

**Isolation, Charakterisierung und Funktion des  
Ras Assoziationsdomänen Familie 1 Gens aus dem  
Tumorsuppressionslocus 3p21.3 mit besonderer Berücksichtigung  
seiner epigenetischen Inaktivierung in humanen Tumoren**

Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium habilitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

und der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

von Dr. sc. nat. Reinhard Heinrich Dammann

geboren am 23.04.1965 in Zürich/Schweiz

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Braun, Universität Halle
2. Prof. Dr. Ingo Hansmann, Universität Halle
3. Prof. Dr. Bernhard Horsthemke, Universität Essen

Halle (Saale), den 16. September 2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000007413**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007413>]

## Verzeichnis der in der Arbeit zusammengefassten Originalarbeiten<sup>1</sup>:

1. **Dammann R**, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25: 315-319.
2. **Dammann R**, Yang G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res* 2001; 61: 3105-3109.
3. **Dammann R**, Takahashi T, Pfeifer GP. The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene* 2001; 20: 3563-3567.
4. Yoon JH, **Dammann R**, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of the RASSF1A gene in ovarian and renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 94: 212-217.
5. Tommasi S, **Dammann R**, Jin SG, Zhang XF, Avruch J, Pfeifer GP. RASSF3 and NORE1: identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1. *Oncogene* 2002; 21: 2713-2720.
6. Schagdarsurengin U, Gimm O, Hoang-Vu C, Dralle H, Pfeifer GP, **Dammann R**. Frequent epigenetic silencing of the CpG island promotor of RASSF1A in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 3698-3701.
7. Liu L, Yoon JH, **Dammann R**, Pfeifer GP. Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. *Oncogene* 2002; 21: 6835-6840.
8. Ortiz-Vega S, Khokhlatchev A, Nedwitek M, Zhang XF, **Dammann R**, Pfeifer GP, Avruch J. The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene* 2002; 21: 1381-1390.
9. Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann D, Flemming P, Kreipe HH, Pfeifer GP, Schlegelberger B, **Dammann R**. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 1866-1871.
10. Kuzmin I, Liu L, **Dammann R**, Geil L, Stanbridge EJ, Wilczynski SP, Lerman MI, Pfeifer GP. Inactivation of RAS association domain family 1A gene in cervical carcinomas and the role of human papillomavirus infection. *Cancer Res* 2003; 63: 1888-1893.
11. Spugnardi M, Tommasi S, **Dammann R**, Pfeifer GP, Hoon DS. Epigenetic inactivation of Ras association domain family protein 1 (RASSF1A) in malignant cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1639-1643.
12. **Dammann R**, Schagdarsurengin U, Limin L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 3806-3812.

---

<sup>1</sup> Aus urheberrechtlichen Gründen sind die Arbeiten in der Online-Version der Habilitationsschrift nicht enthalten.

Für Helena und Alexander

*„Alles, was im Weltall existiert, ist die Frucht von Zufall und Notwendigkeit.“*

Demokrit

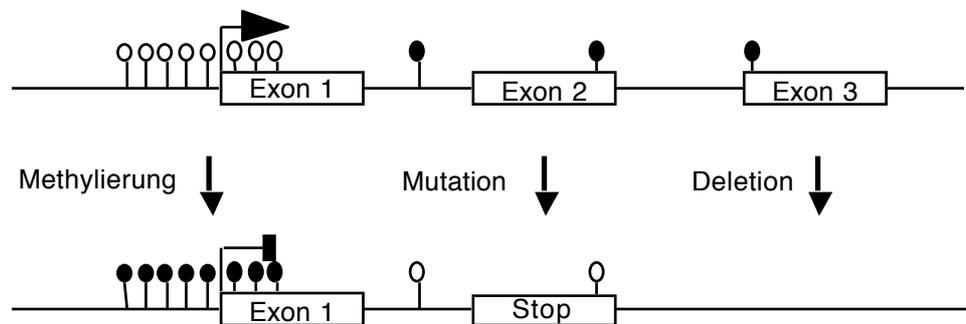
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2. Ras Signaltransduktion und Effektoren</b>	<b>6</b>
<b>3. Identifikation und Charakterisierung des Ras Assoziationsdomänen Familien Gens</b>	<b>9</b>
<b>4. Analyse von <i>RASSF1</i> in humanen Tumoren</b>	<b>14</b>
<b>5. Epigenetische Inaktivierung von <i>RASSF1A</i> in Tumoren</b>	<b>16</b>
<b>6. Wechselwirkungen zwischen RASSF1A und Ras</b>	<b>24</b>
<b>7. Tumorsuppression durch RASSF1A</b>	<b>26</b>
<b>8. Ausblick</b>	<b>27</b>
<b>9. Zusammenfassung</b>	<b>29</b>
<b>10. Literaturverzeichnis</b>	<b>31</b>
<b>Anhang</b>	<b>39</b>
Der Habilitation zugrunde liegende Originalarbeiten	
Danksagung	
Lebenslauf	
Erklärung	

## 1. Einleitung

Mit der Beendung der Sequenzierung des menschlichen Genoms ist die Anzahl der Gene, die im komplexen Zusammenspiel die zelluläre Entwicklung und das Schicksal bestimmen, endlich überschaubar. Das nächste Ziel ist die Funktion jedes Genes aufzuklären und die Mechanismen zu begreifen, die ihre Expression regulieren. Onkogene sind Gene, die durch genetische Veränderungen, wie Duplikationen, Mutationen oder Translokationen aktiv an der Tumorprogression beteiligt sind. Im Gegensatz dazu ist die genetische Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens passiv an der malignen Transformation einer Zelle beteiligt. Bei den Tumorsuppressorgenen wird zwischen den „Caretaker“-Genen unterschieden, die für die Integrität des Genoms durch DNA Reparatur verantwortlich sind und den „Gatekeeper“-Genen, die die Zellzykluskontrolle und die Apoptose regulieren. Tumorsuppressorgene sind auch direkt für die Stabilität des Gewebes durch Inhibierung von Zellinvasion und Metastasen verantwortlich. Die Transformation von einer Normalzelle in einen malignen Tumor vollzieht sich in diskreten Schritten (Mehrschritt-Karzinogenese), in denen genetische Veränderungen von verschiedenen Tumorgenen mit einem bestimmten phänotypischen Stadium korrelieren. In sporadischen Tumoren ist es gelungen Tumorsuppressorgene zu identifizieren, die durch einen somatischer Defekt für die Pathogenese eines bestimmten Tumors verantwortlich sind, und bei der hereditärer Prädispositionen für diese Tumorentität liegt des öfteren eine Keimbahnveränderungen des gleichen Gens vor. Anhand von Untersuchungen am Retinoblastoms hat Knudson 1971 festgestellt, dass für die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens beide Allele durch genetische Veränderungen, wie chromosomale Deletionen oder Mutationen, sukzessiv inaktiviert werden müssen (Abb. 1), damit das betroffene Gen seine suppressive Funktion verliert und die Zwei-Hit-Hypothese aufgestellt, die in der Regel für alle Tumorsuppressorgene gilt (Knudson, 1971).

Ein alternativer Mechanismus, der die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens in Krebs bewirkt, wird durch epigenetische Modifikationen hervorgerufen. Die epigenetisch Inaktivierung ist eine Veränderung der Funktionalität eines Genes ohne dessen genetische Sequenz zu verändern. Diese epigenetische Regulation beinhaltet die Entstehung von repressiven Chromatin an der aktiven Promotorregion. Bei dieser Inaktivierung des Chromatins ist die Methylierung von Cytosin in einer CpG Sequenz mitbeteiligt. Die

Transkriptionsinaktivierung durch Hypermethylierung von CpG-reichen Promotoren ist in der Karzinogenese ein häufiges Ereignis (Abb. 1). Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass die Promotoren von verschiedenen Tumorsuppressorgenen oft in einer Vielzahl von humanen Tumoren methyliert sind, aber im entsprechenden gesunden Gewebe frei von Methylierung sind. Da die Hypermethylierung von regulatorischen Sequenzen zur Inaktivierung der Genexpression führt, werden diese epigenetischen Veränderungen als wichtiger Mechanismus in der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen angesehen und höchstwahrscheinlich spielt die Epigenetik nicht nur in der Kanzerogenese, sondern auch in der zellulären Entwicklung und Alterung eine zentrale Rolle.



**Abbildung 1.** Mechanismen der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung. In diesem Modell sind die drei Hauptmechanismen der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung dargestellt. Durch Modifikation von unmethylierten CpG Sequenzen (weiße Ballons) im Promotor (Pfeil) werden diese methyliert (schwarze Ballons) und damit wird der Promotor inaktiviert. Weiterhin kann ein Tumorsuppressorgen durch Mutationen (hier eine „nonsense“ Mutation) oder chromosomale Deletion inaktiviert werden.

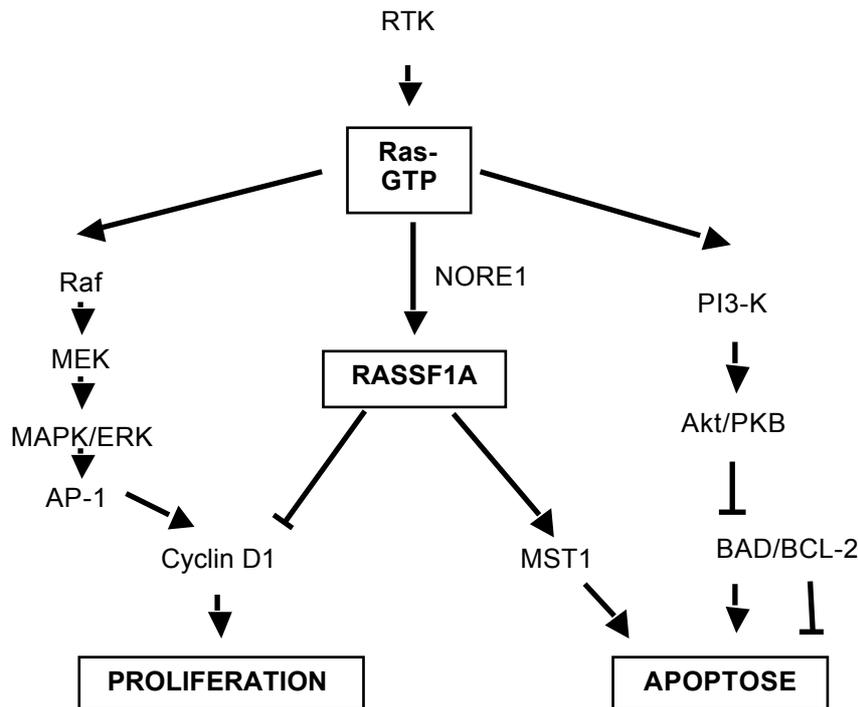
## 2. Ras Signaltransduktion und Effektoren

