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin verstärkt (Abbildung 11).

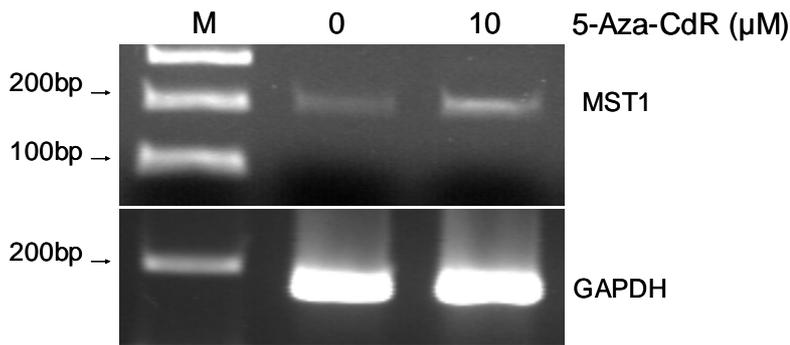


Abbildung 11. *MST1* Expressionsanalyse in SKLMS. Die Expression von *MST1* nach Behandlung der Leiomyosarkomzelllinie SKLMS mit 0 µM und 10 µM 5-Aza-2'-Deoxycytidin wurde nach RNA Isolation mittels RT-PCR (200 bp) analysiert. Als Kontrolle dient die Expression des Genes *GAPDH* (Größe des PCR Produktes 176 bp).

### 3.1.2.2 Einfluss der Hypermethylierung des Promoters von *MST1* auf die Prognose für Patienten

Die Abhängigkeit der Überlebenszeit von Weichteilsarkompatienten vom Methylierungsstatus des *MST1* Promoters wurde mit statistischen Analysemethoden im Programm SPSS 11.0 ausgewertet. Dabei wurde das *Cox`proportional hazard regression model* und die Kaplan Meier Überlebensanalyse angewendet. Letztere ergab keinen signifikanten Unterschied, die mittlere Überlebenszeit war bei Patienten, die einen unmethylierten Promoter des Genes *MST1* trugen mit 45 Monaten jedoch niedriger im Vergleich zu Patienten, deren *MST1* Promoter methyliert vorlag (52 Monate). Dabei wurden nur Patienten mit Tumoren des Stadiums 2 und 3 berücksichtigt, da Patienten mit Tumoren des Stadiums 1 noch nicht verstorben waren und Patienten des Tumorstadiums 4 aufgrund hoher Metastasierung sehr schnell verstorben waren. Das *Cox`proportional hazard regression model* ergab einen signifikanten (RR=8.2; p=0.036) Unterschied bei der Überlebenszeit von Patienten, die einen hypermethylierten Promoter von *MST1* trugen, verglichen zu Patienten, die einen unmethylierten *MST1* Promoter aufwiesen. Das relative Risiko, an der Krebserkrankung zu sterben, war dabei für Patienten, die keine Methylierung des *MST1* Promoters trugen, erhöht (Abbildung 12).

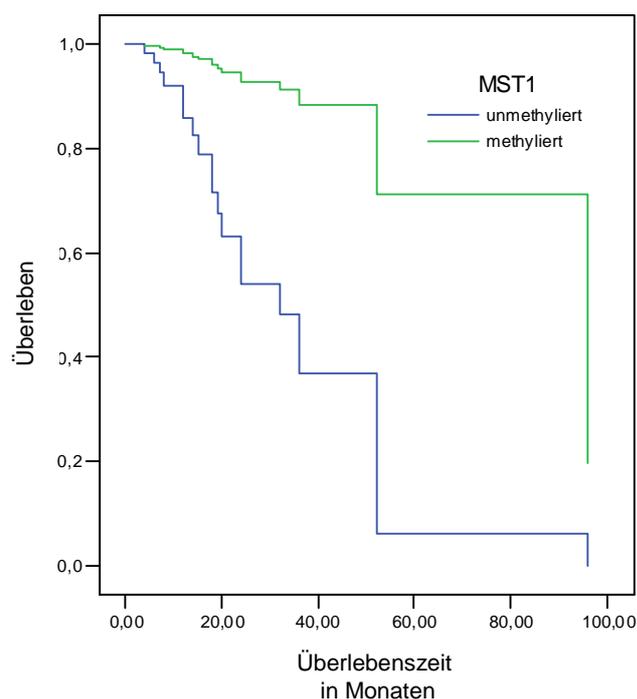


Abbildung 12. Analyse der Überlebenszeit mittels Cox`proportional hazard regression model für Weichteilsarkompatienten nach Methylierungsstatus des MST1 Promoters. Patienten, deren Tumor in die Stadien zwei und drei klassifiziert wurden, wurden in die Analyse einbezogen. Signifikant ( $RR=8.2$ ;  $p=0.036$ ) höher war die Überlebenszeit für Patienten, die eine MST1 Promoterhypermethylierung des Tumors aufwiesen.

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

### 3.2.1 Epigenetische Inaktivierung im nicht kleinzelligen Lungenkarzinom

Die Inaktivierung der Gene *MST1*, *MST2*, *WW45*, *LATS1* und *LATS2* wurde mittels MSP in 40 primären Lungentumoren und 6 Normalgewebekontrollen untersucht (Abbildung 13). In 19 von 36 (53%) und 7 von 32 (22%) der Tumoren wurde eine Promoterhypermethylierung der Gene *MST1* bzw. *MST2* gefunden. In 5 von 39 (13%) untersuchten Tumoren wurde der Promoter von *LATS1* inaktiviert, während die Methylierungsfrequenz von *LATS2* mit 11 von 32 (34%) betrug. Die epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* in diesen Tumorproben war bereits analysiert worden (Dammann *et al.* 2000) und betrug mit 13 von 39 (33%). Für *WW45* wurde in 38 Proben keine Promoterhypermethylierung detektiert.

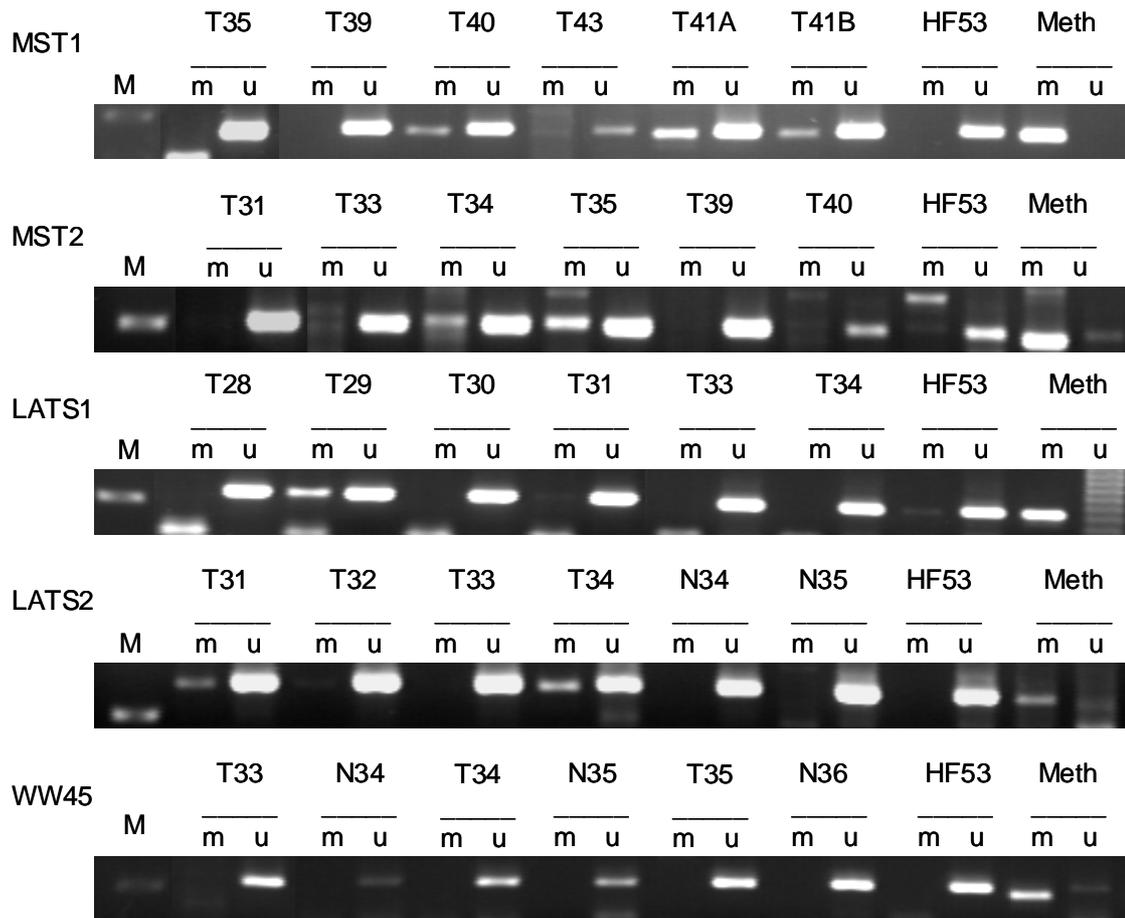


Abbildung 13. Methylation Specific PCR der Gene MST1, MST2, LATS1, LATS2 und WW45 in Lungenkarzinomen (T) und Normalgewebekontrollen (N). Es wurden Primer, die nach Bisulfit Behandlung der Tumor DNA, spezifisch ursprünglich methylierte (m) und unmethylierte (u) CpGs detektieren, im jeweiligen PCR Ansatz eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel analysiert. Als Kontrolle wurden eine in vitro methylierte Kontroll-DNA (Meth.; Siehe 2.2.1.4) und eine unmethylierte Kontrolle (HF53) mitgeführt. Die Produktlängen betragen bei der MSP von MST1 120 bp für das methylierte bzw. 125 bp für das unmethylierte Produkt. Die Produktlängen der MSP von MST2 betragen 99 bp für das methylierte bzw. 108 bp für das unmethylierte Produkt und die der MSP für LATS1 125 bp für methyliertes und unmethyliertes PCR Produkt, für LATS2 150 bp für methyliertes und unmethyliertes Produkt und für WW45 116 bp für das methylierte bzw. 131 bp für das unmethylierte Produkt. Mit M ist der 100 bp DNA Längenstandard gekennzeichnet.

Die Verteilung der Methylierungsfrequenzen wurde in Tabelle 12 dargestellt. In den untersuchten Adenokarzinomen zeigten 10 von 15 (67%) eine Promotermethylierung des Promoters von *MST1*, 3 von 16 (19%) des Promoters von *MST2*, 4 von 17 (24%) des Promoters von *LATS1* und 5 von 15 (33%) des Promoters von *LATS2*. Im Plattenepithelkarzinom lagen 6 von 12 (50%) der Proben in der Promoterregion von *MST1* methyliert vor, 3 von 10 (30%) wiesen eine Promoterhypermethylierung in *MST2* auf und 3 von 10 (30%) von *LATS2*, während keinerlei Hypermethylierung des Promoters von *LATS1* festgestellt wurde. Auch in 7 untersuchten großzelligen Karzinomen konnte keinerlei Promoterhypermethylierung bei *LATS1* detektiert werden, während die epigenetische Inaktivierung des Promoters von *MST1* in 2 von 7 (29%) der Fälle und die des Promoters von *LATS2* in 2 von 4 Fällen vorlag. Keines von 7

großzelligen Karzinomen zeigte eine Promoterhypermethylierung von *LATS1*. Damit kann eine Signifikanz der Methylierung des Promoters von *LATS1* festgestellt werden, die verstärkt bei Adenokarzinomen auftritt, während bei Plattenepithelkarzinomen und großzelligen Karzinomen keine Methylierung auftrat ( $p=0,04$ ; Exakter Test nach Fischer, Adenokarzinom versus Plattenepithelkarzinom und großzelliges Karzinom). Eine Tendenz ( $p=0,053$ ; Exakter Test nach Fischer) konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit einer *LATS1* Promoterhypermethylierung in Adenokarzinomen erhöht ist, wenn auch eine Methylierung des *RASSF1A* Promoters vorliegt. Untersuchte Normalgewebeproben zeigten keinerlei Hypermethylierung der Promotoren von *MST1*, *MST2*, *WW45*, *LATS1* und von *LATS2* (Tabelle 12).

Tabelle 12. Methylierungsfrequenzen der Promotoren der Gene *MST1*, *MST2*, *LATS2*, *LATS1* und *RASSF1A* in primären, nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen und in kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien. Bei Stichproben  $< 5$  wurden keine prozentualen Anteile angegeben, ebenso bei Werten, bei denen keine Methylierung auftrat.

Tumorart	MST1	MST2	LATS1	LATS2	RASSF1A
Adenokarzinom	10/15(67%)	3/16(19%)	4/17(24%)	5/15(33%)	5/17(29%)
Plattenepithelkarzinom	6/12(50%)	3/10(30%)	0/12	3/10(30%)	4/12(33%)
Großzelliges Karzinom	2/7(29%)	0/5	0/7	2/4	3/7(43%)
Andere	1/2	1/1	1/3	1/3	1/3
Gesamt	19/36 (53%)	7/32 (22%)	5/39 (13%)	11/32 (34%)	13/39 (33%)
Normalgewebe	0/5	0/3	0/6	0/4	0/6
Kleinzell. Bronchialkarzinomzelllinien	11/15 (73%)	6/17 (35%)	7/15 (47%)	6/18 (33%)	16/16 (100%)

### 3.2.2 Epigenetische Inaktivierung in kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien

Mittels MSP wurde die epigenetische Inaktivierung in 18 Kleinzelllungenkrebszelllinien untersucht und die Methylierungsfrequenz bestimmt (Tabelle 12). Die Methylierungsfrequenz lag mit 11 von 15 untersuchten Zelllinien bei 73% für den Promoter von *MST1*, mit 6 von 17 bei 35% für *MST2*, *WW45* war in 2 von 16 (13%) Fällen hypermethyliert, *LATS1* mit 7 von 15 in 47% der Fälle und eine Hypermethylierung des *LATS2* Promoters war in 33% (6 von 18) der Fälle zu detektieren.

### 3.3 Mutationsanalyse von *RASSF1A*, *B-RAF* und *K-RAS* in Weichteilsarkomen

#### 3.3.1 *RASSF1A*

In unseren Untersuchungen wurde gezeigt, dass der Polymorphismus 133 des Gens *RASSF1A* signifikant häufiger bei Brustkrebspatienten auftrat, als in der Kontrollgruppe (Schagdarsurengin *et al.* 2005), was den Schluss zuließ, dass der Polymorphismus die Brustkrebsentstehung fördert. Codon 133 des Gens *RASSF1A* wurde in Weichteilsarkomen auf den Polymorphismus GCT→TCT (Alanin→Serin) hin mittels *single strand conformation polymorphism* (SSCP) Analyse untersucht, um eine mögliche Korrelation auch bei Weichteilsarkompatienten zu analysieren. Genomische DNA aus Blut von heterozygoten Trägern des Polymorphismus im Codon 133 wurde als Kontrolle genutzt (Abbildung 14, K1).

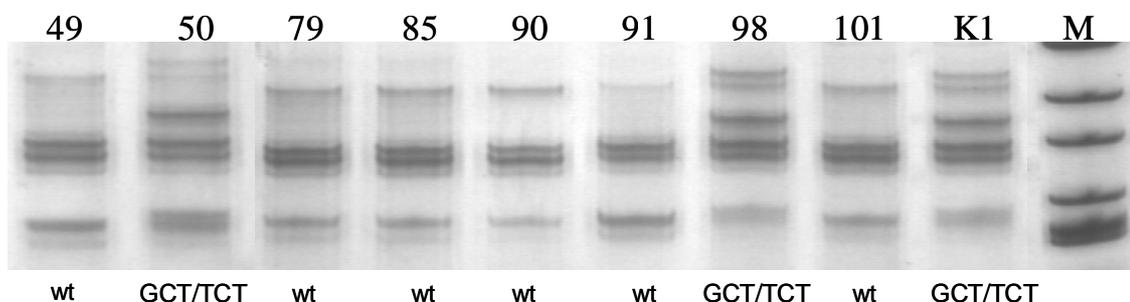


Abbildung 14. SSCP Analyse des Codons 133 des Gens *RASSF1A* in Weichteilsarkomtumoren. Die Analyse der PCR Produkte auf Polymorphismen erfolgte im 16%igen Acrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Als Kontrolle (K1) diente DNA aus Blut eines heterozygoten Trägers des Polymorphismus G/TCT. Mit wt sind die Proben gekennzeichnet, die keinen Polymorphismus tragen. Als DNA Längenstandard wurde der 100 bp DNA Marker (M) mitgeführt.

Von 69 untersuchten Weichteilsarkomproben trugen 8 (12%) den Polymorphismus. 4 von 15 (27%) Liposarkomen, 1 von 5 neurogenen Sarkomen, 1 von 5 Rhabdomyosarkomen und 1 von 16 (6%) Leiomyosarkomen waren betroffen. Die Methylierung des Promoters von *RASSF1A* zeigte keine Assoziation zu dem Polymorphismus im Codon 133, 2 von 13 (15%) Proben mit Promoterhypermethylierung trugen des Polymorphismus 133, während 6 von 56 (11%) Proben mit unmethyliertem *RASSF1A* Promoter diesen Polymorphismus aufwiesen.

#### 3.3.2 *B-RAF*

Aufgrund der Tatsache, dass negative Assoziationen zwischen den Ereignissen der Promoterhypermethylierung von *RASSF1A* und der Mutation des Codons 600 des Gens *B-RAF* in Schilddrüsenkrebs und im Gebärmutterkarzinom beschrieben wurden (Xing *et al.* 2004; Hoque *et al.* 2005; Kang *et al.* 2006), wurde ein funktioneller Zusammenhang zwischen *B-RAF* und *RASSF1A* postuliert. Eine negative Assoziation wurde hingegen in Melanoma detektiert (Reifenberger *et al.* 2004). Mit Hilfe der SSCP (*single strand*

*conformation polymorphism*) Analyse wurde die DNA, die isoliert aus Weichteilsarkomtumoren vorlag, auf Mutationen im Gen *B-RAF* untersucht, um auch in Weichteilsarkomen auf mögliche Assoziationen zu analysieren. Hierbei wurde nur die Mutation des Codons 600 GTG→GAG (Val→Glu) betrachtet und die Melanomzelllinie SKMEL, die heterozygot die Mutation GAG trug, wurde als Kontrolle genutzt. Proben, die in der SSCP Analyse eine Mutation des Codons zeigten wurden durch Sequenzierung (Abbildung 15) verifiziert. Abbildung 16 zeigt eine SSCP Analyse im PAGE-Gel nach Silberfärbung.

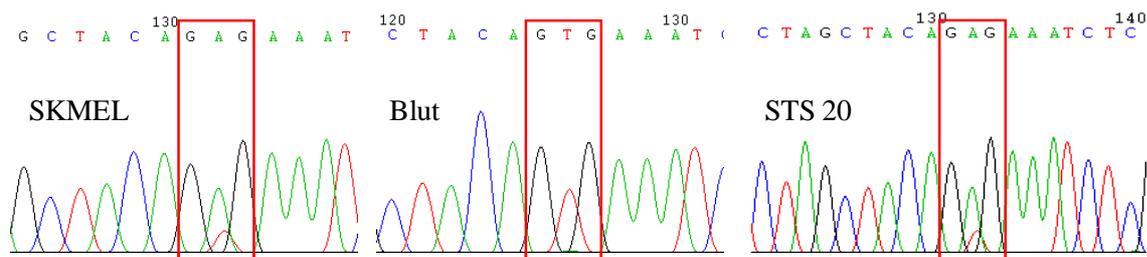


Abbildung 15. Sequenzanalyse des Codons 600 des Genes *B-RAF*. Die Kontrollen der SSCP SKMEL (heterozygot GAG/GTG) und Blut-DNA (wt GTG) sowie die Kontrollsequenzierung der Weichteilsarkomprobe STS 20 (heterozygot GAG/GTG) wurden dargestellt.