Onkogene sind im Gegensatz zu Tumorsuppressorgenen aktiv an der Krebsentstehung beteiligt. Dabei spielt das Proto-Onkogen Ras eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellwachstums und des Zelltodes als Antwort auf extrazelluläre Signale. Ras wird in verschiedenen Tumoren durch Mutationen aktiviert, die vor allem an Codon 12 gefunden werden (Bos, 1989; Barbacid, 1990). Dies führt zur Transformation von Ras zu einem Onkogen und ergibt eine unregulierte aktivierte Signalübertragungskaskade in Tumoren (Crespo and Leon, 2000). Die Ras Superfamilie von kleinen GTPasen überträgt Signale von den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) in den Nucleus und reguliert das

Zellwachstum, das zelluläre Überleben und die Zelldifferenzierung (Abb. 2) (Campbell *et al.*, 1998; Khosravi-Far *et al.*, 1998; Marshall, 1999; Crespo and Leon, 2000; Bar-Sagi, 2001). Ras Proteine wirken als molekulare Schalter zwischen zwei verschiedenen Zuständen: aktiv, wenn GTP gebunden ist und inaktiv im GDP gebundenen Zustand. GTPasen aktivierende Proteine inhibieren die Ras Aktivierung durch die verstärkte Hydrolyse von gebundenen GTP. Im Gegensatz dazu aktivieren Guanin Nukleotid Austauschfaktoren die Bindungsfähigkeit von Ras für GTP. Aktiviertes Ras transduziert Signale durch verschiedene Übertragungswege, indem es die zelluläre Antwort durch Ras Effektoren und deren komplexe Wirkungskaskaden regulieren. (Abb. 2) (Katz and McCormick, 1997; Khosravi-Far *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1999; Reuther and Der, 2000).

Der am besten charakterisierte Signaltransduktionsweg von Ras ist der durch die Serin/Threonin-Kinasen (Leevers and Marshall, 1992; Kolch, 2000). Aktiviertes Ras phosphoryliert MEK (MAPK/ERK Kinase) und die somit aktivierte MEK phosphoryliert MAPK (Mitogen aktivierte Proteinkinase) (Abb. 2). Folglich transloziert die aktivierte MAPK in den Nukleus und phosphoryliert eine Reihe von Transkriptionsfaktoren. Zum Beispiel führt die Aktivierung von Elk (eine Serin/Threonin Kinase) zur Transkription von Fos, welches zusammen mit der vom MAPK aktivierten Jun das aktivierende Protein 1 (AP-1) bildet. Es wurde gezeigt, dass AP-1 Cyclin D1 induziert und dadurch die Proliferation der Zelle stimuliert (Abb. 2) (Shaulian and Karin, 2001).

Die zweite Kaskade, die durch Ras Signalisierung aktiviert wird, ist die durch die Phosphatidylinosit 3-Kinase (PI3-K) und verhindert das Zellen Apoptose begehen (Abb. 2) (Downward, 1998; Datta *et al.*, 1999). PI3-K konvertiert Lipide, die folglich die Aktivität der Protein Kinase B Akt stimulieren. Anschließend neutralisiert Akt das proapoptotische BAD, ein Mitglied der BCL Familie, durch Phosphorylierung (Korsmeyer, 1999). Aktiviertes BAD Protein bildet ein Heterodimer mit dem anti-apoptotischen BCL-2 und dieses Dimer reguliert den programmierten Zelltod (Abb. 2). Inaktivierung von BAD ermöglicht BCL-2 das zelluläre Überleben zu fördern, indem es die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C blockiert und dadurch die Aktivierung der Caspasen inhibiert. Die anti-apoptotische Aktivität von Akt bewirkt auch die Phosphorylierung der Procaspase-9, die Hochregulation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und die Regulation der „Forkhead“ Familie (Cardone *et al.*, 1998; Kops *et al.*, 1999; Romashkova and Makarov, 1999).



**Abb. 2:** Ras Signaltransduktion. Die von Wachstumsfaktoren übermittelte Antwort der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) aktiviert Ras. Ras-GTP stimuliert verschiedene Signalübertragungswege. Durch den MAP Kinase Übertragungsweg (Raf, MEK, und MAPK/ERK) aktiviert Ras die zelluläre Proliferation. Ras inhibiert die Apoptose durch die Phosphatidylinosit 3-Kinase (PI3-K) und stimuliert die Aktivität der Proteinkinase B Akt (Akt/PKB). Dadurch inhibiert Akt, die durch die BCL-Familie (BAD/BCL-2) induzierte Apoptose. Weiterhin reguliert Ras einen weiteren apoptotische Signaltransduktion durch die Bindung der Ras Effektoren NORE1 und RASSF1A und aktiviert die proapoptotische Proteinkinase MST1. RASSF1A blockiert den Zellzyklus und inhibiert die Akkumulation von Cyclin D1.

Raf und PI3-K sind gut charakterisierte Ras Effektoren, die mit Ras durch eine Ras Bindedomäne interagieren (RBD und PI3K\_rbd). Die dritte Gruppe von Ras Effektoren hat eine konservierte RalGDS/AF6 Ras Assoziationsdomäne (RA-Domäne), welche keine signifikanten Homologien zu den Ras Bindedomänen besitzt (Katz and McCormick, 1997; Wolthuis and Bos, 1999; Yamamoto *et al.*, 1999). Aminosäuresequenz-Homologien zwischen den beiden Ras Effektoren, Ral Guanin Nukleotid Dissoziationstimulator (RalGDS) und dem ALL-1 Fusionspartner von Chromosom 6 (AF-6), definieren diese RA Domäne (Ponting and Benjamin, 1996). RalGDS wirkt bei der von Ras induzierten Transformation mit, und AF-6 ist in der Regulation der Zelladhäsion beteiligt.

Die in dieser Arbeit zusammengefassten Originalarbeiten befassen sich mit der Identifizierung, Charakterisierung und Funktion von einem neuen Ras Effektor Gens, welches in der chromosomalen Region 3p21.3 lokalisiert ist. Verlust dieses Segments ist

einer der ersten und häufigsten Veränderungen in Lungentumoren und anderen soliden Karzinomen und eine wichtige Rolle dieser Region war in der Karzinogenese zu erwarten.

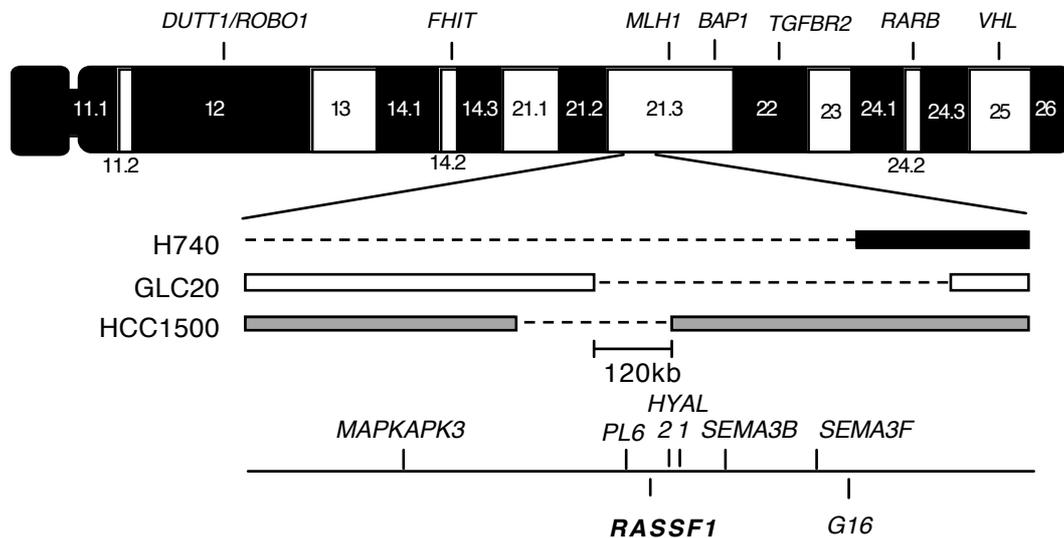
### **3. Identifikation und Charakterisierung des Ras Assoziationsdomänen Familien Gens**

In der Karzinogenese von Lungentumoren sind genetische Prädispositionen selten beteiligt, und es wurden noch keine Gene gefunden, die eine starke Penetranz für Lungenkrebs aufwiesen. Das Augenmerk richtet sich auf die chromosomalen Segmente, die häufig in Tumoren verloren sind und besonderes Interesse gilt den Regionen in denen beide Allele in Tumoren fehlen (homozygote Deletion). Die Größe dieser homozygoten Verlustregionen ist meistens viel kleiner als die der hemizygoten Segmente, und es wurden einige Tumorsuppressorgene, die aus solchen homozygoten Deletionsregionen stammen, identifiziert (z. B. *RB*, *p16*, *SMAD4* und *PTEN*).

Die frühesten und häufigsten Veränderungen in der Entstehung von Lungenkrebs liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3. Deletionen von 3p wurden oft in Lungentumoren, aber auch in anderen Tumoren gefunden und es ist sehr wahrscheinlich, dass einige Segmente wie 3p12, 3p14, 3p21 und 3p24-25 Tumorsuppressorgene (wie z. B. das „Mismatch“ Reparatur Gen *MLH1*) beinhalten (Abb. 3) (Kok *et al.*, 1997). Es wurden inzwischen verschiedene Tumorsuppressorgen-Kandidaten in diesen Deletionsregionen nachgewiesen, und so wurde in 3p25 das für die van Hippel-Lindau (*VHL*) Erkrankung verantwortliche Gen (Kaelin and Maher, 1998), in 3p14.2 das *FHIT* Gen (Sozzi *et al.*, 1996), und in 3p12 das *DUTT1/ROBO1* Gen identifiziert (Xian *et al.*, 2001).

Verlust des Segmentes 3p21.3 ist ein frühes Ereignis in der Pathogenese von Lungenkrebs und findet in den Stadien von Hyperplasie und Metaplasie statt (Sundaresan *et al.*, 1992; Hung *et al.*, 1995; Thiberville *et al.*, 1995; Wistuba *et al.*, 1999). Vermutlich ist diese Region für die Lungentumorinitiierung mitverantwortlich. Einige Gene, die in der 3p21.3 Deletionsregion kodiert sind, wurden isoliert, doch Mutationen in diesen Genen werden nur selten gefunden und dadurch erschwerte sich die Suche nach einem inaktivierten Tumorsuppressorgen. Beispiele dieser analysierten Gene sind: die Semaphorin-Gene (*SEMA3F* und *SEMA3B*) (Sekido *et al.*, 1996; Xiang *et al.*, 1996), das *37LRP/p40*

Gen (Jackers *et al.*, 1996), das *G16* Gen (Gure *et al.*, 1998), das *BAP1* Gen (Jensen *et al.*, 1998), und die *PC4* und *TIS7* Gene (Latif *et al.*, 1997).



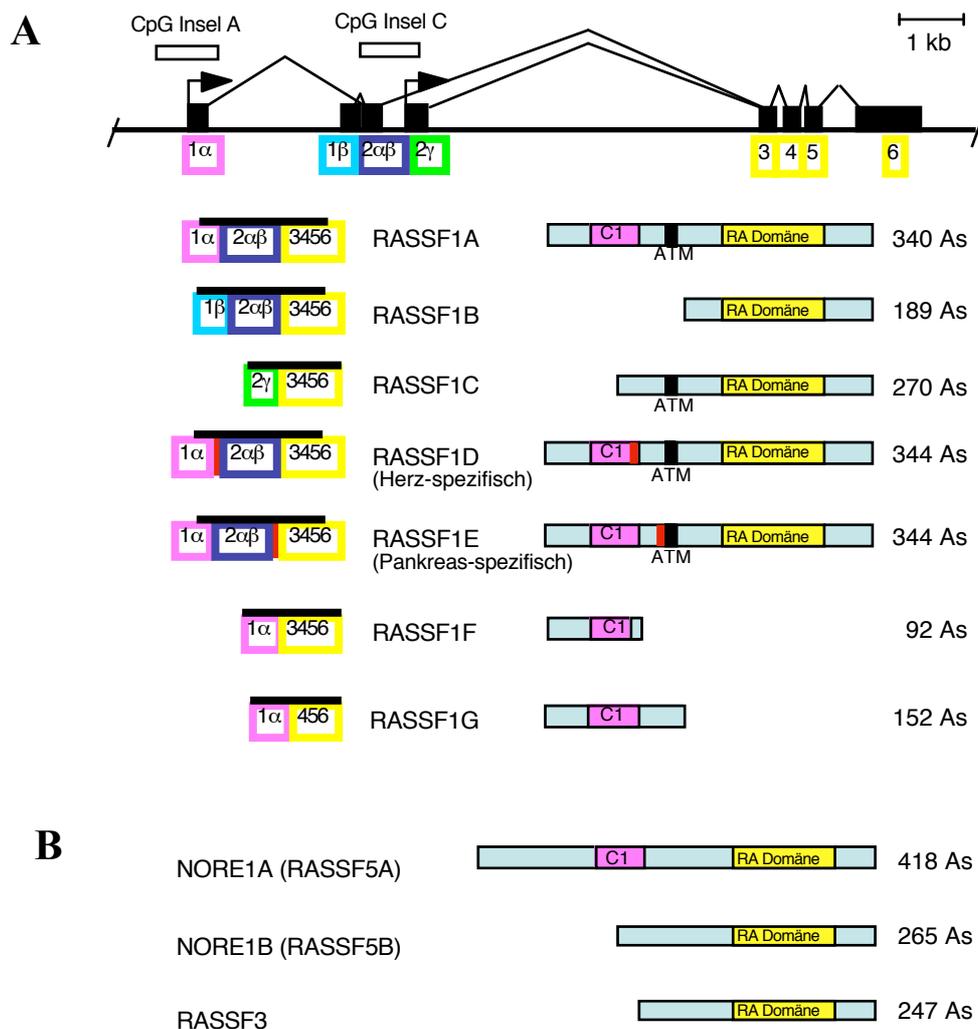
**Abb. 3:** Struktur von Chromosom 3p und Deletionen in 3p21.3 (nach Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Die Lokalisation von einigen Gene (*DUTT1/ROBO1*, *FHIT*, *MLH1*, *BAP1*, *TGFBR2*, *RARB* und *VHL*) in 3p ist angegeben. Die Region der homozygoten Deletion (gestrichelte Linie) von drei Krebszelllinien (H740, GLC20 und HCC1500) und die Position von verschiedenen Gene (*MAPKAPK3*, *PL6*, *RASSF1*, *HYAL2*, *HYAL1*, *SEMA3B*, *SEMA3F* und *G16*) in 3p21.3 ist angegeben.

Verlust des chromosomalen Abschnittes von 3p21.3 wurde nicht nur in Lungenkrebs gefunden. Auch Nierenkrebs, Blasenkarzinome, Kieferkrebs, Nasentumor, Brustkrebs und Tumore des weiblichen Geschlechtstrakts zeigen einen häufigen hemizygoten Verlust (30-60%) dieser Region (Kok *et al.*, 1997), und deshalb könnte dieses Segment ein ubiquitär wirkendes Tumorsuppressorgen kodieren. Homozygote Deletionen von 3p21.3 wurden in verschiedenen Krebszelllinien und primären Lungentumoren beschrieben (Killary *et al.*, 1992; Yamakawa *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1996; Kok *et al.*, 1997; Todd *et al.*, 1997) und durch die Kartierung der Deletionsfragmente in den Lungenkrebszelllinien H740 und GLC20 und der Brustkrebszelllinie HCC1500 wurde die Region auf eine Segmentgröße von 120 kb eingengt (Abb. 3) (Sekido *et al.*, 1998). Höchstwahrscheinlich beinhaltet diese 120 kb Deletionsregion ein Tumorsuppressorgen, doch in Lungentumoren ist keines der Gene aus diesem Segment auffallend durch Mutationen inaktiviert (Lerman and Minna, 2000). Dies verstärkt die Annahme, dass das vermutete Tumorsuppressorgen durch einen anderen Mechanismus als durch Mutationen der kodierende Sequenz inaktiviert wird.

Es ist uns gelungen ein Gen aus dieser 120 kb Deletionsregion zu klonieren und zu charakterisieren (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Es deutete sich an, dass dieses Gen ein potentieller Tumorsuppressor ist. Die cDNA dieses Genes wurde durch seine Interaktion mit dem DNA Reparatur Enzym XPA im Hefe Zwei-Hybrid-System isoliert (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]) und die 1.7 kb cDNA stimmte mit Sequenzen aus dem 120 kb homozygoten Deletionssegment überein. Der C-Terminus hatte hohe Homologie (ca. 55% Identität) zu dem „novel“ Ras Effektor 1 (Nore1) der Maus und dem orthologen Protein Maxp1 der Ratte (Vavvas *et al.*, 1998; Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Das Gen kodiert für eine Ras Assoziationsdomäne (RA Domäne) und deshalb wurde es als *Ras Assoziationsdomäne Familie 1 (RASSF1)* Gen benannt (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Nore1 interagiert mit GTP aktiviertem Ras und ist einer der wenigen Ras Effektoren (wie Raf), deren endogene Peptidsequenz mit Ras nach einer Rezeptoraktivierung assoziieren (Vavvas *et al.*, 1998). Zusätzlich zur Proliferation stimulierenden Funktion hat Ras auch wachstumshemmende und proapoptische Wirkungen. Die Ras Effektoren Nore1 und RASSF1 könnten zusammen mit der proapoptische Proteinkinase MST1 diese negativen Wachstumsfunktionen von Ras bewirken (Abb. 2) (Khokhlatchev *et al.*, 2002; Ortiz-Vega *et al.*, 2002 [Anhang 8]).

Es wurden nach weiteren cDNA Bankanalysen drei alternative gespleisste Transkripte bestimmt: *RASSF1A*, *RASSF1B* und *RASSF1C* (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Die beiden Hauptformen: *RASSF1A* und *RASSF1C* werden von zwei CpG-reichen Promotoren transkribiert, die 3.5 kb auseinander liegen (Abb. 4). Alle Transkripte haben an ihrem 3' Ende vier gemeinsame Exone (3 bis 6) (Abb. 4). Diese Exone kodieren für die RA Domäne (Ponting and Benjamin, 1996; Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). *RASSF1A* hat zwei 5' Exone, die als 1 $\alpha$  und 2 $\alpha\beta$  bezeichnet werden und die 1.9 kb cDNA von *RASSF1A* hat einen offenen Leseraster von 340 Aminosäuren (As) und ein Molekulargewicht (MW) von 38.8 kDa. Der N-Terminus (H52 bis C101) von *RASSF1A* hat hohe Homologien zu einer cystein-reichen Diacylglycerol/Phorbol-ester (DAG) Bindungsdomäne, die auch als Proteinkinase C konservierte Region (C1) bezeichnet wird und einen zentralen C1 Zinkfinger besitzt (Newton, 1995). *RASSF1A* wird in allem durch Northern Blotanalyse getesteten Normalgewebe exprimiert, doch das Transkript fehlte in einigen Krebszelllinien (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Das *RASSF1B* Transkript hat das gleiche Exon 2 $\alpha\beta$ ; aber das erste Exon 1 $\beta$  unterscheidet sich von *RASSF1A* (Abb. 4)

und ist hauptsächlich in Geweben, welches Zellen des hämatopoetischen System enthält, schwach exprimiert (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Vermutlich kodiert die 1.7 kb cDNA von *RASSF1B* nur die RA Domäne und im Maus *Rassf1* Locus fehlt das Exon 1 $\beta$  vollständig (siehe GenBank „accession number“ AF333027). Das 1.7 kb Transkript von *RASSF1C* wird am CpG-reichen Exon 2 $\gamma$  initiiert und kodiert für 270 Aa mit einem MW von 31.2 kDa. Die Proteinsequenz des ersten Exons 2 $\gamma$  hat keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen. Das *RASSF1C*-Transkript wird sowohl in normalem Gewebe als auch in Krebszellen exprimiert, die keine homozygote Deletion der Region aufweisen (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Die Aminosäuresequenz von W125 bis K138 (WETPDLSQAEIEQK) von *RASSF1A* stimmt mit einem putativen Phosphorylierungs-Motif der ATM Kinase überein, und in einem synthetischen Peptid mit dieser Sequenz wird das Serin effektiv *in vitro* phosphoryliert (Kim *et al.*, 1999).



**Abb. 4:** Die Ras Assoziationsdomänen-Familie (nach Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). **A.** Struktur der von *RASSF1* Gen kodierten Isoformen. Die beiden Promotoren von *RASSF1* (Pfeile) sind in CpG

Inseln lokalisiert (leere Kästchen). Sieben verschiedene Isoformen (*RASSF1A* bis *RASSF1G*) werden durch die beiden Promotoren und alternatives RNA Spleißing produziert (schwarze Kästchen). Die roten Kästchen stellen zusätzliche Aminosäuren von den Herz- und Pankreas-spezifischen Isoformen dar. Die Proteinlänge ist in Aminosäuren (As) angegeben und Proteindomänen sind als: DAG, Diacylglycerol/Phorbol-ester Bindedomäne; RA, RalGDS/AF6 Ras Assoziationsdomäne; ATM, Konsensussequenz für ATM Phosphorylierung bezeichnet. **B.** Die Protein Sequenz der beiden Isoformen von *NORE1* (*RASSF5A* und *RASSF5B*) und *RASSF3* ist angegeben.