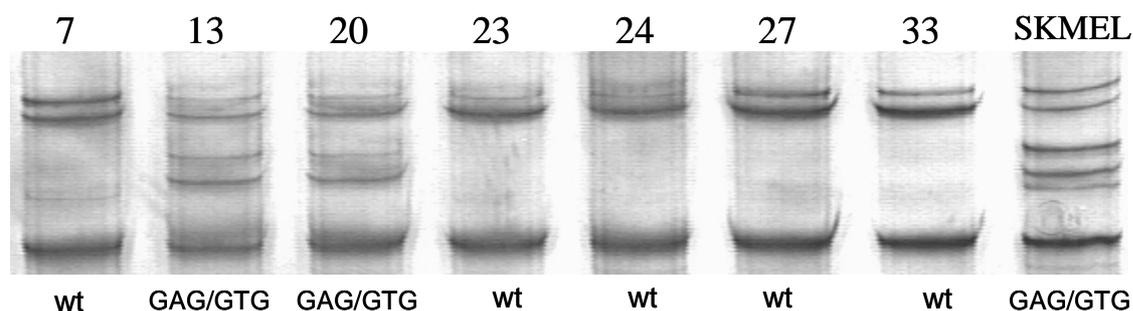


Abbildung 16. SSCP Analyse des Codons 600 des Genes *B-RAF* in Weichteilsarkomtumoren. Die Analyse der PCR Produkte auf Polymorphismen erfolgte im 17%igen Acrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Als Kontrolle (SKMEL) diente DNA der Melanomzelllinie SKMEL, die heterozygot die Mutation GAG (GAG/GTG) trägt. Mit wt sind die Proben gekennzeichnet, die homozygot das Codon 600 GTG aufwiesen.

Es wurden 84 primäre Weichteilsarkome auf Mutation des Codons 600 des Gens *B-RAF* untersucht, nur in 5% der Fälle (1 Liposarkom, 2 Rhabdomyosarkome, 1 MFH) konnte eine solche Mutation festgestellt werden. Die Untersuchung der Zelllinien 6/93, RD, SKLMS, A204 und 20/93 wurden ebenfalls auf Mutation des Genes *B-RAF* untersucht, wiesen jedoch keine Mutation auf.

### 3.3.3 *K-RAS*

*K-RAS* wurde als Interaktionspartner von *RASSF1A* beschrieben (Vos *et al.* 2004). Die Ergebnisse von Dammann *et al.*, die eine indirekte signifikante Assoziation der Ereignisse Promoterhypermethylierung von *RASSF1A* und Mutation des Codons 12 der

Gens *K-RAS* in Adenokarzinomen des Pankreas beschrieben (Dammann *et al.* 2003), legen nahe, dass beide Proteine im gleichen Signaltransduktionsweg zu agieren scheinen. Zur Analyse der Weichteilsarkome auf Mutationen des Codons 12 des Genes *K-RAS* wurde aus isolierter DNA eine PCR durchgeführt und das PCR Produkt in einer SSCP Analyse untersucht. Als Kontrollen wurden dabei die Pankreaskrebszelllinien PaCa-2 (homozygot TGT), CAPAN1 (homozygot GTT) und HUP-T3 (CGT/wt) und eine Wildtypkontrolle (homozygot GGT) mitgeführt (Abbildung 17).

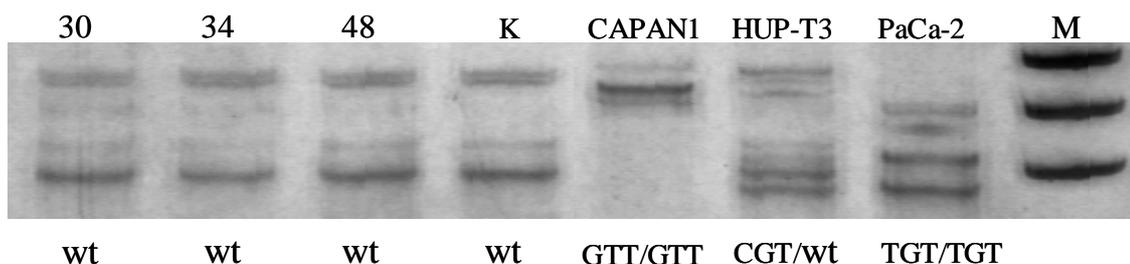


Abbildung 17. SSCP Analyse des Genes *K-RAS* in Weichteilsarkomtumoren. Die Analyse der PCR Produkte auf Polymorphismen erfolgte im 15%igen Acrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Als Wildtyp-Kontrolle (K, GGT/GGT) diente DNA aus Blut. Die Pankreaskarzinomzelllinien CAPAN1 (GTT/GTT), HUP-T3 (CGT/GGT) und PaCa-2 (TGT/TGT) wurden als Kontrollen für die Mutationsereignisse GTT, CGT und TGT eingesetzt. Als DNA Längenstandard wurde der 100 bp DNA Marker (M) mitgeführt.

Es wurden 34 primäre Weichteilsarkome ebenso, wie die Zelllinien LMS6-93, RD, SKLMS, A204 und LMS20-93 untersucht. In keinem der Ansätze konnte eine Mutation nachgewiesen werden. Proben, die außergewöhnliche Bandenmuster aufwiesen, wurden zur Kontrolle sequenziert.

### 3.4 Untersuchungen zur Funktion von RASSF1

Um die Funktion von RASSF1A näher zu charakterisieren, wurden Mutationen in die Sequenz eingebracht oder ganze funktionelle Einheiten deletiert (Tabelle 13). Die Veränderung der Reexpression bzw. der Überexpression von RASSF1A, RASSF1C und RASSF1F sowie der mutagenisierten Varianten sollten durch transiente und stabile Transfektion in die Zellen A549 und HEK293 analysiert werden. Zusätzlich sollte die Interaktion mit dem Partner MST durch Präzipitationsexperimente untersucht werden.

Die Mutagenesen wurden unter anderem in funktionell relevante Funktionseinheiten gesetzt, wie zum Beispiel bei der Mutation des Codons 52 und des Codons 90, bei denen es zum Austausch von je einem Histidin kommt, das an der möglichen Komplexierung von Zinkionen in der C1 Domäne beteiligt sein könnte (Tabelle 13). Doch auch bei den putativen Phosphorylierungsstellen in Codon 131 und Codon 203 könnte es sich um funktionell wichtige Einheiten im Protein handeln. Die Mutation des Codons 131 wurde in einem Tumor gefunden und von Shivakumar *et al.* beschrieben, ebenso wie der Polymorphismus im Codon 133 (Shivakumar *et al.* 2002). Der Polymorphismus des Codons 133 wurde auch von Burbee *et al.* publiziert, wobei

zusätzlich auch der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Polymorphismus des Codons 53 gefunden wurde (Burbee *et al.* 2001). Dammann *et al.* beschrieben eine Mutation des Codons 257, die in einem nicht kleinzelligen Lungenkarzinom gefunden wurde (Dammann *et al.* 2000). In Brustkrebstumoren wurden zusätzlich die Einzelstrangpolymorphismen wieder des Codons 133 und der Codons 246 und 257 in der RA Domäne beschrieben (Agathangelou *et al.* 2001). Diese natürlich vorkommenden Polymorphismen und Mutationen könnten relevant für die Funktion von RASSF1A sein. In Tabelle 13 wurden alle verwendeten Konstrukte aufgelistet, die Mutagenesen und Deletionen wurden in dem Konstrukt pCMV-Tag1-RASSF1A vorgenommen.

Tabelle 13. Eingefügte Mutationen/Deletionen im Gen RASSF1A

Mutation	Codon/Domäne	Domäne
RASSF1AMut52 Codon 52	CAC→CAA Histidin→Glutamin	DAG
RASSF1AMut53 Codon 53	CGC→TGC Arginin→Cystein	DAG
RASSF1AMut90 Codon 90	CAC→CAG Histidin→Glutamin	DAG
RASSF1AMut131 Codon 131	TCT→TTT Serin→Phenylalanin	ATM
RASSF1AMut132 Codon 132	CAA→GCA Glutamin→Alanin	ATM
RASSF1AMut133 Codon 133	GCT→TCT Alanin→Serin	ATM
RASSF1AMut203 Codon 203	TCC→TTC Serin→Phenylalanin	RA
RASSF1AMut246 Codon 246	GAG→AAG Glutamat→Lysin	RA
RASSF1AMut257 Codon 257	CGG→CAG Arginin→Glutamin	RA
RASSF1ADelSARAH	Deletion der SARAH-Domäne	
RASSF1ADelC1	Deletion der DAG-Domäne	
RASSF1ADelC1ATM	Deletion der DAG and ATM-Domäne	

### 3.4.1 Proliferationsverhalten stabil transfizierter Klone

Zellen der Zelllinie A549 wurden stabil mit Konstrukten des Vektors pCMV-Tag1 (Flag-Tag) transfiziert. Dabei wurden Klone generiert, die RASSF1A, RASSF1C, RASSF1F sowie mutagenisierte Formen des Gens *RASSF1A* (Tabelle 13) stabil exprimierten. Die Zelllinie A549 wurde ausgewählt, da bei dieser Linie eine Promoterhypermethylierung des Promoters von *RASSF1A* vorlag, die in einer stark reduzierten Expression des Genes resultierte.

## 3.4.1.1 Kontrolle der stabilen Transfektion mittels RT-PCR

Die Klone wurden auf stabile Expression der eingebrachten Konstrukte untersucht, indem die mRNA in einer RT-PCR nachgewiesen wurde. Dabei wurden ein *RASSF1* spezifischer Primer (L27111) und ein Primer genutzt, der in der Flag-kodierenden Sequenz lag. Dies schloss die Detektion der Hintergrundexpression von *RASSF1* in A549 aus. Es wurden mehrere Klone jeden Konstruktes untersucht, es zeigte sich jedoch, dass nur wenige stabil exprimierten. Die Expression der stabilen Klone wurde in Abbildung 18 dargestellt.

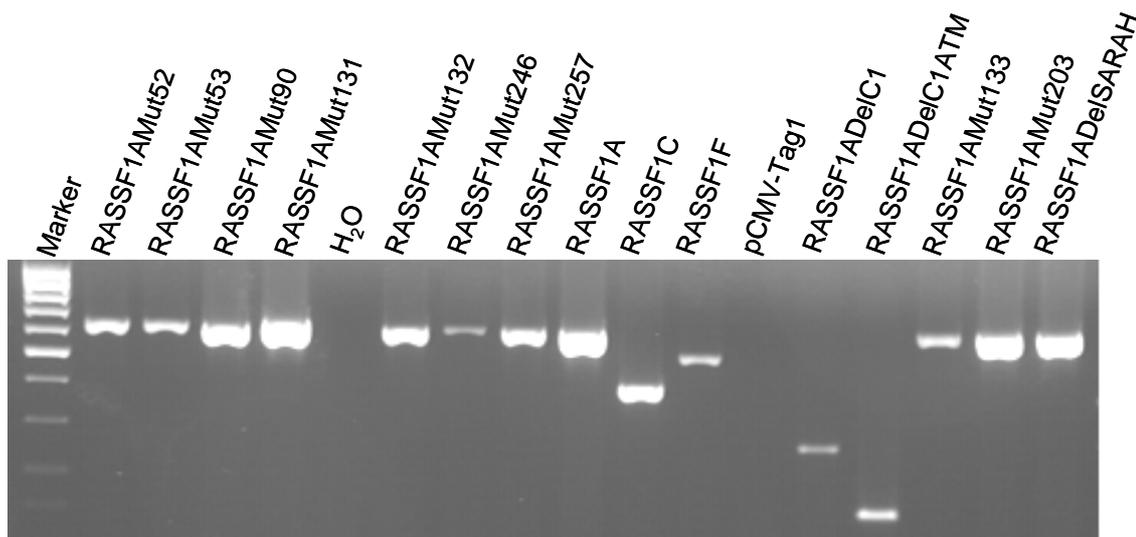


Abbildung 18. Nachweis der stabilen Expression von *RASSF1A*, *RASSF1C*, *RASSF1F*, der mutagenisierten Formen von *RASSF1A* (Siehe Tabelle 13) sowie der deletierten Formen *RASSF1ADelC1*, *RASSF1ADelC1ATM* und *RASSF1ADelSARAH* mittels RT-PCR. Eingesetzt wurden die Primer *FlagF* (*Flag-Tag*) und L27111, die PCR Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel analysiert. Als DNA Längenstandard dient ein 100 bp Marker.

## 3.4.1.2 Proliferationskurven

Der Einfluss der Reexpression von *RASSF1A* in A549 wurde in Proliferationsuntersuchungen ermittelt. Auch die Veränderung dieses Einflusses durch Mutation einzelner Aminosäuren, aber auch Deletion ganzer Domänen, wurde analysiert. Das Proliferationsverhalten der stabil transfizierten Klone wurde innerhalb von 5 Tagen aufgenommen und Wachstumskurven wurden generiert.

In Abbildung 19 wurde das Proliferationsverhalten von stabil transfizierten A549 die *RASSF1A* bzw. *RASSF1F* reexprimierten und *RASSF1C* überexprimierten sowie der Vektorkontrolle aufgezeigt. Bei Expression von *RASSF1C* zeigten sich keine Unterschiede zur Vektorkontrolle, während sowohl *RASSF1A* als auch *RASSF1F* zur Abnahme der Proliferation führten.

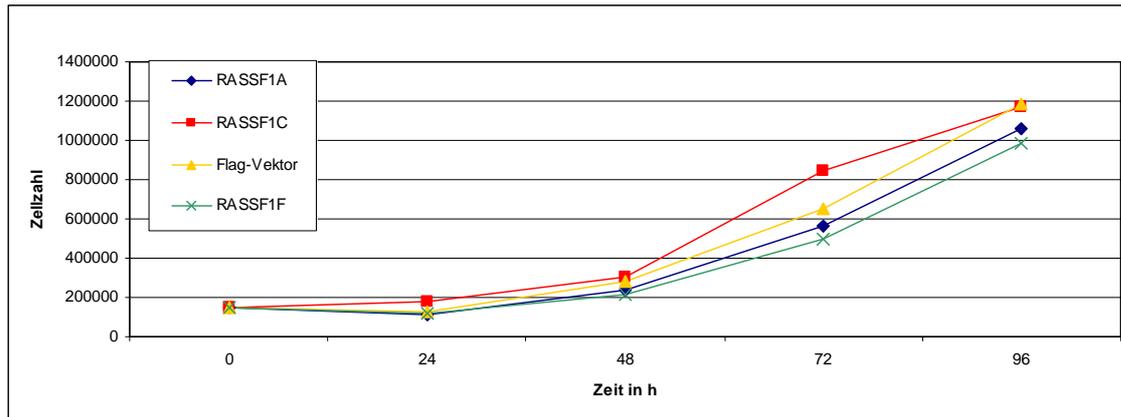


Abbildung 19. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1F exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt.

#### 3.4.1.2.1 Proliferation nach Mutation in der C1 Domäne in Abhängigkeit von Zink

Die C1 Domäne des Proteins RASSF1A trägt ein Zinkfingermotiv, die Bindung von Zinkionen könnte Einfluss auf die Funktion des Proteins haben. Um die Abhängigkeit der Proliferation der stabil transfizierten Klone von Zinkionen zu untersuchen, wurden die Proliferationskurven in zinkfreiem Optimum (1% FCS; 0,6  $\mu$ M Zink) und nach Zugabe von 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Zinkionen ermittelt. Dabei waren die Klone von Interesse, die eine Mutation in der C1 Domäne im Codon 52 und 53 trugen. In Abbildung 20A wurden Wachstumskurven dargestellt, die mit stabilen Klonen, die RASSF1C, RASSF1A und in der C1 Domäne mutierte Formen (Codon 52 und Codon 53) von RASSF1A exprimierten, generiert wurden. RASSF1A exprimierende Zellen proliferierten langsamer als RASSF1C exprimierende und als die Vektorkontrolle. War RASSF1A im Codon 52 bzw. 53 mutiert, so proliferierten die stabilen Klone schneller oder ebenso schnell wie RASSF1C und die Vektorkontrolle. Der wachstumshemmende Effekt von RASSF1A wurde aufgehoben.

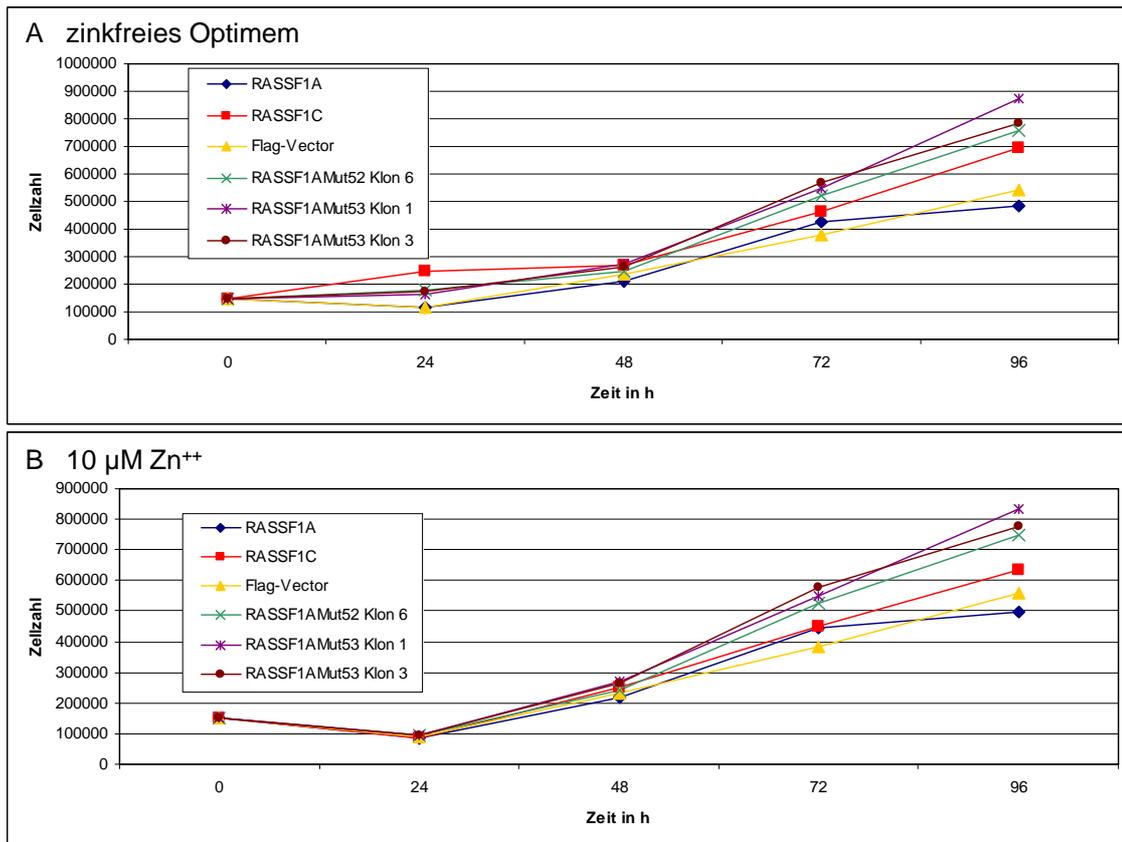


Abbildung 20. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C, die Formen RASSF1AMut52 und RASSF1AMut53 (Klone 1 und 3) exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt. (A) zeigt Wachstumskurven, die in zinkfreiem Optimum (1% FCS) aufgenommen wurden, während im Ansatz (B) dem Optimum (1% FCS) 10 µM Zinkionen zugegeben wurden.

In Optimum, das 5 µM bzw. 10 µM Zinksulfat enthielt änderte sich am Proliferationsverhalten dieser stabil transfizierten Klone nichts. Der RASSF1A exprimierende Klon proliferierte am schwächsten, während die in der C1 Domäne mutierten Formen schneller proliferierten als der RASSF1C exprimierende Klon und Die Vektorkontrolle (Abbildung 20 B).

#### 3.4.1.2.2 Proliferation nach Mutation in der ATM Domäne

Es wurden drei Mutationen in RASSF1A eingebracht, die die putative Phosphorylierungsstelle der ATM Kinase an den Positionen Codon 131, Codon 132 und Codon 133 betrafen. Nach stabiler Transfektion der Konstrukte wurden Wachstumskurven über fünf Tage aufgezeichnet. Die proliferationshemmende Funktion von RASSF1A war hier nur schwach zu detektieren, nach Mutation in den Codons 131 und 132 war jedoch ein ähnliches Proliferationsverhalten wie bei RASSF1C Expression und in der Vektorkontrolle zu beobachten (Abbildung 21).

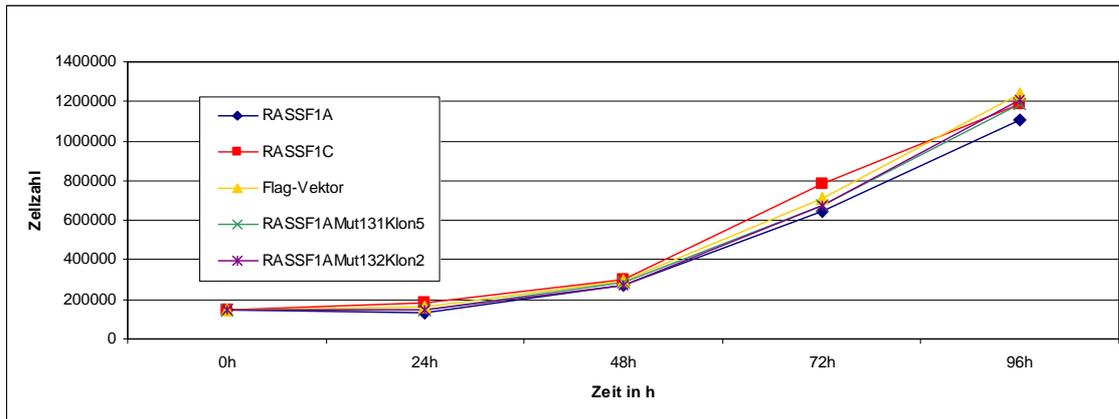


Abbildung 21. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C, RASSF1AMut131 und RASSF1AMut132 exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt.

Ein deutlicher Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen RASSF1A und der mutagenisierten Form RASSF1AMut133 wurde während der Aufzeichnung weiterer Wachstumskurven festgestellt. Liegt eine Mutation im Codon 133 vor, so proliferieren diese Zellen schneller, verglichen mit RASSF1A und schneller verglichen zu RASSF1C und der Vektorkontrolle (Abbildung 22).

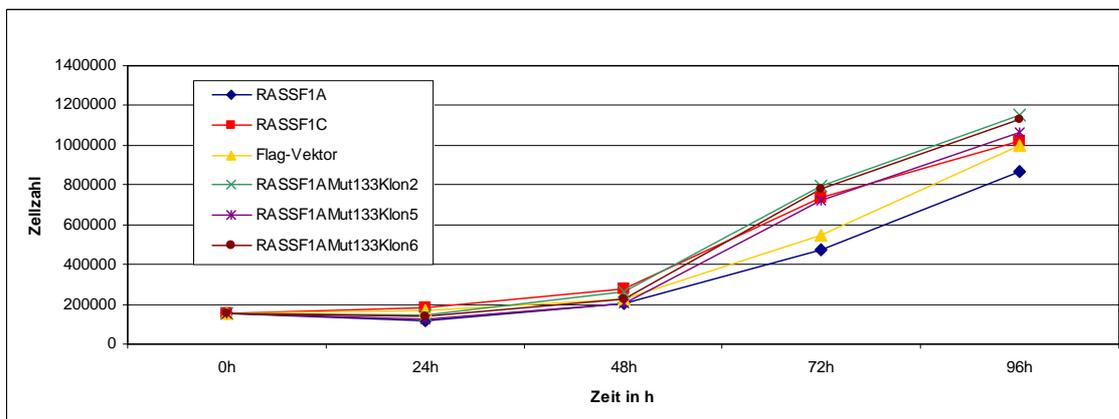


Abbildung 22. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1AMut133 (3 Klone) exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt.

### 3.4.1.2.3 Proliferation nach Mutation in der RA Domäne

Die RA Domäne von RASSF1A wurde an den Positionen 246 und 257 mutagenisiert, der Einfluss dieser Mutationen auf das Proliferationsverhalten stabil transfizierter Zellen wurde untersucht. Die proliferationshemmende Wirkung der Expression von RASSF1A war in diesem Ansatz nicht zu erkennen, auch nach Mutation der Codons 246 und 257 zeigten sich keinerlei Veränderungen des Proliferationsverhaltens (Abbildung 23).

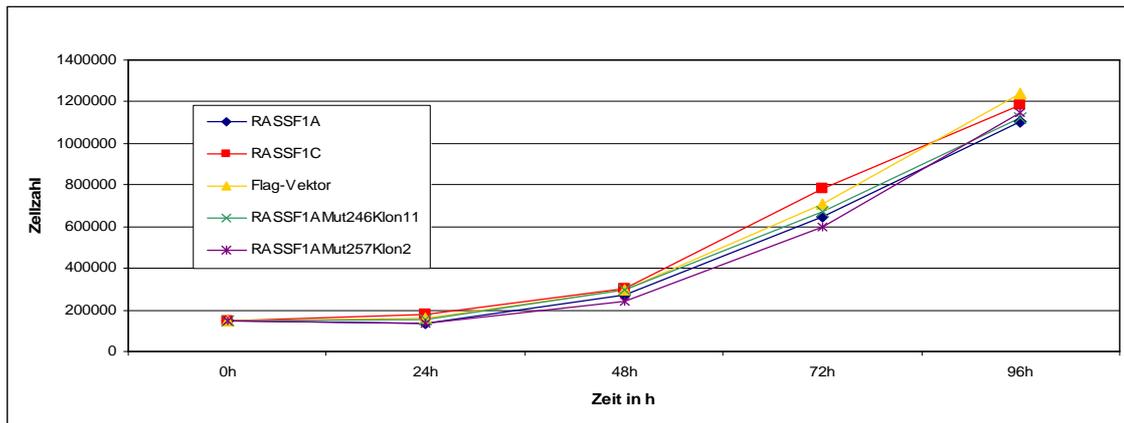


Abbildung 23. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C RASSF1AMut246 und RASSF1AMut257 exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt.

Wurden Klone analysiert, die eine im Codon 203 mutierte Form von RASSF1A exprimierten, so wurde der proliferationsinhibierende Effekt, verglichen mit wtRASSF1A, abgeschwächt (Abbildung 24, Dreifachbestimmung).

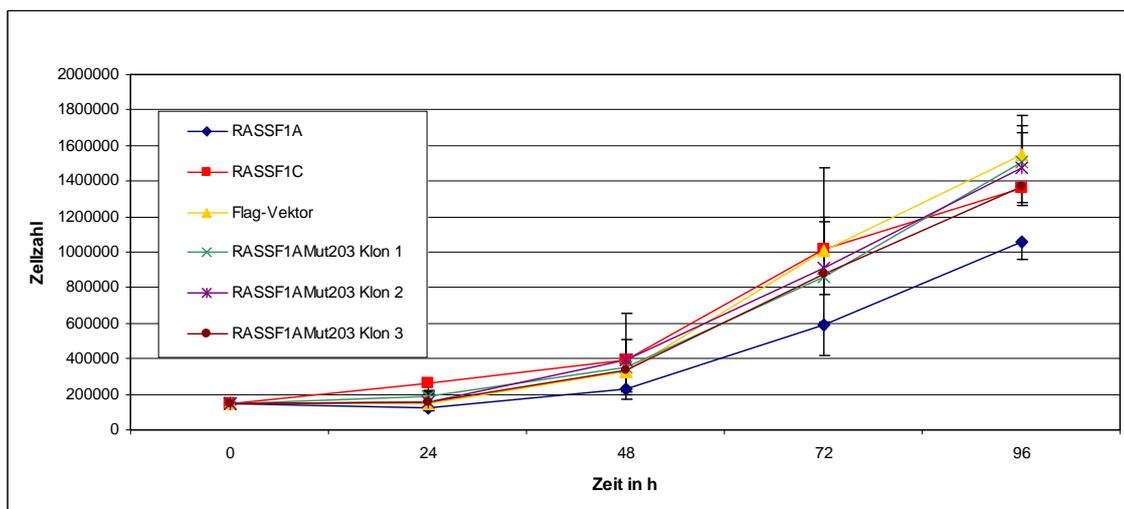


Abbildung 24. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1AMut203 (drei Klone) exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). In drei unabhängigen Experimenten wurden 150000 Zellen in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl ermittelt.

#### 3.4.1.2.4 Proliferation nach Deletion ganzer Domänen

Um Anhaltspunkte zu erhalten, welche Domäne für den wachstumsinhibierenden Effekt von RASSF1A verantwortlich sind, wurde Wachstumskurven von stabil transfizierten Klonen aufgezeichnet, die eine Deletion der C1 Domäne bzw. der C1 und ATM Domäne aufwiesen. Nach Deletion der C1 Domäne ging der proliferationshemmende Effekt von RASSF1A verloren, während bei zusätzlicher Deletion der ATM Domäne die Proliferation wieder gehemmt wurde (Abbildung 25).

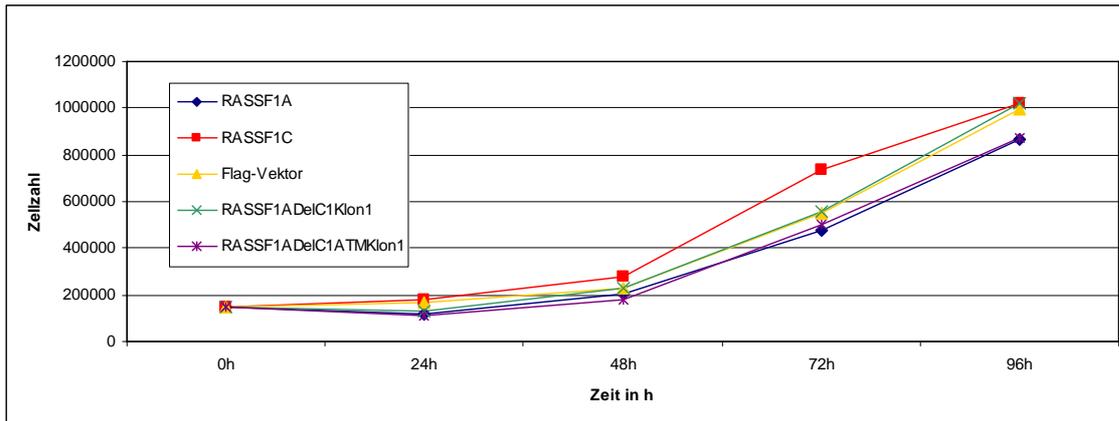


Abbildung 25. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C RASSF1ADelC1 und RASSF1ADelC1ATM exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). 150000 Zellen wurden in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl in Doppelbestimmung ermittelt.

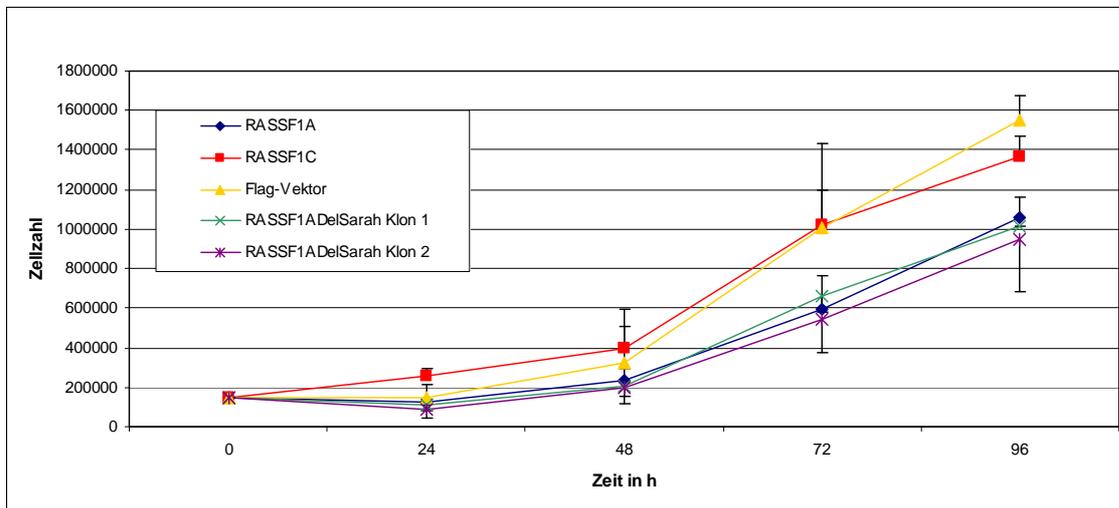


Abbildung 26. Wachstumskurven von A549 Zellen, die stabil RASSF1A, RASSF1C und RASSF1ADelSARAH (zwei Klone) exprimierten sowie der Vektor-Kontrolle (Flag). In drei unabhängigen Experimenten wurden 150000 Zellen in je ein Well einer 6-Well Schale ausgesät und alle 24 h wurde die Zellzahl ermittelt.

In Abbildung 26 wurden Wachstumskurven in der Klon RASSF1A, RASSF1C, der Vektorkontrolle und zweier Klone RASSF1ADelSARAH in Dreifachbestimmung dargestellt. Zu beobachten war, dass die Reexpression von RASSF1A in einer reduzierten Proliferation der Zellen im Vergleich zu RASSF1C und Vektorkontrolle resultierte. Die Überexpression von RASSF1C hatte im Vergleich zur Vektorkontrolle eine leichte Erhöhung der Proliferationsrate zur Folge. Die Reduktion der Proliferation durch die Expression von RASSF1A wurde durch die Deletion der SARAH Domäne in RASSF1A leicht verstärkt.

## 3.4.1.3 Wachstum im weichen Agar

Die Koloniebildung im weichen Agar, das heißt ohne Zell-Zell-Kontakte, stellt eine weitere Methode dar, mit der das Wachstums- und Proliferationsverhalten von Zellen untersucht werden. Dazu wurden stabil transfizierte A549 Zellen in die Oberschicht der Agarplatte eingegossen. Die Größen der Kolonien (je 20 pro Ansatz) wurde nach 4 Wochen Wachstum am Mikroskop Leica DMIRB mit dem Programm MetaVue bestimmt (Abbildung 27).

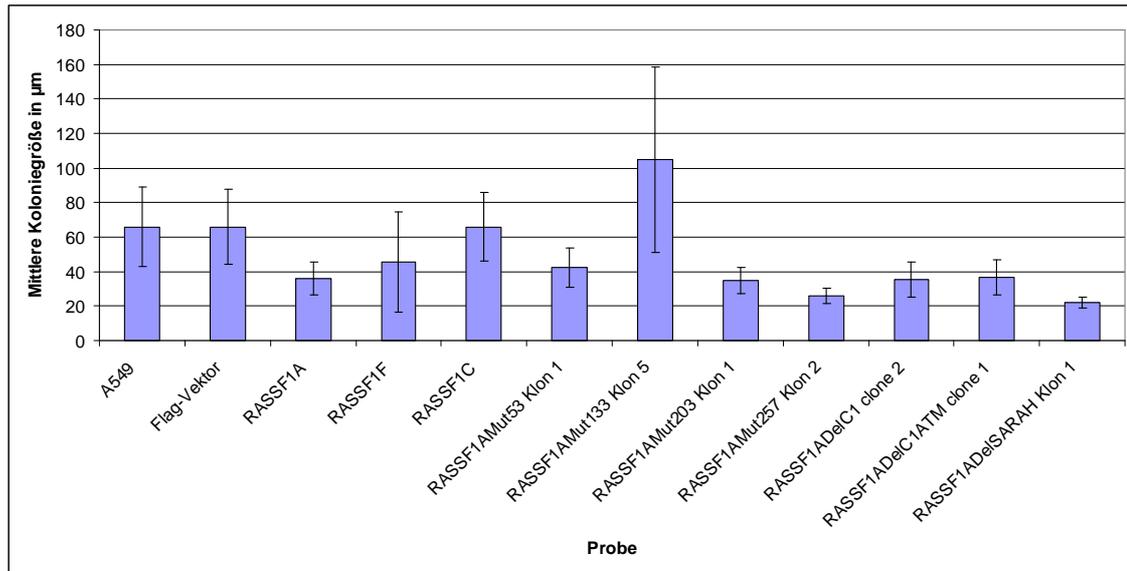


Abbildung 27. Mittlere Koloniegrößen der im weichen Agar gebildeten Kolonien nach 4 Wochen Wachstum. Es wurden die Größen von mindestens 20 Kolonien je Klon vermessen und der Mittelwert bestimmt.

In Abbildung 27 wurden die mittleren Koloniegrößen des Wachstumsexperimentes im weichen Agar dargestellt. Wird RASSF1A in A549 reexprimiert, bildeten die Zellen kleinere Kolonien (36  $\mu\text{m}$ ), verglichen mit A549 (66  $\mu\text{m}$ ) und der Vektorkontrolle (66  $\mu\text{m}$ ), aus. Die Koloniegröße war bei Überexpression von RASSF1C mit der der Kontrollen vergleichbar (66  $\mu\text{m}$ ). Wurde RASSF1F reexprimiert, so lag die mittlere Koloniegröße bei 46  $\mu\text{m}$ , also leicht erhöht zu RASSF1A. Die Expression mutagenisierter Formen von RASSF1A hatte verschiedene Effekte, so bewirkte die Mutation im Codon 133 eine ca. dreifach so hohe mittlere Koloniegröße, verglichen mit RASSF1A. Die Mutationen im Codon 53 und 203 resultierten in Koloniegrößen von 42  $\mu\text{m}$  bzw. 35  $\mu\text{m}$ , also einer leichten Erhöhung bei Mutation 53. Die Mutation im Codon 257 führte zur weiteren Abnahme der Koloniebildung auf 26  $\mu\text{m}$ . Deletionen der C1 Domäne (35  $\mu\text{m}$ ) bzw. der C1 und der ATM Domäne (37  $\mu\text{m}$ ) bewirkte keine starken Veränderungen der mittleren Koloniegröße. Die Deletion der SARAH Domäne jedoch führte zu einer mittleren Koloniegröße von 22  $\mu\text{m}$  und damit zu einer Abnahme der Koloniebildung, verglichen mit RASSF1A.