*RASSF1* wurde von einer weiteren Arbeitsgruppe isoliert, die vier weitere Isoformen gefunden hat (Burbee *et al.*, 2001). Diese vier Formen: *RASSF1D*, *RASSF1E*, *RASSF1F* und *RASSF1G* sind Spleißvarianten von *RASSF1A* und werden vom gleichen CpG Insel Promotor transkribiert (Abb. 4). *RASSF1D* ist eine Herz-spezifische und *RASSF1E* eine Pankreas-spezifische Form. *RASSF1D* kodiert am 5' Ende von Exon 2 $\alpha$  $\beta$  für vier weitere Aminosäuren (LSAD) und *RASSF1E* hatte vier zusätzliche Aminosäuren (PILQ) am 3' Ende von Exon 2 $\alpha$  $\beta$ . Das *RASSF1F* Transkript überspringt Exon 2 $\alpha$  $\beta$  und kodiert für ein verkürztes Peptid von 92 As und endet in der DAG Bindedomäne (Burbee *et al.*, 2001; Schagdarsurengin *et al.*, 2002 [Anhang 6]). Bei *RASSF1G* fehlt Exon 2 $\alpha$  $\beta$  und Exon 3 und das Protein hat eine berechnete Länge von 152 As (Abb. 4). Nur das *RASSF1F*-Transkript wird häufig mit RTPCR detektiert, (Schagdarsurengin *et al.*, 2002 [Anhang 6]) doch die biologische Funktion dieser weiteren Transkripte ist unbekannt.

Es wurden zwei weitere humane Gene kloniert und charakterisiert, die für eine Ras Assoziationsdomäne kodieren und fast 60% Homologie zu *RASSF1* besitzen: das *RASSF3* Gen, welches auf 12q14.1 liegt und das *NORE1* Gen (*RASSF5*), das auf 1q32.1 liegt (Tommasi *et al.*, 2002 [Anhang 5]). Das *RASSF3* Gen besteht aus 5 Exons und kodiert für ein 247 As langes Protein (MW von 28.6 kDa), das eine konservierte RA Domäne am C-Terminus hat (Abb. 4). *RASSF3* wird in Normalgewebe und in Krebszelllinien ubiquitär exprimiert (Tommasi *et al.*, 2002 [Anhang 5]). Das *NORE1* Gen (*RASSF5*), das ortholog zu dem Maus *Nore1* Gen ist, besteht aus mindestens zwei Isoformen (*NORE1A* und *NORE1B*) (Abb. 4). Die A-Form kodiert für ein Protein mit 418 As (MW von 47 kDa) und die B-Form enthält einen offenen Leseraster von 265 As (MW von 30.5 kDa). Ähnlich wie *RASSF1A* und *RASSF1C* werden *NORE1A* und *NORE1B* von zwei CpG-reichen Promotoren transkribiert. In den meisten Normalgewebe werden beide Formen exprimiert, aber in einigen Tumorzelllinien werden diese Transkripte nur schwach transkribiert (Tommasi *et al.*, 2002 [Anhang 5]). Veränderungen von *NORE1* in Tumoren wurden jedoch nicht gefunden. Der N-Terminus von *RASSF3* und *NORE1B* haben hohe Homologie zu

RASSF1C. In NORE1 und RASSF3 fehlt die ATM Konsensusstelle, die eine SQ-Sequenz enthält (Abb. 4). Beide Gene kodieren für eine RA Domäne und sind somit potentielle Ras Effektoren, die an der Ras Signaltransduktion beteiligt sein könnten.

#### **4. Analyse von *RASSF1* in humanen Tumoren**

Die Expression des *RASSF1* Gens wurde in detaillierten Northern Blots analysiert und jedes der 16 getesteten Normalgewebe exprimierte *RASSF1A* mRNA (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Interessanterweise fehlte in einigen Krebszelllinien (Lungenkrebs, Brustkarzinom, Melanom, Leberkarzinom, Leukämie, Lymphom, Zervixkarzinom, Nierenzellkrebs Osteosarkom und Neuroblastom) das *RASSF1A* Transkript vollständig. Dagegen wird *RASSF1C* im Normalgewebe und allen Krebszellen exprimiert, die keine homozygote Deletion der Region aufweisen. In 17 Kleinzelllungen-Krebszelllinien fehlte das Transkript von *RASSF1A* vollständig (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Alle Formen von *RASSF1*, die von der *RASSF1A* CpG Insel transkribiert werden fehlen in einer Vielzahl von Tumoren, und dies deutet darauf hin, dass der *RASSF1A* Promotor in Tumoren häufig epigenetisch inaktiviert ist.

Nach der Knudson Zwei-Hit-Hypothese werden beide Allele eines Tumorsuppressorgens durch genetische Veränderungen, wie chromosomale Deletion oder Mutationen inaktiviert (Knudson, 1971). Alle Exons des *RASSF1* Gens wurden intensiv nach Mutationen analysiert, aber es wurden vor allem Polymorphismen identifiziert und nur sehr wenige Mutationen identifiziert (Tab. 1). In 58 Lungenkarzinomen wurde *RASSF1A* nach Mutationen analysiert und einige Polymorphismen und zwei „missense“ Mutationen gefunden: ATT(Ile135) zu ACT(Thr135) und GCC(Ala336) zu ACC(Thr336) (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Da das entsprechende Normalgewebe nicht vorhanden war, könnte es sich dabei auch um seltene Polymorphismen handeln (Tab. 1). Die Sequenz von *RASSF1* wurde in 114 weiteren Lungenkarzinome analysiert und es wurden nur weitere Polymorphismen gefunden aber keine somatische Mutationen entdeckt (Burbee *et al.*, 2001). In 60 Brustkarzinomen und in 10 Phäochromozytomen wurden verschiedene Polymorphismen identifiziert, doch keine inaktivierende Mutationen nachgewiesen (Agathangelou *et al.*, 2001; Astuti *et al.*, 2001; Dammann *et al.*, 2001a [Anhang 2]). In 29

Nasopharyngeal-Karzinomen wurden neben weiteren Polymorphismen auch eine „missense“ Mutation CGC(Arg201) zu CAC(His201) und eine „frameshift“ Mutation detektiert (Lo *et al.*, 2001). Weitere Polymorphismen wurden in Nierenkrebs gefunden (Dreijerink *et al.*, 2001). Insgesamt wurden in mehr als 200 Proben nur zwei somatische Mutationen identifiziert (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Mutationsanalyse des *RASSF1A* Gens in humanen Tumoren<sup>a</sup>

Veränderung	Codon <sup>b</sup>	Codonaustausch	Exon	Domäne <sup>d</sup>
Veränderung <sup>c</sup>	6	GAG(Glu) -> Asp	1 $\alpha$	
Häufiger Polymorphismus	21	AAG(Lys) -> CAG(Gln)	1 $\alpha$	
Häufiger Polymorphismus	28	CGT(Arg) -> CGA(Arg) neutral	1 $\alpha$	
Polymorphismus	49	GGC(Gly) -> GGT(Gly) neutral	1 $\alpha$	
Häufiger Polymorphismus	53	CGC(Arg) -> TGC(Cys)	1 $\alpha$	DAG
Polymorphismus	53	CGC(Arg) -> CGT(Arg) neutral	1 $\alpha$	DAG
Polymorphismus	56	CCC(Pro) -> CCT(Pro) neutral	1 $\alpha$	DAG
Polymorphismus	57	GCG(Ala) -> GCA(Ala) neutral	1 $\alpha$	DAG
Polymorphismus	60	GCC(Ala) -> ACC(Thr)	1 $\alpha$	DAG
Häufiger Polymorphismus	129	GAC(Asp) -> GAG(Glu)	3	ATM
Polymorphismus	131	TCT(Ser) -> TTT(Phe)	3	ATM
Häufiger Polymorphismus	133	GCT(Ala) -> TCT(Ser)	3	ATM
Veränderung <sup>c</sup>	135	ATT(Ile) -> ACT(Thr)	3	ATM
„missense“ Mutation	201	CGC(Arg) -> CAC(His)	4	RA
Polymorphismus	214	CTG(Leu) -> CTA(Leu) neutral	4	RA
Polymorphismus	236	GTG(Val) -> GTA(Val) neutral	4	RA
Polymorphismus	246	GAG(Glu) -> AAG(Lys)	4	RA
Häufiger Polymorphismus	257	CGG(Arg) -> CAG(Gln)	5	RA
„frameshift“ Mutation	277	1 bp Deletion bei nt 829	5	RA
Polymorphismus	325	TAT(Tyr) -> TGT(Cys)	6	
Veränderung <sup>c</sup>	336	GCC(Ala) -> ACC(Thr)	6	

<sup>a</sup> (Damman *et al.*, 2003b)

<sup>b</sup> Codon wurden in Bezug auf *RASSF1A* nummeriert.

<sup>c</sup> Diese Veränderungen sind entweder Mutationen oder seltene Polymorphismen.

<sup>d</sup> ATM: vermeintliche Konsensussequenz für ATM Phosphorylierung; DAG: Diacylglycerol/Phorbolster Bindedomäne; RA: RalGDS/AF6 Ras Assoziationsdomäne.

Sieben der 21 charakterisierten Veränderungen sind neutrale Mutationen (Tab. 1). Fünf Polymorphismen befinden sich in der DAG Bindedomäne, vier in der ATM Kinase Phosphorylierungssequenz und vier in der RA Domäne (Tab. 1). Kürzlich wurde gezeigt, dass zwei Polymorphismen (S131F und A133S) von *RASSF1A*, die in der potentiellen Phosphorylierungssequenz der ATM Kinase liegen, für Proteine kodieren, die nicht die Zellzyklusprogression blockieren können (Shivakumar *et al.*, 2002). Deshalb wird es interessant sein, zu analysieren ob gewisse Polymorphismen die betroffenen Individuen mehr empfänglich für Lungenkrebs machen. In Lungentumoren ist die Mutationsrate von

den anderen Genen, die in der homozygoten Deletionsregion von 3p21.3 liegen, ebenfalls sehr gering. Dies bekräftigt die Vermutung, dass das putative Tumorsuppressorgen von 3p21.3 durch epigenetische Modifikationen inaktiviert werden könnte.