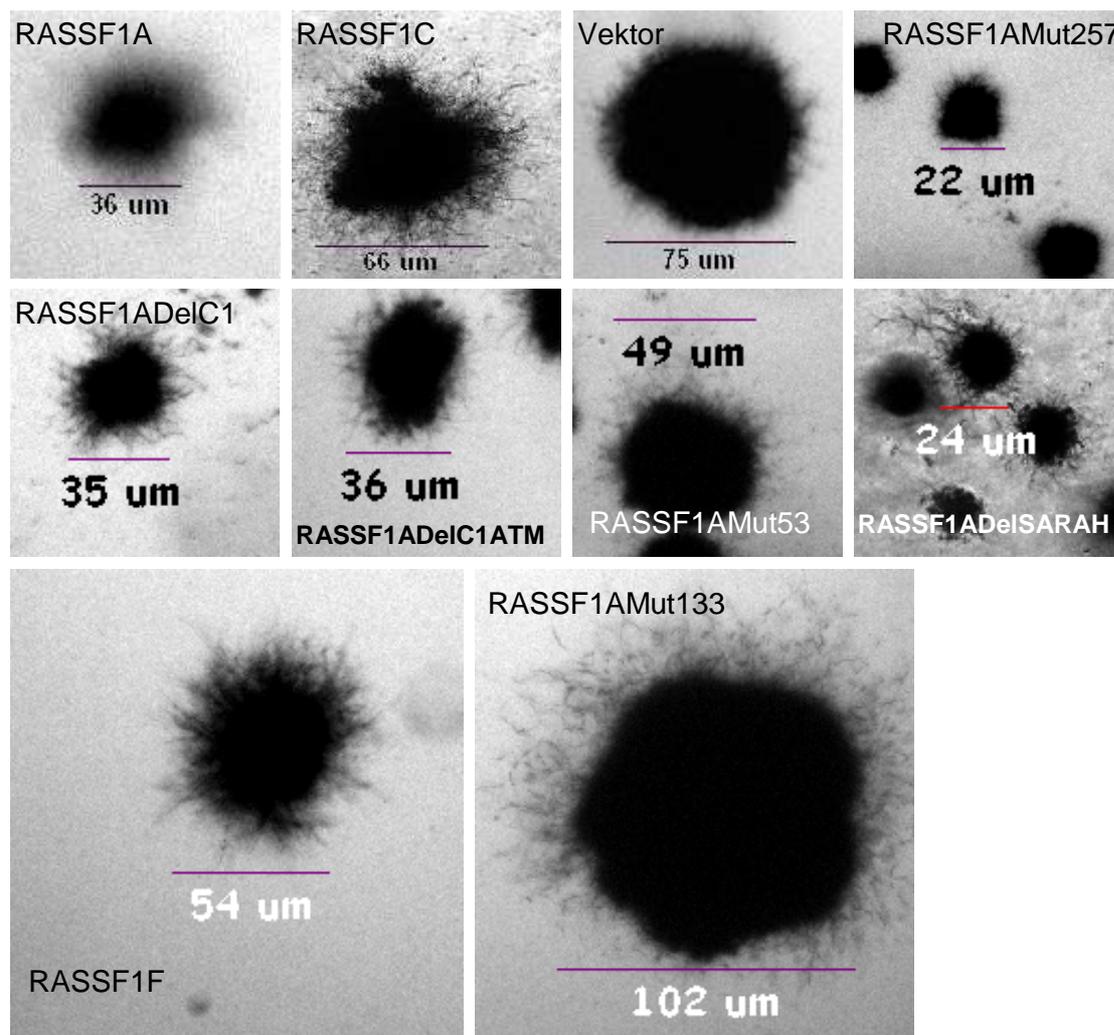


Abbildung 28. Koloniebildung in weichem Agar verschiedener stabil transfizierter A549 Zellen, die RASSF1A, RASSF1C, RASSF1AMut257, RASSF1ADelC1, RASSF1ADelC1ATM, RASSF1AMut53, RASSF1ADelSARAH, RASSF1F und RASSF1AMut133 exprimierten im Vergleich zur Vektorkontrolle. Die Zellen wurden in weichen Agar gegossen und wuchsen über vier Wochen zu Kolonien aus, die nach der Färbung mit Iodonitrotetrazoliumchlorid am Mikroskop Leica DMIRB mit dem Programm MetaVue vermessen wurden. Die Abbildung zeigt Beispielkolonien, zur Auswertung wurden mindestens 20 Kolonien pro Ansatz herangezogen.

### 3.4.2 Migrationsverhalten der stabilen Klone RASSF1A, RASSF1AMut203, RASSF1AMut133 und RASSF1ADelSARAH

Die Fähigkeit, durch eine Kollagenmatrix zu migrieren, bzw. die Veränderung im Migrationsverhalten von RASSF1A nach Mutation des Codons 133 bzw. des Codons 203 und Deletion der SARAH Domäne, wurde untersucht. Dabei wurden stabil transfizierte Zellen in eine künstliche Kollagenmatrix gegossen und das Wanderungsverhalten über bis zu 2 Tage am Mikroskop aufgezeichnet (alle 10 min 1 Bild). Ausgewertet wurde mit dem Programm Multitrack 4.2 (Mediquant, Halle, Deutschland). Die durchschnittlichen Wanderungsgeschwindigkeiten wurden in einer Doppelbestimmung mit zwei Klonen, die die SARAH deletierte Form von RASSF1A

exprimierten (Abbildung 29A) und in einer Dreifachbestimmung mit zwei Klonen, die RASSF1AMut203 bzw. RASSF1AMut133 exprimierten (Abbildung 29B und C), durchgeführt.

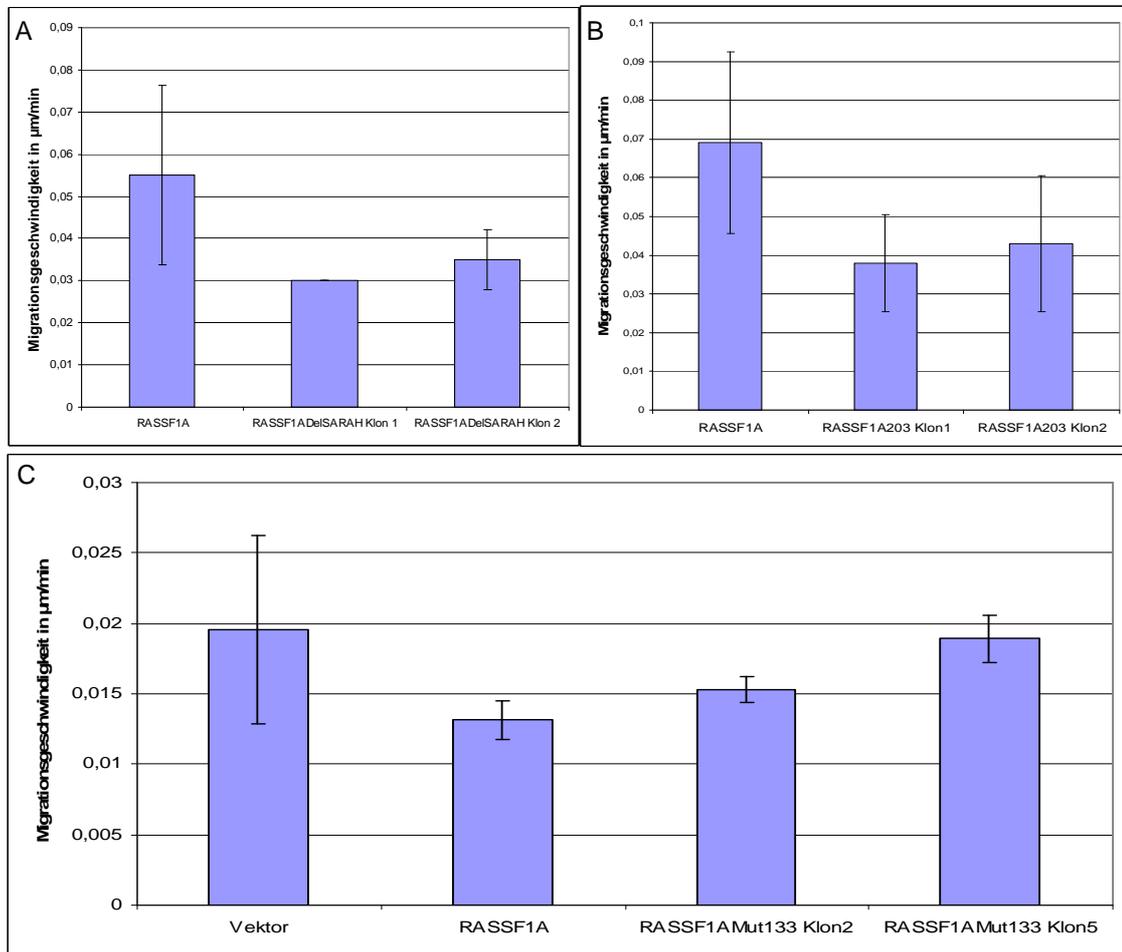


Abbildung 29. Migrationsgeschwindigkeiten in  $\mu\text{m}/\text{min}$  von stabil transfizierten Zellen, die RASSF1A, RASSF1A DelSARAH (A), RASSF1AMut203 (B) und RASSF1AMut133 (C) exprimierten sowie der Vektorkontrolle. Die Zellen wurden in eine künstliche Kollagenmatrix gegossen und bis zu zwei Tagen unter dem Mikroskop beobachtet, alle 10 min wurde ein Bild aufgenommen.

Dabei stellte sich heraus, dass die Migrationsfähigkeit nach Deletion der SARAH Domäne ( $0,03 \mu\text{m}/\text{min}$  Klon 1 und  $0,035 \mu\text{m}/\text{min}$  Klon 2), ebenso wie nach Mutation des Codons 203 ( $0,038 \mu\text{m}/\text{min}$  Klon 1 bzw.  $0,043 \mu\text{m}/\text{min}$  Klon 2) vermindert war, verglichen mit RASSF1A ( $0,055 \mu\text{m}/\text{min}$  bzw.  $0,069 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Liegt eine Mutation des Codons 133 vor, so erhöht sich die Motilität der Zellen, gegenüber den Zellen die RASSF1A exprimieren ( $0,015 \mu\text{m}/\text{min}$  bzw.  $0,019 \mu\text{m}/\text{min}$  versus  $0,013 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Die Migrationsgeschwindigkeiten der Einzelexperimente variieren stark, da die Kollagenmatrix für jedes Experiment neu hergestellt wird und die Bedingungen verschieden sind.

### 3.4.3 Lokalisationsuntersuchungen

Zur Untersuchung der Lokalisation von RASSF1A, RASSF1C und den Formen RASSF1ADelSARAH und RASSF1AMut203 wurden diese in den Vektor pEYFP-C2 kloniert und transient in HEK293 transformiert. Es erfolgte eine Antikörperfärbung gegen  $\alpha$ -Tubulin und eine Zellkernfärbung mit DAPI. Die Ansätze wurden am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (Abbildung 30). Die Kerne/Chromosomen waren mittels DAPI Färbung in blauer Fluoreszenz,  $\alpha$ -Tubulin nach Antikörperfärbung in roter Fluoreszenz und die YFP-Fusionsproteine YFP-RASSF1A, YFP-RASSF1C, YFP-RASSF1ADelSARAH, YFP-RASSF1CDeISARAH und YFP-RASSF1AMut203 in grüner Fluoreszenz am Mikroskop zu detektieren. Die YFP-Fusionsproteine YFP-RASSF1A, YFP-RASSF1C, YFP-RASSF1ADelSARAH, YFP-RASSF1CDeISARAH und YFP-RASSF1AMut203 zeigten eine Kolokalisation mit  $\alpha$ -Tubulin und damit zu den Spindeln während der Mitose. Bei YFP-RASSF1C war es auffällig, dass die Kolokalisation eher im Bereich der Spindelpole und Centrosomen vorlag. Die Ansätze YFP-RASSF1C, YFP-RASSF1CDeISARAH, YFP-RASSF1A und YFP-RASSF1AMut203 zeigten normale Mitosen, während bei Expression von YFP-RASSF1ADelSARAH die Mitosen einen abnormen Verlauf zeigten (Abbildung 30 und Abbildung 31). So waren häufig die Chromosomen ungleich verteilt (Abbildung 31, a,b,d,f,g,h), die Spindelfasern verstärkt (Abbildung 31, a,b,e,f) und die Polarität der Spindelfaseranordnung war aufgehoben (Abbildung 31). Ebenso sind Zellen aufgetreten, bei denen mehr als zwei Spindelpole vorlagen (Abbildung 31, c).

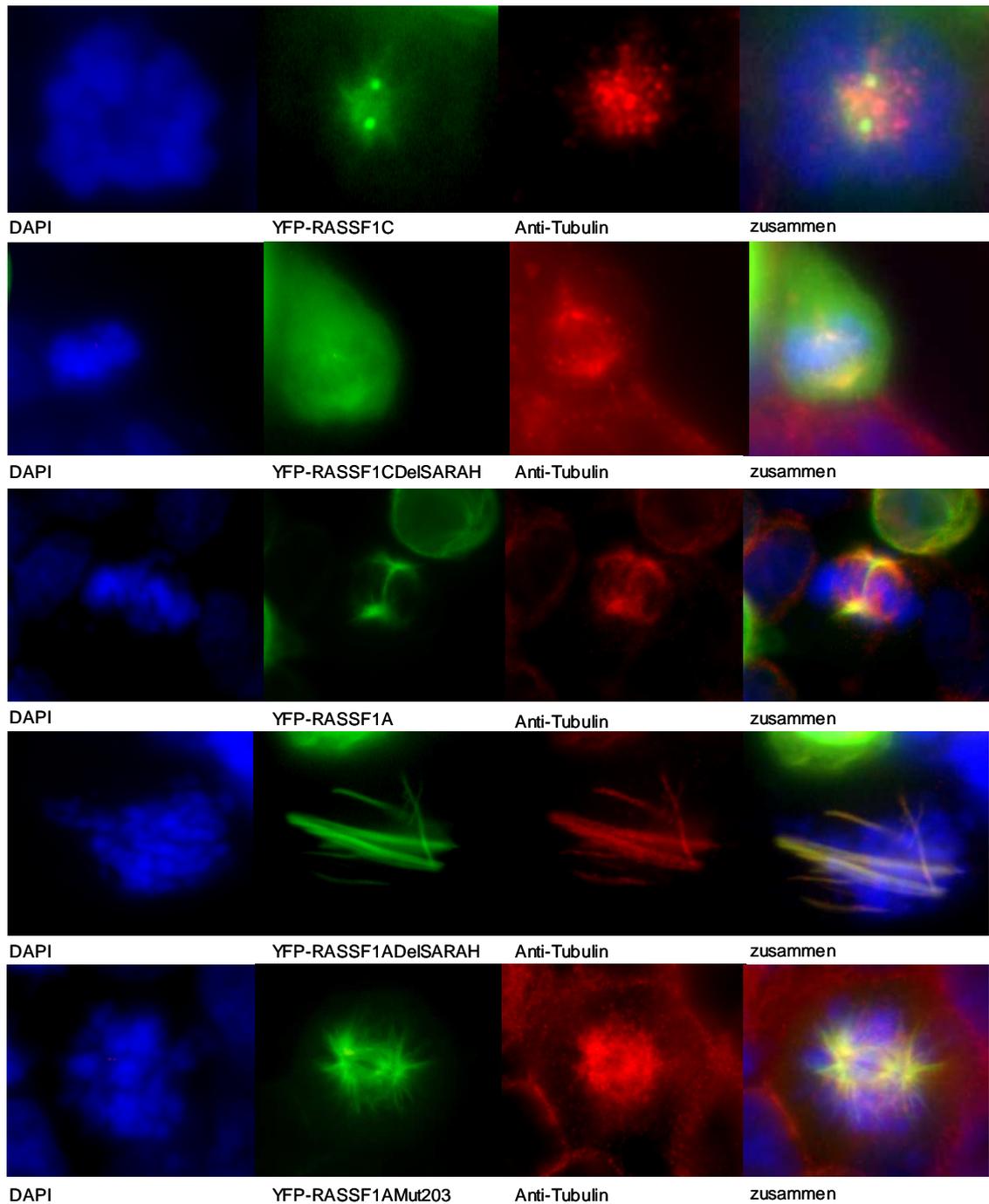


Abbildung 30. Lokalisation von RASSF1C, RASSF1CΔSARAH, RASSF1A, RASSF1AΔSARAH, und RASSF1AMut203 in HEK293 nach transienter Transfektion in HEK293 Zellen. Die Ansätze wurden mit Anti- $\alpha$ -Tubulin- Antikörpern und DAPI (Kernfärbung) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen.

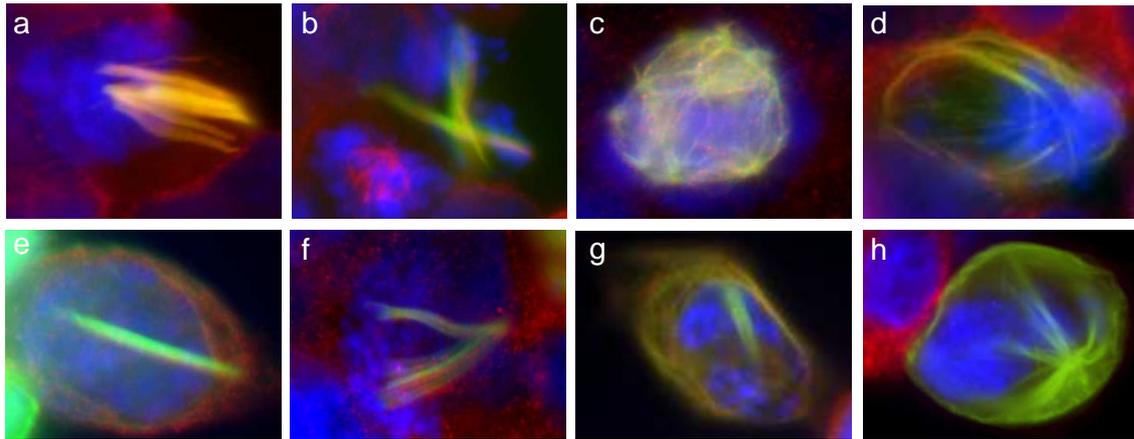


Abbildung 31. Abnorme Spindeln, Spindelpolanordnungen und Chromosomenungleichverteilungen in HEK293 nach transienter Expression von RASSF1ADelSARAH. Es wurde mit Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper und DAPI (Kernfärbung) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen. Trotz der Kolo-kalisation zu Tubulin, zeigten sich starke Veränderungen beim Verlauf der Mitose.

Der Anteil von Mitosen bei den transfizierten Zellen wurde bestimmt. Die Mitoserate war bei dem Ansatz YFP-RASSF1A mit 8,6% mehr als doppelt so hoch wie bei YFP-RASSF1ADelSARAH (3,4%). Zudem waren 74,3% der Mitosen nach Transfektion mit YFP-RASSF1ADelSARAH abnorm, während die Rate bei Transfektion mit YFP-RASSF1A nur bei 0,3% lag (Abbildung 32).

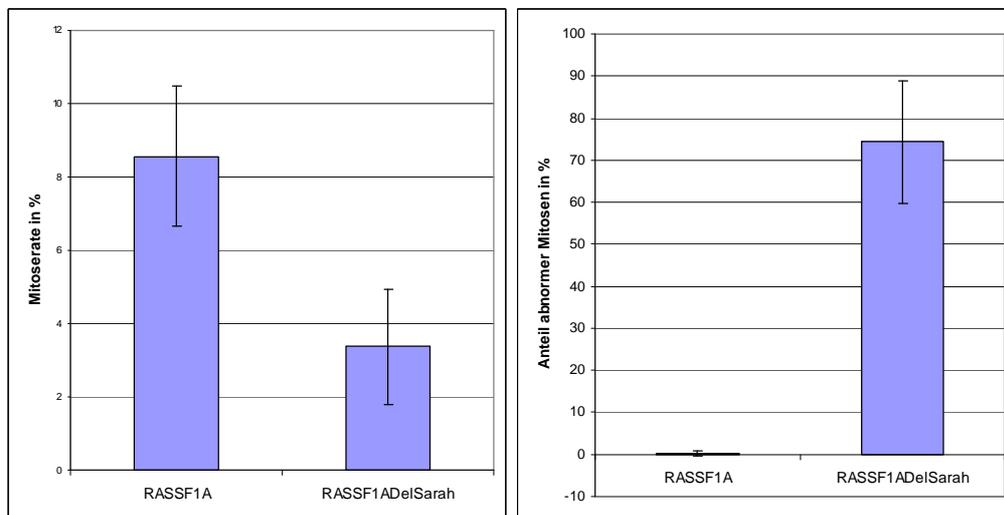


Abbildung 32. Anteil Mitosen bzw. abnormer Mitosen nach Expression von YFP-RASSF1A bzw. YFP-RASSF1ADelSARAH in HEK293. Ca. 1000 Transfizierte Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten ausgezählt und der Anteil mitotischer Zellen, sowie abnormer mitotischer Zellen wurde bestimmt.

Der Anteil abnormer Mitosen in den Ansätzen YFP-RASSF1ADelSARAH war signifikant ( $p=1,8 \times 10^{-27}$ , Chi-Quadrat Test) höher, verglichen mit den Zellen, die YFP-RASSF1A exprimierten. Signifikant ( $p=3,4 \times 10^{-9}$ , Chi-Quadrat Test) vermindert war die Mitoserate von Zellen, die YFP-RASSF1ADelSARAH bildeten, verglichen mit YFP-

RASSF1A transfizierten Zellen. Ebenfalls signifikant ( $p=4,3 \times 10^{-6}$ , Chi-Quadrat Test) erniedrigt war die Mitoserate in YFP-RASSF1C exprimierenden Zellen, verglichen mit YFP-RASSF1A exprimierenden Zellen (Daten nicht gezeigt). Auffällig war also, dass in den Ansätzen YFP-RASSF1C und YFP-RASSF1ADelSARAH weniger mitotische Zellen zu registrieren waren als in den RASSF1A Ansätzen. Nach Transfektion mit RASSF1A akkumulieren Zellen in der frühen Mitose.

### 3.4.4 Apoptoserate

Der Promoter von *RASSF1A* ist in der Lungenkrebszelllinie A549 hypermethyliert und RASSF1A wird nicht exprimiert. Die Induktion der Apoptose nach Reexpression von RASSF1A bzw. der mutagenisierten und deletierten RASSF1A Formen wurde mit Hilfe von TUNEL Färbungen nach transients Expression in A549 untersucht.

#### 3.4.4.1 Apoptoserate nach Reexpression von RASSF1

Die Krebszelllinie A549 wurde transient mit den Konstrukten pCMV-Tag1-RASSF1A, pCMV-Tag1-RASSF1C, pCMV-Tag1-RASSF1F, pCMV-Tag1 sowie den mutagenisierten Formen von RASSF1A transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion erfolgte die TUNEL Färbung. Apoptotische Zellkerne wurden im Verhältnis zu DAPI gefärbten Kernen am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. In Abbildung 33 wurde die Induktion der Apoptose durch verschiedene Konstrukte dargestellt.

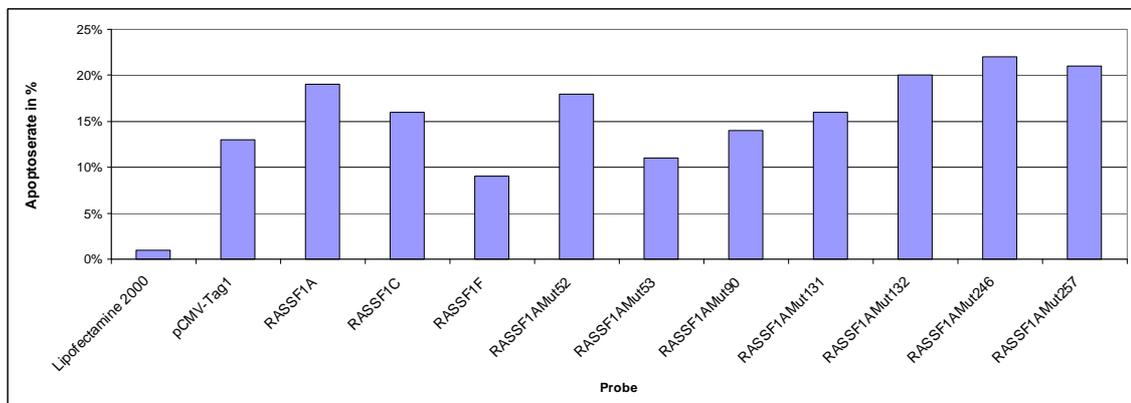


Abbildung 33. Apoptoserate nach transients Transfektion von Flag-RASSF1A, Flag-RASSF1C, Flag-RASSF1F und der mutagenisierten RASSF1A-Konstrukte sowie der Vektor-Kontrolle (pCMV-Tag1) in A549 Zellen. Apoptotische Zellkerne wurden mit Hilfe der TUNEL Färbung fluoreszenzmarkiert und im Verhältnis zu DAPI gefärbten Zellkernen ausgezählt.

Die Kontrolle, bei der kein Plasmid verwendet wurde (Lipofectamine 2000), zeigte eine Apoptoserate von 1%. Die Vektorkontrolle pCMV-Tag1 induzierte 13% Apoptose, bei dem Ansatz RASSF1A erhöhte sich dieser Wert auf 19%. RASSF1C und RASSF1F wiesen eine deutlich niedrigere (16% bzw. 8%) Apoptoserate auf. Eine Mutation im Codon 52 von RASSF1A bewirkte keine Veränderung, während die Mutationen im Codon 53 und 90 eine Reduktion (auf 11% bzw. 14%) der Induktion der Apoptose hervorriefen. Mit 16% war die Apoptoserate bei Ansatz RASSF1AMut131 mit der von

RASSF1C vergleichbar. Wurden Konstrukte verwendet, die eine Mutation in den Codons 132, 246 und 257 des Gens RASSF1A trugen, so erhöhte sich die Apoptoserate leicht (20%, 22% bzw. 21%) verglichen mit RASSF1A.

Für die Konstrukte pCMV-Tag1-RASSF1A, pCMV-Tag1-RASSF1AMut53, pCMV-Tag1-RASSF1AMut131 und pCMV-Tag1-RASSF1AMut246 wurde das Experiment in einer Vierfachbestimmung wiederholt (Abbildung 34). Die Induktion der Apoptose lag bei RASSF1A mit 21,4% höher als bei der Vektorkontrolle (17,2%). Die Mutation des Codons 53 bewirkte eine Abschwächung der Apoptoserate auf 14,9%, während die Mutation im Codon 131 eine ähnliche Apoptoserate (18,2%) wie die Vektorkontrolle aufwies. Die Mutation des Codons 246 bewirkte eine leichte Erhöhung der Apoptoserate (22%) im Vergleich zu RASSF1A. Die Apoptoserate nach transienter Transfektion in der Brustkrebszelllinie ZR75-1 erbrachte ähnliche Ergebnisse (nicht gezeigt).

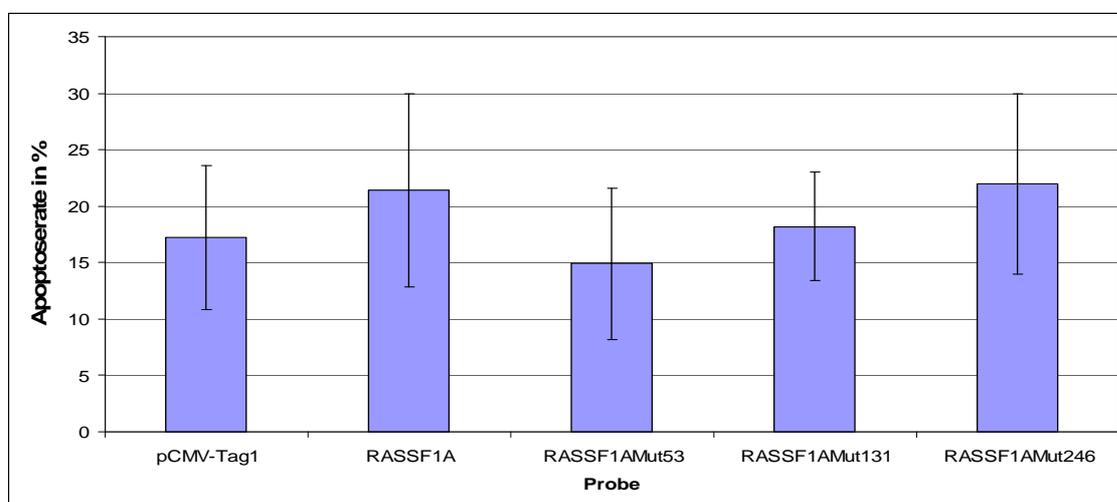


Abbildung 34. Apoptoserate nach transienter Expression von Flag-RASSF1A, Flag-RASSF1AMut53, Flag-RASSF1AMut131 und Flag-RASSF1AMut246 sowie der Vektor-Kontrolle (pCMV-Tag1) in A549 Zellen in Vierfachbestimmung. Apoptotische Zellkerne wurden mit Hilfe der TUNEL Färbung fluoreszenzmarkiert und im Verhältnis zu DAPI gefärbten Zellkernen ausgezählt.

Der Einfluss der Deletion der SARAH Domäne und der Mutation im Codon 203 auf die Apoptoserate wurde nach transienter Expression der Proteine YFP-RASSF1A, YFP-RASSF1C, YFP-RASSF1ADelSARAH und YFP-RASSF1AMut203 in A549 untersucht. Abbildung 35 zeigt apoptotische, mit TUNEL markierte Zellen (rote Fluoreszenz), die im Verhältnis zu transfizierten, grün fluoreszierenden Zellen am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt wurden.

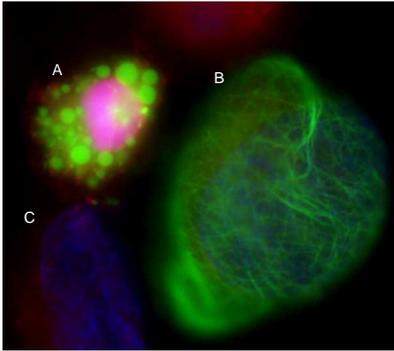


Abbildung 35. TUNEL Experiment in A549 Zellen. Transient YFP-RASSF1 $\Delta$ DelSARAH exprimierende A549 Zellen wurden mit TUNEL und DAPI gefärbt. A stellt eine transfizierte (grüne Fluoreszenz), apoptotische (rote TUNEL Fluoreszenz) Zelle dar, während B eine transfizierte, nicht apoptotische Zelle und C eine nicht transfizierte, nicht apoptotische Zelle zeigt.

In Abbildung 36 wurden die Apoptoseraten in Dreifachbestimmung dargestellt. Die Apoptoserate nach Expression von YFP-RASSF1A war mit 27,7% höher als bei Expression von YFP-RASSF1C. Die Deletion der SARAH Domäne in RASSF1A bewirkte einen weiteren Anstieg der Apoptoserate auf 39% ebenso, wie die Mutation im Codon 203, die in einer Apoptoserate von 40,4% resultierte.

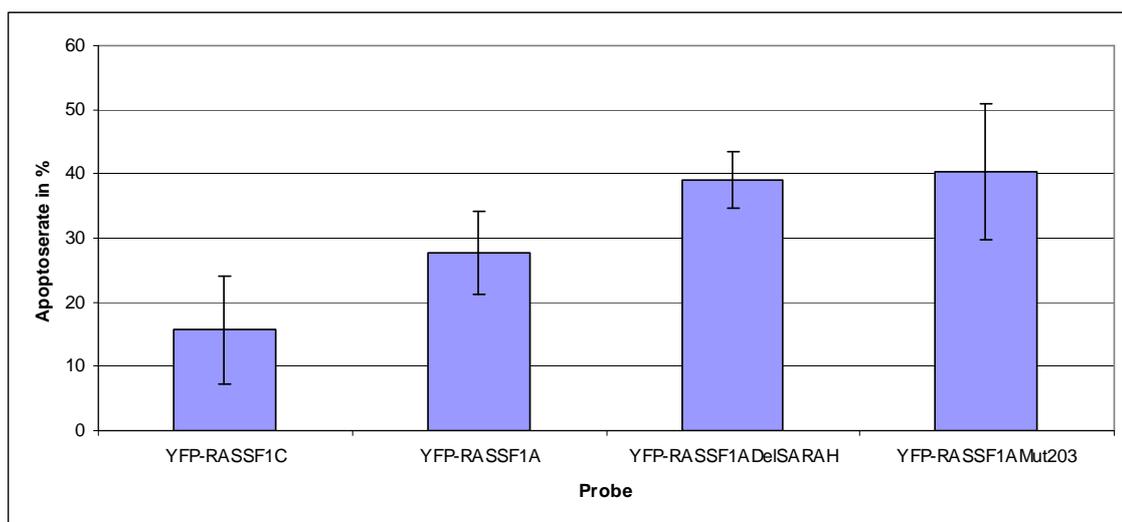


Abbildung 36. Apoptoserate nach transienter Expression der Proteine YFP-RASSF1C, YFP-RASSF1A, YFP-RASSF1A $\Delta$ DelSARAH und YFP-RASSF1AMut203 in A549. Mit TUNEL markierte Zellen wurden im Verhältnis zu transfizierten Zellen ausgezählt. Das Experiment erfolgte in einer Dreifachbestimmung.

Für die Form YFP-RASSF1AMut133 wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt, in beiden Fällen war der Anteil apoptotischer Zellen erniedrigt verglichen mit dem Ansatz YFP-RASSF1A (Mittelwerte: 22% YFP-RASSF1AMut133, 30% YFP-RASSF1A und 21% YFP-RASSF1C, Daten nicht gezeigt). Die Spleißvariante RASSF1F wurde ebenfalls in einer Zweifachbestimmung untersucht. Auch bei diesem Ansatz wurde eine Reduktion der Apoptoserate im Vergleich zu RASSF1A ermittelt (Mittelwerte: 18% YFP-RASSF1F, 24% YFP-RASSF1A, Daten nicht gezeigt). Die

Apoptoserate des Ansatzes YFP-RASSF1ADelSARAH war signifikant ( $p=1,9 \times 10^{-6}$ , Chi-Quadrat-Test bzw.  $p=6,3 \times 10^{-25}$ , Chi-Quadrat-Test) erhöht verglichen mit den Ansätzen YFP-RASSF1A und YFP-RASSF1C. Signifikant ( $p=2,1 \times 10^{-9}$ , Chi-Quadrat-Test) erhöht war ebenfalls die Induktion der Apoptose nach Expression von YFP-RASSF1A verglichen mit der Apoptoseinduktion bei YFP-RASSF1A exprimierenden Zellen. Die Apoptoseraten des YFP-RASSF1C Ansatzes sind vergleichbar mit denen der YFP-Vektorkontrolle (Daten nicht gezeigt).

#### 3.4.4.2 Medikamenteninduzierte Apoptose

##### 3.4.4.2.1 Einfluss von Nocodazol auf transient transfizierte A549 und HEK293 Zellen

In den Zellen der Linien HEK293 und A549 wurden transient YFP, YFP-RASSF1A, YFP-RASSF1C und die mutagenisierten Formen RASSF1AMut133, RASSF1AMut203 und RASSF1ADelSARAH exprimiert. Die Zellen wurden 1 h mit 20  $\mu$ M Nocodazol behandelt und anschließend mit Anti- $\alpha$ -Tubulin und DAPI gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. In Abbildung 37 wurde die stabilisierende Wirkung von RASSF1A, RASSF1C und RASSF1ADelSARAH in HEK293 abgebildet. Verglichen mit einer mitotischen Zelle, die YFP exprimiert und bei der nach Behandlung mit Nocodazol keine Spindeln erkennbar waren (Abbildung 37), sind die Spindeln bei Vorhandensein von YFP-RASSF1A, YFP-RASSF1C und YFP-RASSF1ADelSARAH (Abbildung 37) stabilisiert und eine Kolo-kalisation von Tubulin zu den YFP-Fusionsproteinen war erkennbar. Auch bei den Ansätzen YFP-RASSF1AMut133 und YFP-RASSF1AMut203 wurde der tubulinstabilisierende Effekt sichtbar (Daten nicht gezeigt). In A549 konnte ebenfalls ein stabilisierender Effekt festgestellt werden, so waren noch Tubulinstrukturen nach Nocodazolbehandlung sichtbar, wenn die Zellen YFP-RASSF1A, YFP-RASSF1C (Abbildung 38), YFP-RASSF1ADel-SARAH, YFP-RASSF1AMut133, YFP-RASSF1AMut203 (Daten nicht gezeigt) exprimierten, wenngleich die Form weniger filigran und verzweigt war, verglichen mit unbehandelten Zellen (Abbildung 38).

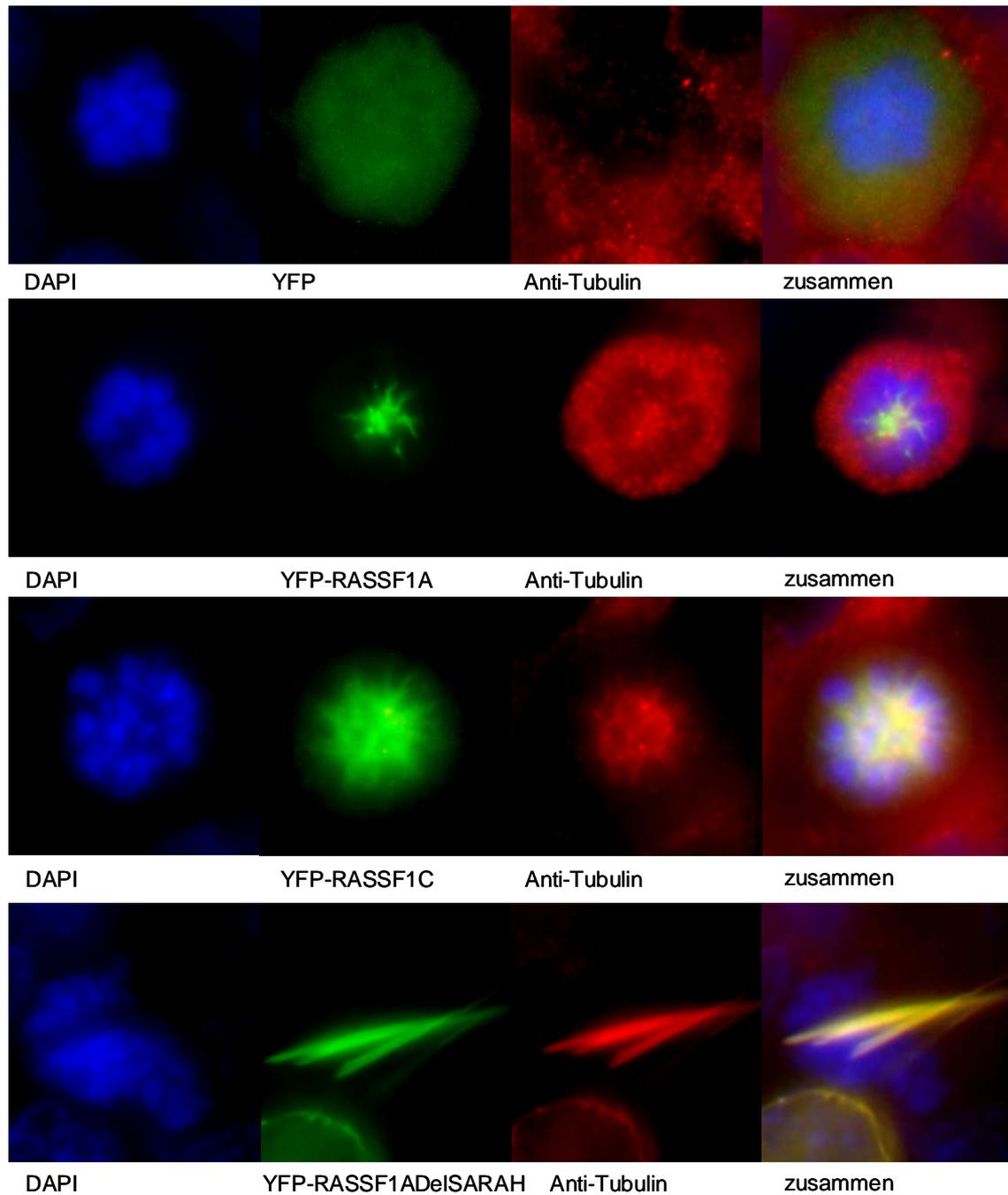


Abbildung 37. Stabilisierung der Tubulinstrukturen durch YFP-RASSF1A, YFP-RASSF1C und YFP-RASSF1ADeISARAH in HEK293 während der Mitose und nach Behandlung mit Nocodazol, verglichen mit YFP exprimierenden Zellen. HEK293 Zellen wurden transient transfiziert und nach 24 h für 1h mit 20  $\mu$ M Nocodazol behandelt. Die Ansätze wurden mit Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern und DAPI (Kernfärbung) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen.