## **5. Epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* in Tumoren**

Zusätzlich zu Deletionen und Mutationen kann die Funktion von Tumorsuppressorgen auch durch Promotor Hypermethylierung verloren gehen (Jones and Laird, 1999; Baylin and Herman, 2000). Es deutet sich an, dass CpG Insel Methylierung einer der ersten und häufigsten Mechanismen ist, der für die Inaktivierung von Genen in der Karzinogenese verantwortlich ist. Die Mehrzahl der Gene des menschlichen Genoms haben GC-reiche Sequenzen am 5' Ende, in denen das Dinukleotide CpG 4-5 mal häufiger ist, als es in den meisten Regionen des Genoms auftritt und diese CpG-reichen Sequenzen werden als CpG-Inseln bezeichnet (Bird, 1986). Die Mehrzahl dieser CpG-Inseln sind in normalem Gewebe unmethyliert, können aber in Tumoren *de novo* methyliert werden (Baylin *et al.*, 1998; Jones and Baylin, 2002). Diese *de novo* Methylierung korreliert mit der Inaktivierung der Transkription und mit der Deacetylierung des Chromatins durch Histondeacetylase (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die CpG-Inseln der Tumorsuppressorgene *Rb*, *p16*, *VHL*, *APC*, *MLH1* und *BRCA1* häufig in humanen Karzinomen methyliert vorliegen, jedoch im entsprechenden Normalgewebe nicht methyliert sind (Baylin *et al.*, 1998; Jones and Baylin, 2002). Es ist beeindruckend, dass Tumorsuppressorgene mindestens so häufig durch Promotor Hypermethylierung inaktiviert werden, verglichen mit der Inaktivierung durch Mutationen der kodierenden Sequenzen. Deshalb wird angenommen, dass die epigenetische Inaktivierung eine zentrale Rolle in der Krebsentstehung spielt.

Der Promotor von *RASSF1A* enthält eine CpG-Insel, die auf ihre Methylierung untersucht wurde. Ein 204 bp großes DNA Fragment, das 16 CpGs, drei Bindungssequenzen für den Sp1 Transkriptionsfaktor, die putative Transkriptions-Initiationsequenz und Translationsstart von *RASSF1A* enthält, wurde mit der Bisulfit Methode auf den Methylierungsstatus der Cytosine analysiert (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). In normalen bronchialen Epithelialzellen und humanen Fibroblasten waren alle Cytosine

unmethyliert. In 16 Kleinzell-Lungenkrebszelllinien war diese Region vollständig methyliert und nur in einer Zelllinie partiell methyliert (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Diese Methylierung korrelierte mit der Transkription von *RASSF1A* in den gleichen Zellen. Das Methylierungsmuster der beiden CpG Insel Promotoren von *RASSF1A* und *RASSF1C* und deren Expression wurde in einer Vielzahl von Krebszelllinien und Gewebeproben analysiert. In allen normalen Gewebeproben wurden *RASSF1A* und *RASSF1C* transkribiert (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]; Dammann *et al.*, 2001a [Anhang 2]). *RASSF1A* Expression fehlte jedoch in verschiedenen Krebszelllinien: Lungenkrebs, Brustkarzinom, Prostatatumor und Schilddrüsenkrebs, und in diesen Zelllinien war der *RASSF1A* Promotor methyliert (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]; Dammann *et al.*, 2001a [Anhang 2]; Dammann *et al.*, 2001b [Anhang 3]; Liu *et al.*, 2002 [Anhang 7]; Pfeifer *et al.*, 2002; Schagdarsurengin *et al.*, 2002 [Anhang 6]). Im Gegensatz dazu war der *RASSF1C* Promotor in allen analysierten Proben (homozygote Deletion ausgenommen) unmethyliert und wurde transkribiert (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]; Dammann *et al.*, 2001a [Anhang 2]; Dammann *et al.*, 2001b [Anhang 3]; Schagdarsurengin *et al.*, 2002 [Anhang 6]; Dammann *et al.*, 2003a [Anhang 12]). In primären Tumoren werden Expressionsanalysen durch das Vorhandensein der normalen Zellen erschwert. Dennoch ist in primären Brust-, Ovarial-, Nieren- und Schilddrüsentumoren die *RASSF1A* Expression stark herabgesetzt (Yoon *et al.*, 2001 [Anhang 4]; Dammann *et al.*, 2001a [Anhang 2]; Schagdarsurengin *et al.*, 2002 [Anhang 6]). Der Expressionsverlust wurde mit Hypermethylierung der CpG-Insel von *RASSF1A* korreliert (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]; Schagdarsurengin *et al.*, 2002 [Anhang 6]). Weiterhin kann die epigenetische Inaktivierung durch eine Behandlung mit dem DNA Methylierungs-Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) umgekehrt werden (Jones and Taylor, 1980). Diese Chemikalie inhibiert die DNA Methyltransferasen und führt zur passiven Demethylierung der DNA durch die Replikation. Eine Behandlung von verschiedenen Krebszelllinien mit 5-Aza-CdR führte zur Reexpression von *RASSF1A* und zur Demethylierung des *RASSF1A* Promotors (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]; Dammann *et al.*, 2001a [Anhang 2]; Liu *et al.*, 2002 [Anhang 7]; Schagdarsurengin *et al.*, 2002 [Anhang 6]; Schagdarsurengin *et al.*, 2003 [Anhang 9]; Spugnardi *et al.*, 2003 [Anhang 11]).

In Krebszelllinien müssen Resultate über die Methylierung von Genen mit Vorsicht betrachtet werden, da die Methylierung in Zelllinien oftmals höher ist als in den primären

Tumoren (Antequera *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1990; Smiraglia *et al.*, 2001). Die Inaktivierung des *RASSF1A* Genes wurde in 58 primären Nicht-Kleinzell-Lungentumoren und in 28 primären Kleinzell-Lungentumoren analysiert (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]; Dammann *et al.*, 2001b [Anhang 3]). Der Methylierungsstatus der CpG Insel des *RASSF1A* Gens wurde mit der Bisulfit Technik bestimmt und alle 19 normalen Lungengewebebeobachten waren unmethyliert. In 22 der 28 (=79%) der primären Kleinzell-Lungentumore war der *RASSF1A* Promotors methyliert (Dammann *et al.*, 2001b [Anhang 3]). Sieben der 19 (=37%) untersuchten squamösen Lungentumor waren methyliert, sieben der 25 (=28%) Adenokarzinome und acht der 14 (=57%) Großzell-Lungentumore waren ebenfalls methyliert (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Es wurde keine Methylierung der *RASSF1C* CpG Insel gefunden und dies stimmt mit den Expressionsdaten überein. Insgesamt wurden in 22 der 58 (=38%) Nicht-Kleinzell-Lungenkarzinome und in 79% der Kleinzell-Lungentumore eine starke Methylierung des *RASSF1A* Promotor identifiziert. Weitere Studien fanden im primären Nicht-Kleinzell-Lungenkrebs 30% bis 34% Methylierung von *RASSF1A* (Agathangelou *et al.*, 2001; Burbee *et al.*, 2001; Tomizawa *et al.*, 2002).

Exogene Expression von *RASSF1A* in Lungenkrebszelllinien, die *RASSF1A* inaktiviert hatten, bewirkte eine Verringerung der Kolonieformation *in vitro* und der Tumorbildung *in vivo* (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Interessanterweise wurde für Nicht-Kleinzell-Lungenkrebs Patienten mit methylierten *RASSF1A* Gen eine beeinträchtigte Überlebensrate (P=0.046) ermittelt (Burbee *et al.*, 2001) und in Lungen-Adenokarzinomen (Stadium I) korreliert *RASSF1A* Methylierung ebenfalls mit einer verschlechterten Überlebensrate korreliert (P=0.0368 bivariable Analyse und P=0.032 Multivarianz Analyse) (Tomizawa *et al.*, 2002). Zusätzlich wurde *RASSF1A* Methylierung in 32% der Adenokarzinome gefunden und wurde häufiger in Tumoren mit vaskulärer Invasion und pleuraler Beteiligung detektiert. *RASSF1A* Inaktivierung wurde öfters in schlecht differenzierten Tumoren als in gut (P=0.00059) oder mäßig (P=0.0835) differenzierten Adenokarzinomen nachgewiesen. Die veränderte Promotor Methylierung von *RASSF1A* und anderer Tumorsuppressorgene (z.B. *p16*, *MGMT* und *DAP-Kinase*) wurde im bronchialen Epithelgewebe und im Sputum von aktiven Rauchern und Ex-Rauchern analysiert. Es wurde keine *RASSF1A* Inaktivierung in Epithel nachgewiesen und nur in 2 von 66 (=3%) der Sputum-Kontrollen entdeckt (Belinsky *et al.*, 2002). Dieses Ergebnis

könnte darauf hinweisen, dass die Inaktivierung von *RASSF1A* ein späteres Ereignis in der malignen Transformation von bronchialem Epithelgewebe ist.

Die Inaktivierung des *RASSF1A* Promotors wurde in humanen Brustkrebszelllinien und im primären Mammakarzinom analysiert. In allen der fünf untersuchten Zelllinien (MCF7, MDAMB157, MDAMB231, T47D und ZR75-1) war die CpG Insel des *RASSF1A* Genes vollständig methyliert und die Transkription war reprimiert (Dammann *et al.*, 2001a [Anhang 2]). In 28 von 45 (=62%) der primären Mammatumoren war der *RASSF1A* Promotor inaktiviert, und das Ausmaß der Methylierung lag bei diesen nicht mikrosektionierten Tumoren zwischen 50% und 90% (Dammann *et al.*, 2001a [Anhang 2]). Wenn mehr als 50% des Produkte methyliert sind bedeutet dies, dass entweder beide Allele methyliert sind oder ein Allel methyliert und das andere verloren wurde. Die Methylierungsausmaße liegen im allgemeinen unter 90%, da normale unveränderte Zellen stets im Tumor vorhanden sind. Ein geringes Maß von Methylierung (weniger als 25% und schwächer als im entsprechenden Tumor) wurden bei 3 von den 40 (=7.5%) entsprechenden normalen Brustgewebeproben nachgewiesen (Dammann *et al.*, 2001a [Anhang 2]). Die Methylierung der *RASSF1A* CpG Insel und Verlust der Transkription wurden korreliert und das *RASSF1A* Transkript wurde nach Behandlung der Brustkrebszelllinien mit dem Methylierungsinhibitor 5-Aza-CdR reexprimiert (Dammann *et al.*, 2001a [Anhang 2]). Eine andere Studie fand 49% *RASSF1A* Methylierung in primären Mammakarzinom (Burbee *et al.*, 2001) und eine weitere Arbeit nur 9% Methylierung in den Brustkrebsproben (Agathangelou *et al.*, 2001). Die Aberration des *RASSF1A* Promotors wurden während der Brustkrebsentstehung analysiert (Lehmann *et al.*, 2002). *RASSF1A* war fast vollständig in 56% der duktaalen Brustkarzinome methyliert. *RASSF1A* Inaktivierung wurde auch in epithelialer Hyperplasie und intraduktalen Papilloma detektiert, aber nicht in Lymphozyten, Stroma, normalem Brustepithel, laktierendem Brustgewebe und apokriner Metaplasie entdeckt. Diese Resultate deuten an, dass *RASSF1A* Hypermethylierung eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Brustkrebs spielen könnte.