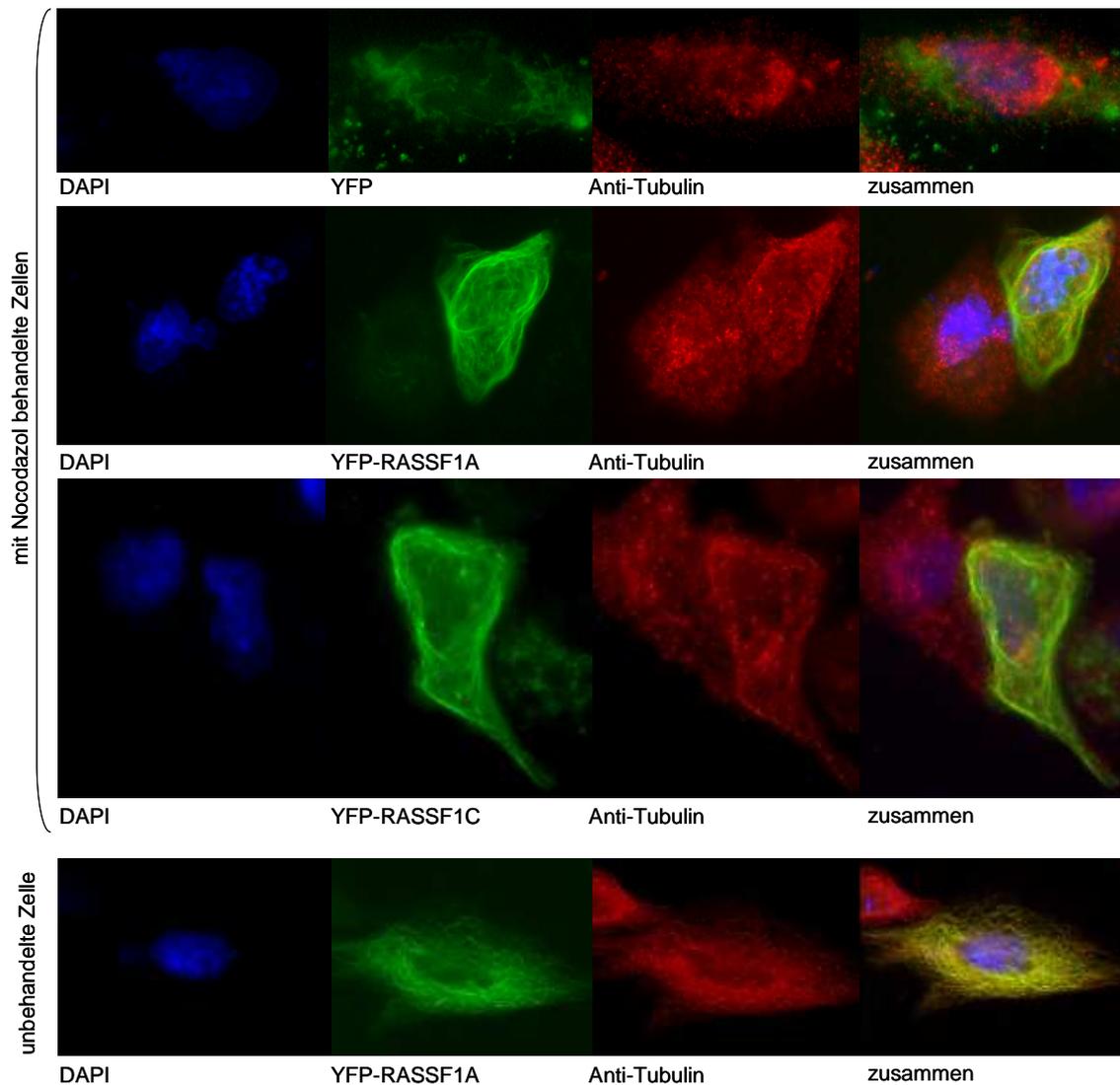


Abbildung 38. Stabilisierung der Tubulinstrukturen durch YFP-RASSF1A und YFP-RASSF1C in A549 nach Behandlung mit Nocodazol, verglichen mit YFP exprimierenden Zellen. A549 Zellen wurden transient transfiziert und nach 24 h für 1h mit 20  $\mu\text{M}$  Nocodazol behandelt. Die Ansätze wurden mit Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern und DAPI (Kernfärbung) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei einer 630fachen Vergrößerung aufgenommen.

#### 3.4.4.2 Einfluss von Paclitaxel auf stabil RASSF1 exprimierende A549 Zellen

Stabil transfizierte A549 Zellen, die RASSF1A, RASSF1C, RASSF1F, RASSF1AMut133, RASSF1AMut203 bzw. RASSF1ADelSARAH als Flag-Fusion exprimierten, wurden auf Deckgläschen kultiviert und 18 h mit 0,1  $\mu\text{M}$  Paclitaxel inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Ethanol fixiert und mit Hoechst 33342 gefärbt. Am Mikroskop wurde die Rate der apoptotischen Zellkerne, verglichen mit mitotischen und normalen Zellkernen, bestimmt. In Abbildung 39 wurde der Einfluss von Paclitaxel auf die Induktion der Apoptose dargestellt. RASSF1A exprimierende Zelle gehen in 17% der Fälle in Apoptose, während die Rate in der Vektorkontrolle lediglich bei 8% und bei Behandlung von A549 bei 6% lag. Bei

Expression von RASSF1C und RASSF1F stieg der Anteil apoptotischer Zellkerne auf 19% bzw. 30%. Nach Deletion der SARAH Domäne schwächte sich der apoptoseinduzierende Effekt von Paclitaxel auf 10% (Klon1) bzw. 8% (Klon2) ab (Abbildung 39). Weiterführend wurde der Einfluss einer Mutation an den Positionen Codon 133 und Codon 203 in RASSF1A untersucht (Abbildung 39). Die Mutation an Position 133 (18%) hatte kaum Einfluss auf die Rate der durch Paclitaxel induzierten Apoptose. Eine Mutation an der Position 203 (9%) jedoch resultierte in einer stark verminderten Induktion der Apoptose (Abbildung 39).

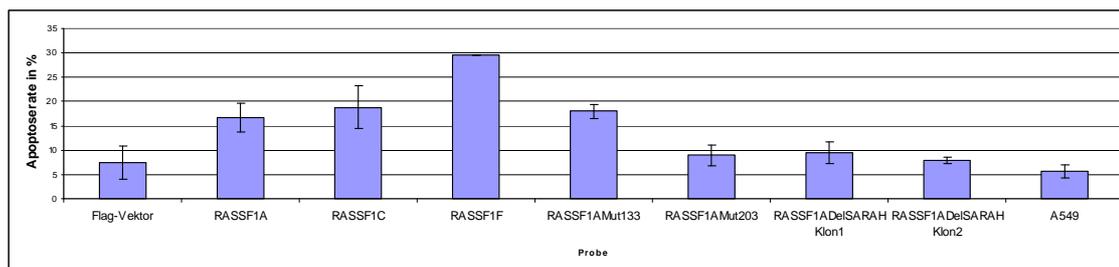


Abbildung 39. Paclitaxel-induzierte Apoptose in stabil transfizierten A549 Zellen, die RASSF1A, RASSF1C, RASSF1F, RASSF1AMut133, RASSF1AMut203 bzw. RASSF1ADelSARAH exprimieren, sowie der Vektorkontrolle (Flag-Vektor) und A549. Die Rate apoptotischer Zellkerne wurde nach 18 h Behandlung mit 0,1  $\mu$ M Paclitaxel der stabil transfizierten A549 Zellen durch Auszählung der mit Hoechst33342 gefärbten Zellkerne am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Die Ansätze wurden in Vierfach- bzw. Doppelbestimmung durchgeführt.

### 3.4.5 Interaktionsstudien

#### 3.4.5.1 Interaktion von RASSF1 mit K-RAS *in vitro*

Die Interaktion von RASSF1A mit K-RAS wurde *in vitro* untersucht. Dazu wurde radioaktiv ( $^{35}$ S) markiertes RASSF1A mit Hilfe des *TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate Systems* generiert. MPB-K-RAS und MBP wurde in E.Coli überexprimiert mit Amylose *Resin* aufgereinigt (Abbildung 40A). Zu dem an die *Resin* gebundenen MPB und MPB-K-RAS-Fusionsprotein wurde das radioaktiv markierte RASSF1A zugegeben, die Bindung erfolgte und die Ansätze wurden mehrfach gewaschen. Die Proben wurden im PAGE-Gel aufgetrennt und nach Trocknung des Gels wurde es mit Hilfe eines *Phosphoscreens* am *Phosphoimager* ausgewertet. In Abbildung 40 wurden die Ergebnisse des Experimentes in Doppelbestimmung (B und C) dargestellt. Es erfolgte eine Bindung von RASSF1A an MPB-K-RAS, während eine Bindung an die Kontrolle MPB nicht (B) bzw. abgeschwächt (C) stattfand.

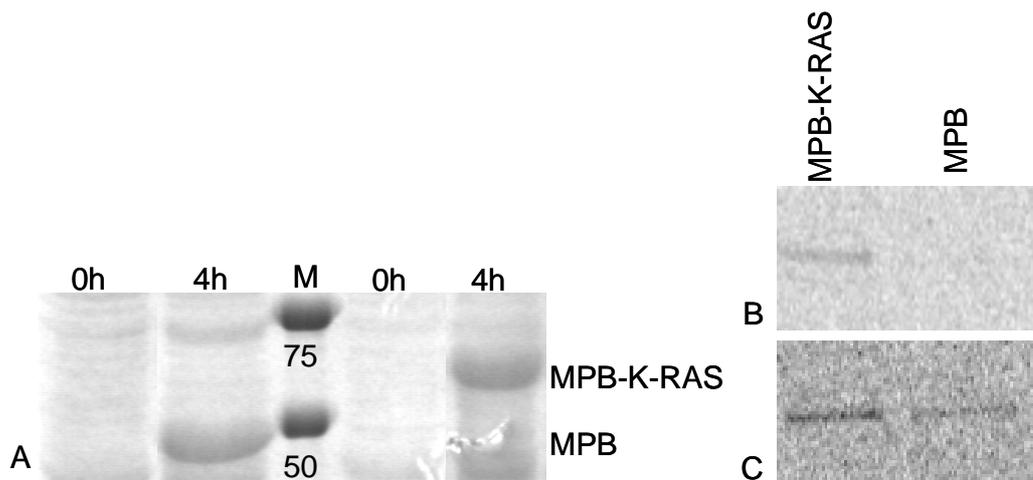
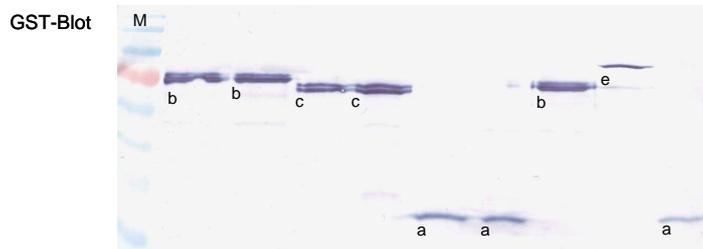
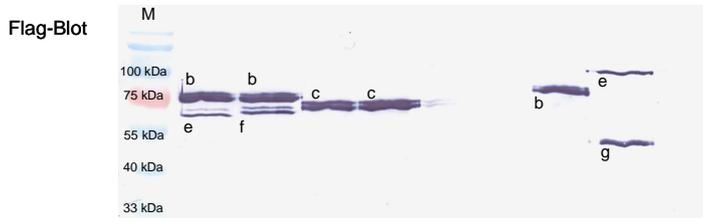


Abbildung 40. In vitro Interaktion der Proteine K-RAS und RASSF1A. Die Proteine MPB-K-RAS (71 kDa) und MPB (45 kDa, Kontrolle) wurden 4 h in *E. coli* überexprimiert, das Gesamtprotein (A) wurde isoliert, der Proteingehalt bestimmt und größtenteils die gleiche Proteinmenge MPB-K-RAS und MPB an Amylose Resin gebunden für die Präzipitation des radioaktiv markierten RASSF1A (B und C) eingesetzt. Mit M wurde der Proteinmarker bezeichnet, Banden der molekularen Masse von 50 und 75 kDa wurden gekennzeichnet. Die Detektion des radioaktiv markierten RASSF1A erfolgte am Phosphorimager. Eine Bindung von RASSF1A erfolgte an MPB-K-RAS jedoch nicht bzw. schwächer an MPB. Es wurde eine Doppelbestimmung (B und C) durchgeführt.

#### 3.4.5.2 Interaktion von RASSF1 mit MST1, MST2 und WW45 *in vivo*

Die Interaktion von RASSF1A, RASSF1C, RASSF1A $\Delta$ elSARAH und RASSF1C $\Delta$ elSARAH mit den Proteinen MST1, MST2 und WW45 wurde *in vivo* untersucht. Die cDNAs der entsprechenden Proteine wurden zunächst in den Vektor pCMV-Tag1 kloniert, so dass bei Transfektion in humane Zellen Flag-Fusionsproteine gebildet werden. Zusätzlich wurde Flag-RASSF1A, Flag-RASSF1C, Flag-RASSF1A $\Delta$ elSARAH, Flag-RASSF1C $\Delta$ elSARAH sowie Flag-MST1 in den Vektor pEBG kloniert, so dass es nach Transfektion in humane Zelllinien zur Expression von GST-Flag-Fusionsproteinen kam. Es erfolgte eine Kotransfektion der zu untersuchenden Partner in HEK293. So wurden folgende zu untersuchende Proteinbindungspartner koexprimiert: GST mit Flag-MST1, Flag-MST2 und Flag-WW45; GST-Flag-RASSF1A bzw. GST-Flag-RASSF1C mit Flag-MST1, Flag-MST2 und Flag-WW45; GST-Flag-RASSF1A $\Delta$ elSARAH bzw. GST-Flag-RASSF1C $\Delta$ elSARAH mit Flag-MST1, Flag-MST2 und GST-Flag-MST1 mit Flag-WW45. Die Präzipitation aus den Gesamtproteinlösungen der verschiedenen Ansätze erfolgte mit GSH-Sepharose, so dass GST-Fusionsproteine präzipitiert wurden und die koexprimierten Flag-Fusionsproteine nur, wenn eine Bindung erfolgte. Detektiert werden konnten beide Partner nach Auftrennung im PAGE Gel und Western Blot mit Anti-Flag-Antikörpern (Abbildung 41). Zusätzlich erfolgte die Kontrolle der Expression der GST-Proteine im Western Blot unter Verwendung von GST-Antikörpern. In Abbildung 41 wurden die Ergebnisse der Interaktionsstudien dargestellt.

GST (a)	-	-	-	-	+	+	-	-	+
GST-Flag-RASSF1A (b)	+	+	-	-	-	-	+	-	-
GST-Flag- (c) RASSF1A $\Delta$ SARAH	-	-	+	+	-	-	-	-	-
GST-Flag-MST1 (d)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Flag-MST1 (e)	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Flag-MST2 (f)	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Flag-WW45 (g)	-	-	-	-	-	-	+	+	+



GST (a)	-	-	-	-	+	+	-	-	+
GST-Flag-RASSF1C (h)	+	+	-	-	-	-	+	-	-
GST-Flag- (i) RASSF1C $\Delta$ SARAH	-	-	+	+	-	-	-	-	-
GST-Flag-MST1 (d)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Flag-MST1 (e)	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Flag-MST2 (f)	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Flag-WW45 (g)	-	-	-	-	-	-	+	+	+

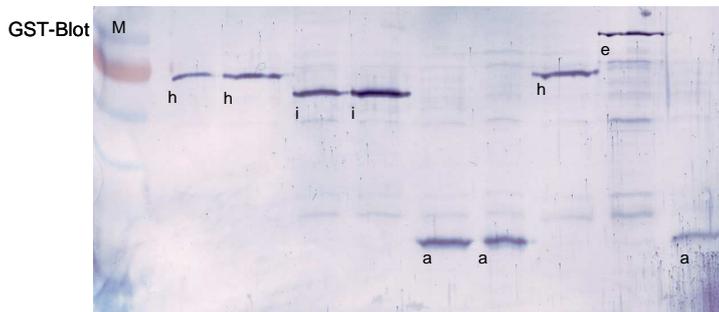
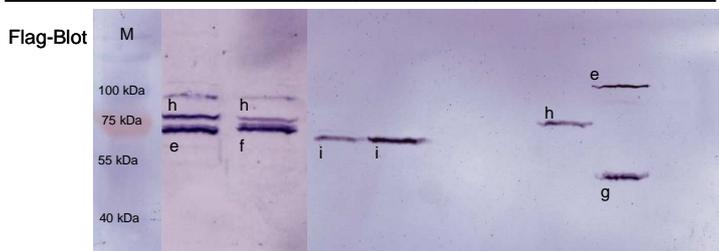


Abbildung 41. Interaktion der Proteine RASSF1A und RASSF1C mit MST1 und MST2 über die SARAH Domäne und Interaktion zwischen MST1 und WW45. Die zu untersuchenden Interaktionspartner wurden in HEK293 als Fusionsproteine koexprimiert, das Gesamtprotein wurde 48 h nach Transfektion isoliert und die GST-Fusionsproteine wurden mittels GSH-Sepharose präzipitiert. Kopräzipitiert wurden Flag-markierte Interaktionspartner. Die Detektion erfolgte im Westen Blot sowohl mit Anti-Flag-Antikörpern (Flag-Blot) als auch mit Anti-GST-Antikörpern (GST-Blot). Mitgeführt wurde ein Protein-Molekulargewichtsstandard (M).

RASSF1A interagiert sowohl mit MST1 als auch mit MST2, jedoch nicht mit WW45. Ist die SARAH Domäne von RASSF1 deletiert, so erfolgte keine Interaktion mit MST1 und MST2 mehr. MST1 interagiert jedoch mit WW45. GST allein zeigte keine Interaktion mit MST1, MST2 und WW45. RASSF1AMut203 interagiert ebenfalls mit MST1 und MST2 (Daten nicht gezeigt). RASSF1C zeigte eine Interaktion mit MST1 und MST1, die jedoch nicht mehr möglich ist, wenn die SARAH Domäne in RASSF1C deletiert wurde (Abbildung 41).

### 3.4.6 Untersuchung der Phosphorylierung von RASSF1A mittels phosphoserinspezifischer Antikörper

Bei dem Serin 203 des Proteins RASSF1A handelt es sich um eine Phosphorylierungsstelle (Rastetter 2006). Mit Hilfe von phospho-serinspezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung an dieser Position untersucht. GST-RASSF1A und die mutagenisierte Form GST-RASSF1AMut203 wurden dazu in HEK 293 überexprimiert und mittels GSH-Sepharose nach Proteinisolation aufgereinigt, anschließend im PAGE Gel aufgetrennt und geblottet. Die Phosphorylierung wurde mit phosphospezifischen Antikörpern im Western Blot untersucht. Die Phosphorylierung von GST-RASSF1A wurde nach Mutation im Codon 203 deutlich abgeschwächt (Abbildung 42). Als Kontrolle wurde GST mitgeführt, das schwach mit dem phosphoserinspezifischen Antikörper detektiert wurde.

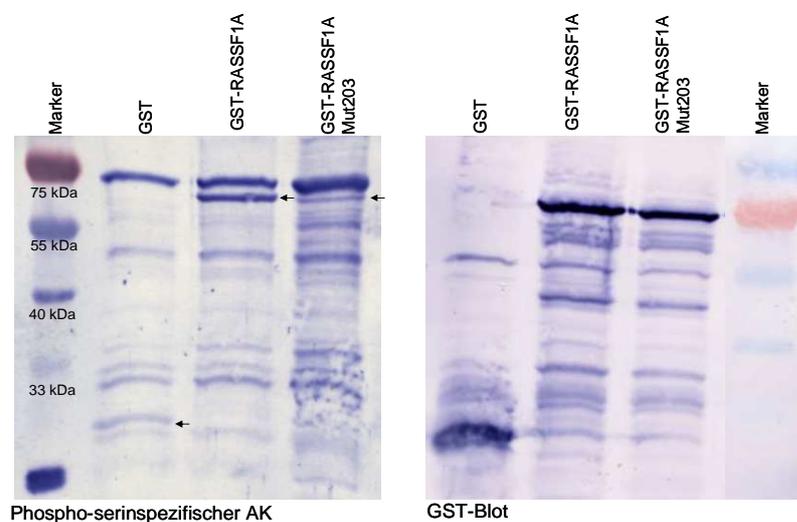


Abbildung 42. Untersuchung der putativen Phosphorylierungsstelle Serin 203 des Proteins mit phosphospezifischen Antikörpern. GST-RASSF1A und GST-RASSF1AMut203 wurden in HEK293 überexprimiert, das Gesamtprotein wurde nach 48 h isoliert und die GST-Fusionsproteine wurden mit GSH-Sepharose aufgereinigt. Im Western Blot wurde mit phospho-serinspezifischen Antikörpern und zur Kontrolle mit Anti-GST-Antikörpern (GST-Blot) detektiert. Mit Pfeilen sind die Proteine GST-RASSF1A, GST-RASSF1AMut203 und GST im Western Blot markiert, bei dem mit phospho-serinspezifischen Antikörpern detektiert wurde. GST-RASSF1A und GST-RASSF1AMut203 hatten eine molekulare Masse von 69 kDa. GST wurde als Kontrolle mitgeführt und migrierte bei 30 kDa. Mitgeführt wurde ebenfalls ein Protein-Molekulargewichtsstandard (Marker).

## 4 Diskussion

### 4.1 Epigenetische Inaktivierung

#### 4.1.1 Epigenetische Inaktivierung tumorrelevanter Gene in Weichteilsarkomen

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 4.2 Mutationsanalyse

### 4.2.1 *RASSF1A* Polymorphismus Codon 133

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

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

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

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

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

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

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

### 4.3 Funktion von RASSF1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

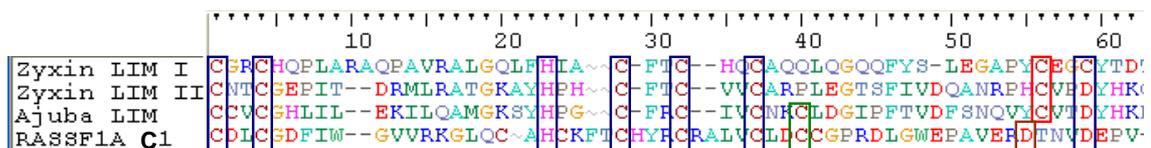


Abbildung 43. Vergleich der LIM Domänen der LATS bindenden Proteine Zyxin (LIM I und LIM II, die beide essentiell für die LATS Bindung sind und Ajuba (LIM) mit der C1 Domäne von RASSF1A. Die Zinkfinger motive der LIM Domänen und der C1 Domäne bestehen aus Cysteinen und Histidinen (blaue Balken) in bestimmten AS Abständen. Mit rotem Balken wurden die Cysteine der LIM Domänen markiert, die in der C1 Domäne durch ein Aspartat (brauner Balken) ersetzt werden könnte.

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

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

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

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

### 4.3.3 Funktion der ATM Domäne von RASSF1

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

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

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

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

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

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

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

#### 4.3.4 Funktion der RA Domäne von RASSF1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 4.3.5 Funktion der SARAH Domäne von RASSF1

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

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

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

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

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

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

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

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

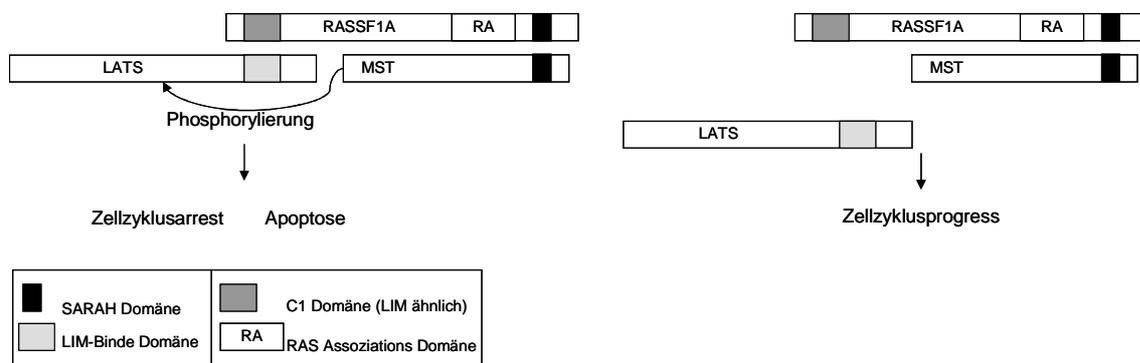


Abbildung 44. Mögliche regulatorische Funktion von RASSF1A durch Bindung von MST und LATS. RASSF1A könnte über die Interaktion mit MST und LATS an der Entscheidung, ob die Zelle proliferiert, arretiert bzw. in die Apoptose geht, beteiligt sein.

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

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

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

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

#### 4.3.6 Einordnung der funktionellen Zusammenhänge

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

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

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

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

## 4.4 Einordnung der experimentellen Vorgehensweise

### 4.4.1 Methylierungsuntersuchungen

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

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

#### 4.4.2 Funktionelle Untersuchungen

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

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

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

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Epigenetische Untersuchungen

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

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

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

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

## 5.2 Funktionelle Analysen

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

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

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

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

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

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

## 6 Ausblick

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

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

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

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

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

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

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

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

## 7 Literaturverzeichnis

- Abe, Y., M. Ohsugi, K. Haraguchi, J. Fujimoto and T. Yamamoto (2006). "LATS2-Ajuba complex regulates gamma-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis." FEBS Lett **580**(3): 782-8.
- Agathangelou, A., W. N. Cooper and F. Latif (2005). "Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers." Cancer Res **65**(9): 3497-508.
- Agathangelou, A., S. Honorio, D. P. Macartney, A. Martinez, A. Dallol, J. Rader, P. Fullwood, A. Chauhan, R. Walker, J. A. Shaw, S. Hosoe, M. I. Lerman, J. D. Minna, E. R. Maher and F. Latif (2001). "Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours." Oncogene **20**(12): 1509-18.
- Ahmed, S., R. Kozma, J. Lee, C. Monfries, N. Harden and L. Lim (1991). "The cysteine-rich domain of human proteins, neuronal chimaerin, protein kinase C and diacylglycerol kinase binds zinc. Evidence for the involvement of a zinc-dependent structure in phorbol ester binding." Biochem J **280** ( Pt 1): 233-41.
- Ahmed-Choudhury, J., A. Agathangelou, S. L. Fenton, C. Ricketts, G. J. Clark, E. R. Maher and F. Latif (2005). "Transcriptional regulation of cyclin A2 by RASSF1A through the enhanced binding of p120E4F to the cyclin A2 promoter." Cancer Res **65**(7): 2690-7.
- Albright, C. F., B. W. Giddings, J. Liu, M. Vito and R. A. Weinberg (1993). "Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase." Embo J **12**(1): 339-47.
- Almasan, A. and A. Ashkenazi (2003). "Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy." Cytokine Growth Factor Rev **14**(3-4): 337-48.
- Antequera, F., J. Boyes and A. Bird (1990). "High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines." Cell **62**(3): 503-14.
- Aoyama, Y., J. Avruch and X. F. Zhang (2004). "Nore1 inhibits tumor cell growth independent of Ras or the MST1/2 kinases." Oncogene **23**(19): 3426-33.
- Armesilla, A. L., J. C. Williams, M. H. Buch, A. Pickard, M. Emerson, E. J. Cartwright, D. Oceandy, M. D. Vos, S. Gillies, G. J. Clark and L. Neyses (2004). "Novel functional interaction between the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump 4b and the proapoptotic tumor suppressor Ras-associated factor 1 (RASSF1)." J Biol Chem **279**(30): 31318-28.
- Baksh, S., S. Tommasi, S. Fenton, V. C. Yu, L. M. Martins, G. P. Pfeifer, F. Latif, J. Downward and B. G. Neel (2005). "The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death." Mol Cell **18**(6): 637-50.
- Ball, L. G. and W. Xiao (2005). "Molecular basis of ataxia telangiectasia and related diseases." Acta Pharmacol Sin **26**(8): 897-907.
- Ballestar, E. and M. Esteller (2002). "The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing." Carcinogenesis **23**(7): 1103-9.

- Baylin, S. B. and J. E. Ohm (2006). "Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?" Nat Rev Cancer **6**(2): 107-16.
- Bird, A. P. (1986). "CpG-rich islands and the function of DNA methylation." Nature **321**(6067): 209-13.
- Bloom, G. S., F. C. Luca and R. B. Vallee (1985). "Microtubule-associated protein 1B: identification of a major component of the neuronal cytoskeleton." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(16): 5404-8.
- Bouralexis, S., D. M. Findlay and A. Evdokiou (2005). "Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL." Apoptosis **10**(1): 35-51.
- Brennan, M. F. (2005). "Soft tissue sarcoma: advances in understanding and management." Surgeon **3**(3): 216-23.
- Burbee, D. G., E. Forgacs, S. Zochbauer-Muller, L. Shivakumar, K. Fong, B. Gao, D. Randle, M. Kondo, A. Virmani, S. Bader, Y. Sekido, F. Latif, S. Milchgrub, S. Toyooka, A. F. Gazdar, M. I. Lerman, E. Zbarovsky, M. White and J. D. Minna (2001). "Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression." J Natl Cancer Inst **93**(9): 691-9.
- Campbell, S. L., R. Khosravi-Far, K. L. Rossman, G. J. Clark and C. J. Der (1998). "Increasing complexity of Ras signaling." Oncogene **17**(11 Reviews): 1395-413.
- Chan, E. H., M. Nousiainen, R. B. Chalamalasetty, A. Schafer, E. A. Nigg and H. H. Sillje (2005). "The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1." Oncogene **24**(12): 2076-86.
- Chan, M. W., L. W. Chan, N. L. Tang, K. W. Lo, J. H. Tong, A. W. Chan, H. Y. Cheung, W. S. Wong, P. S. Chan, F. M. Lai and K. F. To (2003). "Frequent hypermethylation of promoter region of RASSF1A in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients." Int J Cancer **104**(5): 611-6.
- Chen, Z., J. C. Otto, M. O. Bergo, S. G. Young and P. J. Casey (2000). "The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical for the interaction between K-Ras and microtubules." J Biol Chem **275**(52): 41251-7.
- Cheung, W. L., K. Ajiro, K. Samejima, M. Kloc, P. Cheung, C. A. Mizzen, A. Beeser, L. D. Etkin, J. Chernoff, W. C. Earnshaw and C. D. Allis (2003). "Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase." Cell **113**(4): 507-17.
- Clark, M. A., C. Fisher, I. Judson and J. M. Thomas (2005). "Soft-tissue sarcomas in adults." N Engl J Med **353**(7): 701-11.
- Creasy, C. L., D. M. Ambrose and J. Chernoff (1996). "The Ste20-like protein kinase, Mst1, dimerizes and contains an inhibitory domain." J Biol Chem **271**(35): 21049-53.
- Dallol, A., A. Agathangelou, S. L. Fenton, J. Ahmed-Choudhury, L. Hesson, M. D. Vos, G. J. Clark, J. Downward, E. R. Maher and F. Latif (2004). "RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics." Cancer Res **64**(12): 4112-6.
- Dallol, A., A. Agathangelou, S. Tommasi, G. P. Pfeifer, E. R. Maher and F. Latif (2005). "Involvement of the RASSF1A tumor suppressor gene in controlling cell migration." Cancer Res **65**(17): 7653-9.

- Dammann, R., C. Li, J. H. Yoon, P. L. Chin, S. Bates and G. P. Pfeifer (2000). "Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3." Nat Genet **25**(3): 315-9.
- Dammann, R., U. Schagdarsurengin, L. Liu, N. Otto, O. Gimm, H. Dralle, B. O. Boehm, G. P. Pfeifer and C. Hoang-Vu (2003). "Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma." Oncogene **22**(24): 3806-12.
- Dammann, R., U. Schagdarsurengin, C. Seidel, M. Strunnikova, M. Rastetter, K. Baier and G. P. Pfeifer (2005). "The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update." Histol Histopathol **20**(2): 645-63.
- Dammann, R., T. Takahashi and G. P. Pfeifer (2001). "The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas." Oncogene **20**(27): 3563-7.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton and P. A. Futreal (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-54.
- de Souza, P. M. and M. A. Lindsay (2004). "Mammalian Sterile20-like kinase 1 and the regulation of apoptosis." Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 485-8.
- Dergham, S. T., M. C. Dugan, R. Kucway, W. Du, D. S. Kamarauskiene, V. K. Vaitkevicius, J. D. Crissman and F. H. Sarkar (1997). "Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma." Int J Pancreatol **21**(2): 127-43.
- Dreijerink, K., E. Braga, I. Kuzmin, L. Geil, F. M. Duh, D. Angeloni, B. Zbar, M. I. Lerman, E. J. Stanbridge, J. D. Minna, A. Protopopov, J. Li, V. Kashuba, G. Klein and E. R. Zabarovsky (2001). "The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7504-9.
- Dulaimi, E., R. G. Uzzo, R. E. Greenberg, T. Al-Saleem and P. Cairns (2004). "Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel." Clin Cancer Res **10**(6): 1887-93.
- Egerer, G. PATIENTENINFORMATION WEICHTEILSARKOME.  
Patienteninformationen der Medizinischen Klinik & Poliklinik V, Hämatologie, Onkologie & Rheumatologie an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- Esteller, M., P. G. Corn, S. B. Baylin and J. G. Herman (2001). "A gene hypermethylation profile of human cancer." Cancer Res **61**: 3225-3229.
- Fackler, M. J., M. McVeigh, E. Evron, E. Garrett, J. Mehrotra, K. Polyak, S. Sukumar and P. Argani (2003). "DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma." Int J Cancer **107**(6): 970-5.

- Fenton, S. L., A. Dallol, A. Agathangelou, L. Hesson, J. Ahmed-Choudhury, S. Baksh, C. Sardet, R. Dammann, J. D. Minna, J. Downward, E. R. Maher and F. Latif (2004). "Identification of the E1A-Regulated Transcription Factor p120(E4F) as an Interacting Partner of the RASSF1A Candidate Tumor Suppressor Gene." Cancer Res **64**(1): 102-7.
- Fraga, M. F. and M. Esteller (2005). "Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications." Cell Cycle **4**(10): 1377-81.
- Friday, B. B. and A. A. Adjei (2005). "K-ras as a target for cancer therapy." Biochim Biophys Acta **1756**(2): 127-44.
- Glantschnig, H., G. A. Rodan and A. A. Reszka (2002). "Mapping of MST1 kinase sites of phosphorylation. Activation and autophosphorylation." J Biol Chem **277**(45): 42987-96.
- Grady, W. M., A. Rajput, J. D. Lutterbaugh and S. D. Markowitz (2001). "Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer." Cancer Res **61**(3): 900-2.
- Graves, J. D., Y. Gotoh, K. E. Draves, D. Ambrose, D. K. Han, M. Wright, J. Chernoff, E. A. Clark and E. G. Krebs (1998). "Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1." Embo J **17**(8): 2224-34.
- Harvey, K. F., C. M. Pflieger and I. K. Hariharan (2003). "The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis." Cell **114**(4): 457-67.
- Hay, B. A. and M. Guo (2003). "Coupling cell growth, proliferation, and death. Hippo weighs in." Dev Cell **5**(3): 361-3.
- Herman, J. G., J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin and S. B. Baylin (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 9821-9826.
- Herman, J. G., A. Umar, K. Polyak, J. R. Graff, N. Ahuja, J. P. Issa, S. Markowitz, J. K. Willson, S. R. Hamilton, K. W. Kinzler, M. F. Kane, R. D. Kolodner, B. Vogelstein, T. A. Kunkel and S. B. Baylin (1998). "Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6870-5.
- Hirota, T., T. Morisaki, Y. Nishiyama, T. Marumoto, K. Tada, T. Hara, N. Masuko, M. Inagaki, K. Hatakeyama and H. Saya (2000). "Zyxin, a regulator of actin filament assembly, targets the mitotic apparatus by interacting with h-warts/LATS1 tumor suppressor." J Cell Biol **149**(5): 1073-86.
- Hisaoka, M., A. Tanaka and H. Hashimoto (2002). "Molecular alterations of h-warts/LATS1 tumor suppressor in human soft tissue sarcoma." Lab Invest **82**(10): 1427-35.
- Ho, A. and S. F. Dowdy (2002). "Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 47-52.
- Honorio, S., A. Agathangelou, M. Schuermann, W. Pankow, P. Viacava, E. R. Maher and F. Latif (2003). "Detection of RASSF1A aberrant promoter hypermethylation in sputum from chronic smokers and ductal carcinoma in situ from breast cancer patients." Oncogene **22**(1): 147-50.