Der Chromosomabschnitt 3p ist die in Klarzell-Nierenzellkarzinom am häufigsten deletierte Region und deshalb wurde eine wichtige Rolle des Segmentes vermutet (Kok *et al.*, 1997). In Segment 3p24 wurde das von *Hippel Lindau* (*VHL*) Gen, das für eine Form des hereditären Nierenkrebs verantwortlich ist, identifiziert (Latif *et al.*, 1993). Doch in einer

großen Anzahl von sporadischen Klarzell-Nierenzellkarzinomen fehlten Mutationen des *VHL* Genes und die Beteiligung eines Genes aus 3p21 wurde angenommen (van den Berg *et al.*, 1996; van den Berg and Buys, 1997; Clifford *et al.*, 1998; Kok *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2000). Die Region der homozygoten Deletion der Lungen- und Brustkrebszelllinien beinhaltet auch die kleinste Region der überlappenden heterozygoten Deletion im Nierenzellkarzinom (Kok *et al.*, 2000). Der Promotor von *RASSF1A* wurde in Nierenzelltumoren auf seine Methylierung untersucht und in diesen primären Tumoren waren 18 der 32 (=56%) Proben methyliert (Yoon *et al.*, 2001 [Anhang 4]). Es wurde von Inaktivierung des *RASSF1A* Gens sowohl in Nierentumoren mit *VHL* Inaktivierung als auch in Nierenzellkarzinomen ohne Veränderungen des *VHL* Genes berichtet (Dreijerink *et al.*, 2001). In den 39 von 43 (=91%) der analysierten primären Nierentumoren und in allen der 18 Nierenkrebszelllinien wurde eine aberrante Methylierung von *RASSF1A* identifiziert. Exogene Expression von *RASSF1A* in einer Nierenkarzinomzelllinie, die *RASSF1A* inaktiviert hatte, bewirkte eine Verringerung der Wachstums und der Kolonieformation in weichem Agar (Dreijerink *et al.*, 2001). In einer weiteren Studie wurde Hypermethylierung des *RASSF1A* Promotors in 32 von 138 (=23%) der primären Klarzell-Nierenzellkarzinome gefunden und auch hier war die Methylierung unabhängig von der *VHL* Inaktivierung (Morrissey *et al.*, 2001). Obwohl der Verlust von Chromosom 3p selten in papillärem Nierenzellkrebs nachgewiesen wurde ist eine *RASSF1A* Hypermethylierung häufig und in 44% der analysierten papillären Nierenzellkarzinomen detektiert. Diese Resultate deuten an, dass das *RASSF1A* Gen der Kandidat aus der Region 3p21.3 für die Tumorsuppression im Nierenzellkarzinom sein könnte und seine aberrierende Methylierung nicht nur in Lungenkarzinomen und Brusttumoren, sondern ebenfalls im Nierenzellkarzinom häufig zu finden ist.

Die Methylierung des *RASSF1A* Promotors wurde in Dickdarmkrebs analysiert (Yoon *et al.*, 2001 [Anhang 4]). Die normale Darmschleimhaut war nicht methyliert und nur drei der 26 (=12%) Tumoren zeigten eine Methylierung von *RASSF1A* (Yoon *et al.*, 2001 [Anhang 4]). Die geringe Häufigkeit der Methylierung kann verschiedene Ursachen haben: einerseits könnte Inaktivierung von *RASSF1A* in diesen Tumoren keine wichtige Rolle für die Tumorentstehung des Kolonkarzinoms spielen oder andererseits könnten Veränderungen von anderen Proteinen vermehrt auftreten, die eine indirekte Veränderung der durch Inaktivierung von *RASSF1A* initiierten Karzinogenese bewirken. Es wurde

gezeigt, dass *K-Ras* Mutationen an Codon 12 und 13 hauptsächlich in Tumoren auftreten, die keine *RASSF1A* Methylierung aufwiesen (van Engeland *et al.*, 2002). In dieser Studie wurden in 20% der Kolontumore eine *RASSF1A* Promotor-Methylierung nachgewiesen und in 39% der Tumore wurden *K-Ras* Mutationen identifiziert. Interessanterweise wurden *RASSF1A* Inaktivierungen vor allem in Tumoren ohne *K-Ras* Veränderungen ( $P=0.023$ ) nachgewiesen, und dies könnte ein alternativer Weg sein, die von Ras regulierten Signaltransduktion in der Karzinogenese zu manipulieren. Im Pankreaskarzinom wurde diese analoge inverse Korrelation zwischen *K-Ras* Mutationen und *RASSF1A* Methylierung bestätigt (Dammann *et al.*, 2003a [Anhang 12]).

Die Methylierung des *RASSF1A* Gens wurde in der Pathogenese des Pankreaskrebs untersucht. Die *RASSF1A* Hypermethylierung wurde in 29 von 45 (=64%) der primären Adenokarzinomen, in 10 von 12 (=83%) der neuroendokrinen Tumoren und in 8 von 18 (=44%) der Pankreatiden gefunden (Dammann *et al.*, 2003a [Anhang 12]). In sieben von acht Pankreaskrebszelllinien war das *RASSF1A* Gen inaktiviert wurde nach der Behandlung mit 5-Aza-CdR reexprimiert. Da *RASSF1A* als proapoptotischer Ras Effektor in der Signaltransduktion wirkt, wurden die aktivierenden *K-Ras* Mutationen mit der *RASSF1A* Inaktivierung verglichen. *K-Ras* Mutationen wurden in 16 von 45 (=36%) der primären Adenokarzinomen nachgewiesen und waren signifikant häufiger in Karzinomen mit unmethylierten *RASSF1A* Gen (69%) und *vice versa* ( $P=0.001$ ) (Dammann *et al.*, 2003a [Anhang 12]). Diese Befunde verdeutlichen, dass *RASSF1A* als negativer Ras Effektor wirkt und zeigen weiterhin, dass die *RASSF1A* Inaktivierung in Pankreaskrebs und in Pankreatitis, das als Risikofaktor für die Entstehung von Pankreaskarzinomen gilt, häufig ist.

In Zervixkarzinomen und Ovarialtumoren wurde ein häufiger Verlust des Chromosoms 3p nachgewiesen und das Segment 3p21 ist bis zu 57% der Fälle betroffen (Wistuba *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2000). Drei Ovarialkrebs-Suppressionsfragmente wurden durch Monochromosom-Transfer-Studien identifiziert und eine dieser Regionen überlappte mit dem Segment 3p21.3, das auch in Lungen- und Brustkrebs deletiert ist (Fullwood *et al.*, 1999). Methylierung von *RASSF1A* wurde in 8 von 20 (=40%) der Ovarialtumore gefunden (Yoon *et al.*, 2001 [Anhang 4]) und in einer weiteren Studie zeigten 10% der Ovarialkarzinome Inaktivierung von *RASSF1A* (Agathangelou *et al.*, 2001). Im Gebärmutterhalskrebs wurde die *RASSF1A* Methylierung in 14 der 97 (=14%) primären Tumore nachgewiesen (Kuzmin *et al.*, 2003 [Anhang 10]). Der *RASSF1A* Promoter war in

4 der 42 (=10%) squamösen Zervixkarzinome, in 4 der 19 (=21%) adenosquamösen Tumore und in 8 der 34 (=24%) Adenokarzinome inaktiviert. Bei der Karzinogenese des Gebärmutterhalstumors ist die Infektion mit humanen Papillomavirus (HPV) häufig mitbeteiligt (zur Hausen, 1989). In den untersuchten squamösen Zervixkarzinomen wurde kein Tumor gefunden, der sowohl *RASSF1A* Methylierung als auch HPV Infektion aufwies (Kuzmin *et al.*, 2003 [Anhang 10]). Gleiche Ergebnisse wurden in den acht analysierten Zervixkrebszelllinien gefunden: die *RASSF1A* Inaktivierung und HPV Infektion schlossen sich gegenseitig aus ( $P=0.0357$ ). Somit wurde im Zervixkarzinom eine umgekehrte Korrelation zwischen der *RASSF1A* Inaktivierung und der HPV Infektion nachgewiesen ( $P\leq 0.05$ ) (Kuzmin *et al.*, 2003 [Anhang 10]). Dies deutet darauf hin, dass diese sich ausschließenden Veränderungen gleiche funktionelle Auswirkungen auf die Entstehung von Zervixtumoren haben könnten und beide Ereignisse den Retinoblastom-Signalweg in den Tumoren manipulieren.

In Prostatatumoren wurde die Inaktivierung von *RASSF1A* in 37 von 52 (=71%) der primären Tumoren nachgewiesen und die Methylierung wurde häufiger in den aggressiveren Tumoren gefunden, als in den weniger malignen Karzinomen (Liu *et al.*, 2002 [Anhang 7]). In Tumoren mit einem hohen „Gleason“-Wert von 7-10 wurde signifikant mehr methyliert als die Tumore mit einem niedrigen Wert von 4-6 ( $P=0.032$ ) (Liu *et al.*, 2002 [Anhang 7]). Inaktivierung des *RASSF1A* Gens wurde in einer Prostatakrebszelllinie gefunden und das *RASSF1A* Transkript wurde nach Behandlung mit dem Methylierungsinhibitor 5-Aza-CdR in dieser Krebszelllinie reexprimiert (Liu *et al.*, 2002 [Anhang 7]). In einer weiteren Arbeit wurde aberrierende Methylierung in 53% der Tumore gefunden und *RASSF1A* Inaktivierung war ebenfalls mit einem hohem „Gleason“-Wert assoziiert ( $P<0.0001$ ) und war auch präoperativ mit einem erhöhten Prostata-Antigen im Serum verbunden ( $P=0.005$ ) (Maruyama *et al.*, 2002). Eine dritte Studie wies eine vollständige Methylierung von *RASSF1A* in sieben der 11 mikrosektionierten Prostatakarzinomen nach und die übrigen vier Proben waren partiell methyliert (Kuzmin *et al.*, 2002). In fünf Prostatakrebszelllinien wurde Inaktivierung von *RASSF1A* gefunden, aber nicht in weiteren vier Krebszelllinien, die durch Transformation mit humaner Papillomavirus DNA für die Zellkultur etabliert wurden (Kuzmin *et al.*, 2002). Dies könnte, ähnlich wie bei Zervixkrebs, auf eine sich ausschließende Korrelation zwischen *RASSF1A* Inaktivierung und HPV Infektion hinweisen und beide Ereignisse könnten eine wichtige

Rolle in der neoplastischen Transformation und Immortalisierung von Prostata-Epithelzellen spielen.