- Hoque, M. O., E. Rosenbaum, W. H. Westra, M. Xing, P. Ladenson, M. A. Zeiger, D. Sidransky and C. B. Umbricht (2005). "Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms." J Clin Endocrinol Metab **90**(7): 4011-8.
- Iida, S., T. Hirota, T. Morisaki, T. Marumoto, T. Hara, S. Kuninaka, S. Honda, K. Kosai, M. Kawasuji, D. C. Pallas and H. Saya (2004). "Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G1 tetraploidy checkpoint function." Oncogene **23**(31): 5266-74.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-28.
- Jordan, M. A., R. J. Toso, D. Thrower and L. Wilson (1993). "Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9552-6.
- Kadrmaz, J. L. and M. C. Beckerle (2004). "The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 920-31.
- Kang, S., J. M. Lee, E. S. Jeon, S. Lee, H. Kim, H. S. Kim, S. S. Seo, S. Y. Park, D. Sidransky and S. M. Dong (2006). "RASSF1A hypermethylation and its inverse correlation with BRAF and/or KRAS mutations in MSI-associated endometrial carcinoma." Int J Cancer.
- Kawaguchi, K., Y. Oda, T. Saito, H. Yamamoto, T. Takahira, C. Kobayashi, S. Tamiya, N. Tateishi, Y. Iwamoto and M. Tsuneyoshi (2006). "DNA hypermethylation status of multiple genes in soft tissue sarcomas." Mod Pathol **19**(1): 106-14.
- Kawaguchi, K., Y. Oda, T. Saito, H. Yamamoto, S. Tamiya, T. Takahira, K. Miyajima, Y. Iwamoto and M. Tsuneyoshi (2003). "Mechanisms of inactivation of the p16INK4a gene in leiomyosarcoma of soft tissue: decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis." J Pathol **201**(3): 487-95.
- Kawaguchi, K., Y. Oda, T. Takahira, T. Saito, H. Yamamoto, C. Kobayashi, S. Tamiya, S. Oda, Y. Iwamoto and M. Tsuneyoshi (2005). "Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in soft tissue sarcomas." Oncol Rep **13**(2): 241-6.
- Khokhlatchev, A., S. Rabizadeh, R. Xavier, M. Nedwidek, T. Chen, X. F. Zhang, B. Seed and J. Avruch (2002). "Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway." Curr Biol **12**(4): 253-65.
- Kikuchi, A., S. D. Demo, Z. H. Ye, Y. W. Chen and L. T. Williams (1994). "ralGDS family members interact with the effector loop of ras p21." Mol Cell Biol **14**(11): 7483-91.
- Kim, D. H., J. S. Kim, Y. I. Ji, Y. M. Shim, H. Kim, J. Han and J. Park (2003). "Hypermethylation of RASSF1A promoter is associated with the age at starting smoking and a poor prognosis in primary non-small cell lung cancer." Cancer Res **63**(13): 3743-6.
- Kim, S. T., D. S. Lim, C. E. Canman and M. B. Kastan (1999). "Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members." J Biol Chem **274**(53): 37538-43.

- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-3.
- Kok, K., S. L. Naylor and C. H. Buys (1997). "Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes." Adv Cancer Res **71**: 27-92.
- Krassenstein, R., E. Sauter, E. Dulaimi, C. Battagli, H. Ehya, A. Klein-Szanto and P. Cairns (2004). "Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation." Clin Cancer Res **10**(1 Pt 1): 28-32.
- Kuroki, T., F. Trapasso, S. Yendamuri, A. Matsuyama, H. Alder, M. Mori and C. M. Croce (2003). "Promoter hypermethylation of RASSF1A in esophageal squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **9**(4): 1441-5.
- Kuzmin, I., J. W. Gillespie, A. Protopopov, L. Geil, K. Dreijerink, Y. Yang, C. D. Vocke, F. M. Duh, E. Zabarovsky, J. D. Minna, J. S. Rhim, M. R. Emmert-Buck, W. M. Linehan and M. I. Lerman (2002). "The RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells." Cancer Res **62**(12): 3498-502.
- LeBlanc, H. N. and A. Ashkenazi (2003). "Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors." Cell Death Differ **10**(1): 66-75.
- Lee, K. K., T. Ohyama, N. Yajima, S. Tsubuki and S. Yonehara (2001). "MST, a physiological caspase substrate, highly sensitizes apoptosis both upstream and downstream of caspase activation." J Biol Chem **276**(22): 19276-85.
- Lee, M. G., H. Y. Kim, D. S. Byun, S. J. Lee, C. H. Lee, J. I. Kim, S. G. Chang and S. G. Chi (2001). "Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma." Cancer Res **61**(18): 6688-92.
- Lehnert, B., Debus, Delorme, Dienemann, Drings, Egerer, Fischer, Mechttersheimer, Rudi, Schulz-Ertner, Willeke (2003). Weichteilsarkome im Erwachsenenalter. Schriftenreihe des Tumorzentrums Heidelberg/Mannheim. Heidelberg/Mannheim: 36.
- Li, X. Q., M. Hisaoka and H. Hashimoto (2003). "Expression of estrogen receptors alpha and beta in soft tissue sarcomas: Immunohistochemical and molecular analysis." Pathol Int **53**(10): 671-9.
- Lin, Y., A. Khokhlatchev, D. Figeys and J. Avruch (2002). "Death-associated protein 4 binds MST1 and augments MST1-induced apoptosis." J Biol Chem **277**(50): 47991-8001.
- Liu, L., S. Tommasi, D. H. Lee, R. Dammann and G. P. Pfeifer (2003). "Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor." Oncogene **22**(50): 8125-36.
- Liu, L., A. Vo, G. Liu and W. L. McKeehan (2005). "Distinct structural domains within C19ORF5 support association with stabilized microtubules and mitochondrial aggregation and genome destruction." Cancer Res **65**(10): 4191-201.
- Liu, L., A. Vo, G. Liu and W. L. McKeehan (2005). "Putative tumor suppressor RASSF1 interactive protein and cell death inducer C19ORF5 is a DNA binding protein." Biochem Biophys Res Commun **332**(3): 670-6.

- Liu, L., J. Zhang, S. Bates, J. J. Li, D. M. Peehl, J. S. Rhim and G. P. Pfeifer (2005). "A methylation profile of in vitro immortalized human cell lines." Int J Oncol **26**(1): 275-85.
- Lo, K. W., J. Kwong, A. B. Hui, S. Y. Chan, K. F. To, A. S. Chan, L. S. Chow, P. M. Teo, P. J. Johnson and D. P. Huang (2001). "High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma." Cancer Res **61**(10): 3877-81.
- Ma, D., B. T. Himes, T. B. Shea and I. Fischer (2000). "Axonal transport of microtubule-associated protein 1B (MAP1B) in the sciatic nerve of adult rat: distinct transport rates of different isoforms." J Neurosci **20**(6): 2112-20.
- Maruyama, R., S. Toyooka, K. O. Toyooka, K. Harada, A. K. Virmani, S. Zochbauer-Muller, A. J. Farinas, F. Vakar-Lopez, J. D. Minna, A. Sagalowsky, B. Czerniak and A. F. Gazdar (2001). "Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features." Cancer Res **61**(24): 8659-63.
- Mathe, E. (2004). "RASSF1A, the new guardian of mitosis." Nat Genet **36**(2): 117-8.
- Meye, A., P. Wurl, R. Hinze, D. Berger, M. Bache, H. Schmidt, F. W. Rath and H. Taubert (1998). "No p16INK4A/CDKN2/MTS1 mutations independent of p53 status in soft tissue sarcomas." J Pathol **184**(1): 14-7.
- Morisaki, T., T. Hirota, S. Iida, T. Marumoto, T. Hara, Y. Nishiyama, M. Kawasaki, T. Hiraoka, T. Mimori, N. Araki, I. Izawa, M. Inagaki and H. Saya (2002). "WARTS tumor suppressor is phosphorylated by Cdc2/cyclin B at spindle poles during mitosis." FEBS Lett **529**(2-3): 319-24.
- Moshnikova, A., J. Frye, J. W. Shay, J. D. Minna and A. V. Khokhlatchev (2006). "The growth and tumor suppressor NORE1A is a cytoskeletal protein that suppresses growth by inhibition of the ERK pathway." J Biol Chem **281**(12): 8143-52.
- Muller, H. M., A. Widschwendter, H. Fiegl, L. Ivarsson, G. Goebel, E. Perkmann, C. Marth and M. Widschwendter (2003). "DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker." Cancer Res **63**(22): 7641-5.
- Myers, J. S. and D. Cortez (2006). "Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11." J Biol Chem **281**(14): 9346-50.
- Neuhausen, A., A. R. Florl, M. O. Grimm and W. A. Schulz (2006). "DNA Methylation Alterations in Urothelial Carcinoma." Cancer Biol Ther **5**(8).
- Newton, A. C. (1995). "Protein kinase C. Seeing two domains." Curr Biol **5**(9): 973-6.
- O'Neill, T., A. J. Dwyer, Y. Ziv, D. W. Chan, S. P. Lees-Miller, R. H. Abraham, J. H. Lai, D. Hill, Y. Shiloh, L. C. Cantley and G. A. Rathbun (2000). "Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM." J Biol Chem **275**(30): 22719-27.
- Ortiz-Vega, S., A. Khokhlatchev, M. Nedwidek, X. F. Zhang, R. Dammann, G. P. Pfeifer and J. Avruch (2002). "The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1." Oncogene **21**(9): 1381-90.
- Pantalacci, S., N. Tapon and P. Leopold (2003). "The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in Drosophila." Nat Cell Biol **5**(10): 921-7.

- Peters, J. M. (2002). "The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond." *Mol Cell* **9**(5): 931-43.
- Pietsch (2006). Lungenkrebs.  
<http://www.medac.de/patient/fachbereiche/onkologie/indikationen/bronchialkarzinom.htm#4>, medac GmbH.
- Praskova, M., A. Khokhlatchev, S. Ortiz-Vega and J. Avruch (2004). "Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras." *Biochem J* **381**(Pt 2): 453-62.
- Rabizadeh, S., R. J. Xavier, K. Ishiguro, J. Bernabeortiz, M. Lopez-Illasaca, A. Khokhlatchev, P. Mollahan, G. P. Pfeifer, J. Avruch and B. Seed (2004). "The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death." *J Biol Chem* **279**(28): 29247-54.
- Ramirez, J. L., C. Sarries, P. L. de Castro, B. Roig, C. Queralt, D. Escuin, I. de Aguirre, J. M. Sanchez, J. L. Manzano, M. Margeli, J. J. Sanchez, J. Astudillo, M. Taron and R. Rosell (2003). "Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients." *Cancer Lett* **193**(2): 207-16.
- Rastetter, M. (2006). Epigenetische Inaktivierung und Funktion des Tumorsuppressorgens RASSF1A im malignen Melanom. *Institut für Biochemie*. Halle, Martin-Luther-Universität: 105.
- Reifenberger, J., C. B. Knobbe, A. A. Sterzinger, B. Blaschke, K. W. Schulte, T. Ruzicka and G. Reifenberger (2004). "Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas." *Int J Cancer* **109**(3): 377-84.
- Reu, F. J., D. W. Leaman, R. R. Maitra, S. I. Bae, L. Cherkassky, M. W. Fox, D. R. Rempinski, N. Beaulieu, A. R. MacLeod and E. C. Borden (2006). "Expression of RASSF1A, an epigenetically silenced tumor suppressor, overcomes resistance to apoptosis induction by interferons." *Cancer Res* **66**(5): 2785-93.
- Rong, R., W. Jin, J. Zhang, M. S. Sheikh and Y. Huang (2004). "Tumor suppressor RASSF1A is a microtubule-binding protein that stabilizes microtubules and induces G2/M arrest." *Oncogene* **23**(50): 8216-30.
- Saito, T., Y. Oda, K. Kawaguchi, T. Takahira, H. Yamamoto, A. Sakamoto, S. Tamiya, Y. Iwamoto and M. Tsuneyoshi (2003). "Possible association between tumor-suppressor gene mutations and hMSH2/hMLH1 inactivation in alveolar soft part sarcoma." *Hum Pathol* **34**(9): 841-9.
- Schagdarsurengin, U., O. Gimm, C. Hoang-Vu, H. Dralle, G. P. Pfeifer and R. Dammann (2002). "Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma." *Cancer Res* **62**: 3698-3701.
- Schagdarsurengin, U., C. Seidel, E. J. Ulbrich, H. Kolbl, J. Dittmer and R. Dammann (2005). "A polymorphism at codon 133 of the tumor suppressor RASSF1A is associated with tumorous alteration of the breast." *Int J Oncol* **27**(1): 185-91.
- Scheel, H. and K. Hofmann (2003). "A novel interaction motif, SARAH, connects three classes of tumor suppressor." *Curr Biol* **13**(23): R899-900.
- Schulz, W. A. (2005). *Molecular Biology of Human Cancers*, Springer.
- Sherr, C. J. (2004). "Principles of tumor suppression." *Cell* **116**(2): 235-46.

- Shivakumar, L., J. Minna, T. Sakamaki, R. Pestell and M. A. White (2002). "The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation." Mol Cell Biol **22**(12): 4309-18.
- Song, M. S., J. S. Chang, S. J. Song, T. H. Yang, H. Lee and D. S. Lim (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**(5): 3920-7.
- Song, M. S. and D. S. Lim (2004). "Control of APC-Cdc20 by the tumor suppressor RASSF1A." Cell Cycle **3**(5): 574-6.
- Song, M. S., S. J. Song, N. G. Ayad, J. S. Chang, J. H. Lee, H. K. Hong, H. Lee, N. Choi, J. Kim, H. Kim, J. W. Kim, E. J. Choi, M. W. Kirschner and D. S. Lim (2004). "The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex." Nat Cell Biol **6**(2): 129-137.
- Spaargaren, M. and J. R. Bischoff (1994). "Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12609-13.
- Takahashi, Y., Y. Miyoshi, C. Takahata, N. Irahara, T. Taguchi, Y. Tamaki and S. Noguchi (2005). "Down-regulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers." Clin Cancer Res **11**(4): 1380-5.
- Tapon, N., K. F. Harvey, D. W. Bell, D. C. Wahrer, T. A. Schiripo, D. A. Haber and I. K. Hariharan (2002). "Salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines." Cell **110**(4): 467-78.
- Taubert, H. W., F. Bartel, M. Kappler, K. Schuster, A. Meye, C. Lautenschlager, B. Thamm-Mucke, M. Bache, H. Schmidt, H. J. Holzhausen and P. Wurl (2003). "Reduced expression of hMSH2 protein is correlated to poor survival for soft tissue sarcoma patients." Cancer **97**(9): 2273-8.
- Toyooka, S., K. O. Toyooka, R. Maruyama, A. K. Virmani, L. Girard, K. Miyajima, K. Harada, Y. Ariyoshi, T. Takahashi, K. Sugio, E. Brambilla, M. Gilcrease, J. D. Minna and A. F. Gazdar (2001). "DNA methylation profiles of lung tumors." Mol Cancer Ther **1**(1): 61-7.
- Udan, R. S., M. Kango-Singh, R. Nolo, C. Tao and G. Halder (2003). "Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway." Nat Cell Biol **5**(10): 914-20.
- Ura, S., N. Masuyama, J. D. Graves and Y. Gotoh (2001). "Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10148-53.
- Ura, S., N. Masuyama, J. D. Graves and Y. Gotoh (2001). "MST1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and independent pathways." Genes Cells **6**(6): 519-30.
- van Engeland, M., G. M. Roemen, M. Brink, M. M. Pachen, M. P. Weijnenberg, A. P. de Bruine, J. W. Arends, P. A. van den Brandt, A. F. de Goeij and J. G. Herman (2002). "K-ras mutations and RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer." Oncogene **21**(23): 3792-5.

- van Unnik, J. A., J. M. Coindre, C. Contesso, C. E. Albus-Lutter, T. Schiodt, R. Sylvester, D. Thomas, V. Bramwell and H. T. Mouridsen (1993). "Grading of soft tissue sarcomas: experience of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group." Eur J Cancer **29A**(15): 2089-93.
- Vavvas, D., X. Li, J. Avruch and X. F. Zhang (1998). "Identification of Nore1 as a potential Ras effector." J Biol Chem **273**(10): 5439-42.
- Vos, M. D., A. Dallol, K. Eckfeld, N. P. Allen, H. Donniger, L. B. Hesson, D. Calvisi, F. Latif and G. J. Clark (2006). "The RASSF1A tumor suppressor activates Bax via MOAP-1." J Biol Chem **281**(8): 4557-63.
- Vos, M. D., C. A. Ellis, A. Bell, M. J. Birrer and G. J. Clark (2000). "Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis." J Biol Chem **275**(46): 35669-72.
- Vos, M. D., A. Martinez, C. Elam, A. Dallol, B. J. Taylor, F. Latif and G. J. Clark (2004). "A role for the RASSF1A tumor suppressor in the regulation of tubulin polymerization and genomic stability." Cancer Res **64**(12): 4244-50.
- Wang, J. Y., S. T. Lian, Y. F. Chen, Y. C. Yang, L. T. Chen, K. T. Lee, T. J. Huang and S. R. Lin (2002). "Unique K-ras mutational pattern in pancreatic adenocarcinoma from Taiwanese patients." Cancer Lett **180**(2): 153-8.
- Wasch, R. and D. Engelbert (2005). "Anaphase-promoting complex-dependent proteolysis of cell cycle regulators and genomic instability of cancer cells." Oncogene **24**(1): 1-10.
- Watabe, M., H. Kakeya and H. Osada (1999). "Requirement of protein kinase (Krs/MST) activation for MT-21-induced apoptosis." Oncogene **18**(37): 5211-20.
- Whang, Y. M., Y. H. Kim, J. S. Kim and Y. D. Yoo (2005). "RASSF1A suppresses the c-Jun-NH2-kinase pathway and inhibits cell cycle progression." Cancer Res **65**(9): 3682-90.
- Whang-Peng, J., C. S. Kao-Shan, E. C. Lee, P. A. Bunn, D. N. Carney, A. F. Gazdar and J. D. Minna (1982). "Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer; deletion 3p(14-23)." Science **215**(4529): 181-2.
- Wu, S., J. Huang, J. Dong and D. Pan (2003). "hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts." Cell **114**(4): 445-56.
- Xing, M., Y. Cohen, E. Mambo, G. Tallini, R. Udelsman, P. W. Ladenson and D. Sidransky (2004). "Early occurrence of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumorigenesis." Cancer Res **64**(5): 1664-8.

## DANKSAGUNG

PD Dr. Reinhard Dammann danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas sowie für die außerordentlich gute Betreuung, die mir sowohl Führung und Anregung gab, aber auch Freiraum für eigene Ideen und deren Umsetzung ließ.

PD Dr. Helge Taubert danke ich für die Bereitstellung des Weichteilsarkommaterials sowie für die sehr gute und konstruktive Zusammenarbeit.

Matthias Rastetter danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und besonders auch für viel Hilfe beim Lösen von EDV Problemen.

Der gesamten AG Tumorgenetik danke ich für die schöne Zeit in der Gruppe, die allzeit gute Stimmung und angeregtes Diskutieren nicht nur über Fachfragen.

Prof. Dr. Ingo Hansmann danke ich für die Bereitstellung der Infrastruktur am Institut für Humangenetik und dem gesamten Institut für das freundliche Arbeitsklima.



## 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 13.07.06

---

Claudia Seidel



## Beruflicher Werdegang

### Claudia Seidel

geb. am 23.11.1978 in Karl-Marx-Stadt

## Schulbildung

---

08/1985- 07/1992 Käthe-Kollwitz-Schule in Karl-Marx-Stadt/Chemnitz

08/1992- 07/1997 Dr.-Willhelm-Andrè-Gymnasium Chemnitz  
Allgemeine Hochschulreife (Note 1,9)

## Studium

---

10/1997- 08/2002 Studium der Biochemie an der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Schwerpunkte: Medizinische Biochemie,  
Molekularbiologie/Genetik

08/2002 Diplom (Note 1,6)  
Thema der Diplomarbeit: „Suche nach  
Proteinbindungspartnern des Tumorsuppressors  
RASSF1A

11/2002 Beginn der Promotionsarbeit  
Nachwuchsforschungsgruppe AG Tumorgenetik  
Martin-Luther-Universität Halle  
Thema: „Die Funktion des Tumorsuppressors RASSF1A  
mit besonderer Berücksichtigung der epigenetischen  
Inaktivierung in Weichteilsarkomen“