Der Methylierungsstatus des *RASSF1A* Promotors wurde in 38 primären Schilddrüsentumoren analysiert (Schagdarsurengin *et al.*, 2002 [Anhang 6]). In 27 (=71%) dieser Karzinome wurde eine Hypermethylierung der *RASSF1A* CpG Insel nachgewiesen, und in 8 Schilddrüsenkrebszelllinien war der *RASSF1A* Promotor vollständig methyliert und die Expression fehlte. Die Behandlung dieser Zelllinie mit dem DNA Methylierungsinhibitor 5-Aza-CdR reaktivierte die *RASSF1A* Transkription. *RASSF1A* Inaktivierung wurde in allen Stadien der primären Schilddrüsentumore detektiert. Die *RASSF1A* Methylierung wurde in 80% der medullären Schilddrüsentumore, in 78% der undifferenzierten Schilddrüsentumore und in 70% der follikulären Schilddrüsenkarzinome nachgewiesen (Schagdarsurengin *et al.*, 2002 [Anhang 6]). Dagegen wurde die *RASSF1A* Methylierung nur in 62% der weniger malignen papillären Schilddrüsentumore gefunden und die *RASSF1A* Methylierung war mit der Aggressivität der Schilddrüsenkarzinome assoziiert.

Die epigenetische Inaktivierung des *RASSF1A* Gens wurde im malignen Melanom der Haut analysiert (Spugnardi *et al.*, 2003 [Anhang 11]). Die Hypermethylierung von zwei verschiedenen Regionen der CpG Insel des *RASSF1A* Promotors wurde untersucht. Region 1 ist dem ersten Exon (1 $\alpha$ ) vorgelagert und Region 2 liegt im ersten Exon. Es wurden 11 Melanomkrebszelllinien und 44 primäre Tumoren analysiert (Spugnardi *et al.*, 2003 [Anhang 11]). Methylierung der Region 1 wurde in 7 (=64%) der Zelllinien und in 18 (=41%) der Tumoren nachgewiesen. Die Region 2 war in 9 (=82%) der Zelllinien und in 22 (=50%) der primären Tumoren methyliert. Alle Zelllinien mit einer Hypermethylierung der Region 1 hatten ebenfalls die Region 2 methyliert. Die Methylierung von beiden Regionen korrelierte mit dem Verlust der *RASSF1A* Expression und diese Inaktivierung wurde durch Behandlung der Krebszelllinien mit 5-Aza-CdR aufgehoben. In gesunden Hautgewebe und in den Lymphozyten von gesunden Spender wurde keine Methylierung nachgewiesen (Spugnardi *et al.*, 2003 [Anhang 11]). Zusammengefasst wurde die Inaktivierung von *RASSF1A* in 55% der Melanomtumore nachgewiesen und diese Inaktivierung könnte eine wichtige Rolle in der Entstehung des malignen Melanoms spielen.

Die Inaktivierung des *RASSF1A* Promotors wurde in primären Lebertumoren analysiert (Schagdarsurengin *et al.*, 2003 [Anhang 9]). In 93% der Leberkarzinome war das

*RASSF1A* Gen inaktiviert und Methylierung wurde ebenfalls in Leberfibrose und Zirrhose gefunden. Es wurde auch die Methylierung des Zellzyklusinhibitors *p16* und andere Tumorgene (*TIMP3*, *PTEN*, *CDH1* und *RAR $\beta$ 2*) in den Leberkarzinomen untersucht. *p16* Inaktivierung wurde in 71% der Leberkarzinome entdeckt und die Inaktivierung der anderen Tumorgene war deutlich geringer (25% für *TIMP3*, 17% für *PTEN*, 13% für *CDH1* und 7% für *RAR $\beta$ 2*) (Schagdarsurengin *et al.*, 2003 [Anhang 9]). Interessanterweise wurde keine Methylierung von *RASSF1A* in hepatozellulären Adenomen gefunden, die im Gegensatz zu Leberkarzinomen ohne Zirrhose und viraler Infektion sind und verstärkt dadurch die Vermutung, dass in der Leberkrebsentstehung eine Progression von Adenom zu Karzinom selten stattfindet.

Epigenetische Inaktivierung des *RASSF1A* Promotors wurde häufig in primären Tumorgewebe und in Krebszelllinien gefunden. Aberrierende Promoter-Methylierung und Verlust der Heterozygotie sind die präferentiellen Mechanismen, die zur Inaktivierung von beiden Allelen des *RASSF1A* Gens in der Krebsentstehung führen. Die *RASSF1A* Hypermethylierung ist eine der häufigsten Veränderungen in der Pathogenese von Krebs, verglichen mit anderen Tumorsuppressorgenen. Folglich könnte die Inaktivierung von *RASSF1A* in der Karzinogenese eine zentrale Rolle spielen.

## **6. Wechselwirkungen zwischen RASSF1A und Ras**

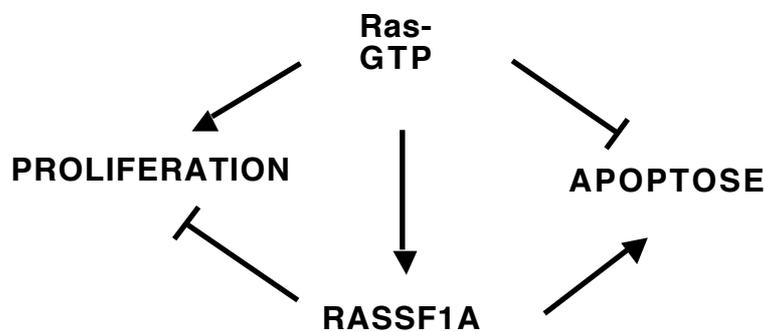
Die aktivierte Ras GTPase ist gewöhnlich mit einer verstärkten zellulären Proliferation, einer Transformation und einem besseren Zellüberleben gekoppelt (Abb. 3), doch interessanterweise induziert Ras auch wachstumshemmende Effekte (Bar-Sagi and Feramisco, 1985; Serrano *et al.*, 1997) und Apoptose (Mayo *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Downward, 1998; Shao *et al.*, 2000). Ras Effektoren wie *RASSF1A* könnten für diese Inhibition der Proliferation und für die Induktion der Apoptose mitverantwortlich sein und folglich sollten diese inhibierenden Signaltransduktionswege während der Pathogenese von Krebs inaktiviert werden. Die RA Domäne am C-Terminus von *RASSF1* C-Terminus hat hohe Homologie (ca. 55% Identität) zu dem „novel“ Ras Effektor 1 (Nore1) der Maus (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Nore1 interagiert mit GTP aktiviertem Ras und ist einer der wenigen Ras Effektoren (wie Raf), deren endogene Peptidsequenz mit Ras nach

einer Rezeptoraktivierung assoziieren (Ortiz-Vega *et al.*, 2002 [Anhang 8]). Es wurde gezeigt, dass RASSF1 das Ras Protein in Abhängigkeit von GTP bindet und die Überexpression von RASSF1 löst die Apoptose aus (Vos *et al.*, 2000; Ortiz-Vega *et al.*, 2002 [Anhang 8]). Dieser proapoptotische Effekt wird durch transiente Transfektion von aktiviertem Ras verstärkt und durch dominant negatives Ras inhibiert (Vos *et al.*, 2000). Doch verwendete Vos *et al.*, 2000 in den Experimenten die RASSF1C Isoform, die zwar die RA Domäne enthält, jedoch nicht in Tumoren epigenetisch inaktiviert ist. Andere Experimente zeigten, dass RASSF1A für die Bindung an Ras die Heterodimerbildung mit Nore1 benötigt und RASSF1A an Ras nur schwach bindet (Ortiz-Vega *et al.*, 2002 [Anhang 8]). RASSF1A und Nore1 interagieren mit der MST1 Kinase, welche an den proapoptotischen Effekte von Ras mitbeteiligt ist.

Es wurden gezeigt, dass RASSF1A den Zellzyklus arretieren kann, indem es den Retinoblastom (Rb) Zellzykluskontrollpunkt aktiviert (Shivakumar *et al.*, 2002). In mit Papillomavirus (HPV) infizierten Zellen wird die regulatorische Wirkung dieses Kontrollpunktes durch die Interaktion von Rb mit dem HPV exprimierten E7 Protein umgangen und die HPV infizierten Zellen sind somit gegen den von RASSF1A induzierten Zellzyklusstopp resistent. Im Zervixkarzinom wurde eine umgekehrte Korrelation zwischen der *RASSF1A* Inaktivierung und der HPV Infektion nachgewiesen (Kuzmin *et al.*, 2003 [Anhang 10]). Zusätzlich hemmt RASSF1A die Akkumulation von nativen Cyclin D1 (Shivakumar *et al.*, 2002) und deshalb kann der von RASSF1A induzierte Wachstumsstopp durch die ektopische Expression von Cyclin aufgehoben werden (Abb. 2). Interessanterweise kann die zusätzliche Expression von onkogenem Ras12V den von RASSF1A bewirkten Wachstumsstopp nicht aufheben und die Expression von RASSF1A-Isoformen, die einen Polymorphismus in der Phosphorylierungssequenz der ATM Kinase haben, konnten nur vermindert die zelluläre Proliferation blockieren.

In einer normalen Zelle besteht ein Gleichgewicht zwischen den wachstumsaktivierende Funktionen von Ras und den inhibierenden Signalen von RASSF1A (Abb. 5). Deshalb könnten Veränderung in diesem Gleichgewicht zur Krebsentstehung führen. Verlust der *RASSF1A* Expression könnte die proliferations-induzierende Funktion von Ras verstärken, ohne dass aktivierende Mutationen von Ras dafür benötigt werden und *vice versa*. Zum Beispiel treten in Kolonkrebs *RASSF1A* Inaktivierung vor allem in Tumoren ohne Mutationen des *K-Ras* Genes auf und könnten ein alternativer Weg sein, den Ras

Signalübertragungsweg zu verändern (van Engeland *et al.*, 2002). Unsere Resultate zeigen eine ähnliche inverse Korrelation zwischen *K-Ras* Mutationen und *RASSF1A* Methylierung im Pankreaskarzinom (Dammann *et al.*, 2003a [Anhang 12]). In Kleinzell-Lungentumoren werden sehr selten Ras Mutationen gefunden (< 1%) (Mitsudomi *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 1993) und in diesen Tumoren ist eine hohe Inaktivierung von *RASSF1A* nachgewiesen worden (Dammann *et al.*, 2001b [Anhang 3]). Der Befund, dass *RASSF1A* Inaktivierung und *K-ras* Aktivierung in der Karzinogenese sich meist gegenseitig ausschließen, bestätigt die Funktion von *RASSF1A* als negativen Effektor von Ras.



**Abb. 5:** Modell der von *RASSF1A* und Ras induzierten Krebsentstehung. In einer normalen Zelle besteht ein Gleichgewicht zwischen der Ras Signaltransduktion und der inhibierenden Funktion von *RASSF1A*. Onkogene Aktivierung von Ras oder epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* induziert die zelluläre Proliferation und inhibiert die Apoptose.

## 7. Tumorsuppression durch *RASSF1A*

Epigenetische Inaktivierung an sich ist für ein *bona fide* Tumorsuppressorgen nicht ausreichend um seine Mitwirkung in der Krebsentstehung geltend zu machen (Baylin and Herman, 2001). Ein weiterer Nachweis für die Tumorsuppressionsfunktion von *RASSF1A* ist dessen Wiedereinführung in humanen Krebszelllinien, deren endogene Transkription von *RASSF1A* epigenetisch inaktiviert ist. In Lungenkrebszelllinien, Nierenkrebszelllinien und Prostatakrebszelllinien führten die Transfektion von *RASSF1A* zu einer reduzierten Kolonieanzahl und von einem verringertem Verankerungs-unabhängigem Wachstum in weichem Agar (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]; Burbee *et al.*, 2001; Dreijerink *et al.*, 2001; Kuzmin *et al.*, 2002). Dagegen wurde bei ektopischer Expression der *RASSF1C* Isoform nur eine leichte Reduktion der Karzinogenität von Krebszellen *in vitro* gefunden (Ji

*et al.*, 2002). Mutiertes RASSF1A (Cys65Arg und Val211Ala) hatte nur eine reduzierte wachstumshemmende Wirkung, verglichen mit dem nativen RASSF1A (Dreijerink *et al.*, 2001). Das Tumorstadium dieser transfizierten Krebszelllinien wurde auch in nackten Mäusen untersucht, die durch ihre fehlende Immunantwort das Wachstum und die Analyse von humanen Zellen ermöglichen. Die Zellen, denen die *RASSF1A* Expression fehlte, formten größere Tumoren verglichen zu den gleichen Zellen die exogenes RASSF1A erzeugen (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]). Die Reinsertion von *RASSF1A* hemmt die Karzinogenität von Krebszellen und verdeutlicht somit die Funktion von RASSF1A als Tumorsuppressor.

## 8. Ausblick

Inaktivierung des *RASSF1A* Genes ist eine der häufigsten Veränderungen, die in der Entstehung von humanem Krebs identifiziert wurde. In einer Vielzahl von soliden Tumoren trägt die Kombination zwischen chromosomalem Verlust von 3p21.3 und Hypermethylierung der *RASSF1A* CpG-Insel zur Inaktivierung dieses Genes bei. Dagegen sind Mutationen des *RASSF1A* Gens rar. Interessanterweise wird in der Literatur nur von wenigen Familienstudien mit erhöhter Lungenkrebsanfälligkeit berichtet und deshalb könnte angenommen werden, dass inaktivierende Keimbahnmutationen von *RASSF1A* selten sind. Andererseits soll geklärt werden, ob die beschriebenen Polymorphismen von *RASSF1A*, die betroffenen Individuen anfälliger für Krebs machen.

Mausmodelle des menschlichen Krebses sind für unser Wissen über die Tumorentstehung essentiell und eine „Knock-out“-Maus des *RASSF1A* Gens könnte die Funktion dieses Genes verständlich machen. Transgene Mäuse, die das SV40 T-Antigen exprimierten, zeigten einen häufigen Verlust von einem Genabschnitt in Chromosom 9, der als Loh-1 bezeichnet wurde (Dietrich *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2002). Loh-1 liegt in einer Region mit Syntenie zur humanen chromosomalen Region von 3p21.3. Es wird deshalb interessant sein, zu klären ob Mäuse mit heterozygoten oder homozygoten Deletion von *Rassf1a* für Tumore anfälliger sind als der Wildtyp. Smith *et al.*, 2002 erzeugte eine Maus mit einer Deletion von 370 kb der Region, welche zu 3p21.3 homolog ist und somit auch *Rassf1a* beinhaltet. Die homozygote Deletion in der Maus ist lethal im embryonal Stadium.

Doch die heterozygoten Mäuse entwickeln sich normal obwohl sie für mehr als 12 Gene haploinsuffizient sind (Smith *et al.*, 2002). Derzeit wird an der Generierung von spezifischen *Rassf1a* „Knock-out“-Mäusen gearbeitet.

Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch epigenetische Inaktivierung ist höchstwahrscheinlich die Hauptursache der somatischen Krebsentstehung. Noch immer sind die dafür verantwortlichen Mechanismen unbekannt. Im malignen Mesotheliom wurde die *RASSF1A* Methylierung mit SV40 Virus Infektion korreliert und in Magenkrebs wurde die Inaktivierung von *RASSF1A* mit der Präsenz des Epstein-Barr Virus assoziiert (Toyooka *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2002). Hingegen wurde ein inverser Zusammenhang zwischen Papillomavirus Infektion und *RASSF1A* Methylierung in Prostata- und Zervixkrebs identifiziert (Kuzmin *et al.*, 2002; Kuzmin *et al.*, 2003 [Anhang 10]). Der molekularen Mechanismen der epigenetischen Inaktivierung während der Kanzerogenese soll entschlüsselt werden und der Zusammenhang zu den viralen Infektionen geklärt werden. Dies könnte zur Entwicklung von neuen Arzneimitteln und Therapien führen, die bei Krebs und anderen transkriptions-bedingten Erkrankungen heilend wirken könnten.

Das *RASSF1A* Gen hat zumindest vier charakteristische Merkmale, die es mit einer Tumorsuppression verbinden könnten:

- 1.) Die Ras Assoziationsdomäne, die *RASSF1A* mit Ras in einer proapoptischen Signaltransduktion verknüpft (Vos *et al.*, 2000; Khokhlatchev *et al.*, 2002; Ortiz-Vega *et al.*, 2002 [Anhang 8]).
- 2.) Die Protein Kinase C1 Domäne, die den sekundären Botenstoff Diacylglycerol und das tumorfördernde Phorbolster binden könnte, deutet eine Mitwirkung in der Karzinogenese an (Kazanietz, 2000).
- 3.) Die putative Phosphorylierungssequenz der ATM Kinase könnte *RASSF1A* mit einem auf DNA Schäden reagierenden Signalübertragungsweg verbinden (Kim *et al.*, 1999).
- 4.) Die Fähigkeit von *RASSF1A* das Zellwachstum zu hemmen (Dammann *et al.*, 2000 [Anhang 1]) und die Cyclin D Akkumulation zu inhibieren (Shivakumar *et al.*, 2002).

Um jedoch den Anteil jeder dieser potentiellen Tumorsuppressions Merkmale in der von *RASSF1A* verminderten Karzinogenese zu klären sind weitere Untersuchungen notwendig.

In der Entstehung von einigen Tumoren schließen sich onkogene K-*Ras* Mutationen und *RASSF1A* Inaktivierung aus und *RASSF1A* könnte ein negativer Effektor von Ras sein. *RASSF1A* Inaktivierung war signifikant häufiger in fortgeschrittenen Tumorstadien und

schlecht differenzierten Tumoren detektiert worden und die epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* korreliert mit einer verschlechterten Prognose und einer beeinträchtigten Überlebensrate von Krebspatienten. Es wird deshalb interessant sein, die Inaktivierung von *RASSF1A* in der Transformation der Normalzelle zum malignen Tumor im Detail in mikrosektionierten Gewebe zu analysieren und damit die Bedeutung von *RASSF1A* im Mehrschrittmodell der Karzinogenese näher zu definieren. Methylierungsanalyse des *RASSF1A* Gens und anderer Tumorsuppressorgene könnte als diagnostischer Marker für die Entstehung und Prognose von Tumoren dienen. Das Verständnis der molekularen Veränderungen und der Funktion von *RASSF1A* könnte zur Identifikation von zukünftigen Zielen für gentherapeutische Versuche genutzt werden und auch zur Entwicklung von neuen Methoden und Medikamenten für die Krebstherapie führen.

## **9. Zusammenfassung**

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen in den Industrieländern. Vor allem bei Lungenkrebs ist die Prognose für die Patienten schlecht. In Lungenkrebs sind genetische Faktoren, die zu einer Prädisposition zu Krebs führen, selten und in chromosomalen Regionen, die häufig in Lungenkarzinome verloren sind, werden Tumorsuppressorgene vermutet. Die in dieser Arbeit zusammengefassten Originalarbeiten befassen sich mit der Identifizierung, Charakterisierung und Funktion eines neuen Ras-Effektor Gens, das als *Ras Assoziations Domänen Familie 1* Gen (*RASSF1*) bezeichnet wird und im chromosomalen Segment 3p21.3 lokalisiert ist. Verlust von 3p21.3 ist einer der ersten und häufigsten Veränderungen in Lungenkrebs und anderen soliden Tumoren und eine wichtige Rolle dieser Region, die für *RASSF1* kodiert, war in der Karzinogenese zu erwarten. Es werden zumindest zwei Isoformen des *RASSF1* Genes, die als *RASSF1A* und *RASSF1C* bezeichnet werden, in normalen Zellen exprimiert. Beide Formen kodieren für eine Ras Assoziationsdomäne, die *RASSF1* mit dem Proto-Onkogen Ras in einem proapoptischen Signalübertragungsweg verbinden. Die *RASSF1A* Form wird von einem CpG Insel Promotor transkribiert und dieser Promotor wird in einer Vielzahl von humanen Tumoren durch Hypermethylierung inaktiviert. Epigenetische Inaktivierung des *RASSF1A* Promotors wurde häufig im primären Gewebe von Lungentumoren, Brustkrebs, Ovarialkarzinom,

Nierenzelltumor, Prostatakrebs, Schilddrüsenkarzinom, Leberkarzinom, Melanom, Pankreaskarzinom und verschiedenener anderer Tumorentitäten nachgewiesen. Die *RASSF1A* Hypermethylierung ist eine der häufigsten Veränderungen in der Pathogenese von Krebs. Folglich könnte die *RASSF1A* Inaktivierung in der Karzinogenese eine zentrale Rolle spielen. Im Zervixkarzinom wurde gezeigt, dass eine umgekehrte Korrelation zwischen der *RASSF1A* Inaktivierung und einer Papillomavirus Infektion besteht. Die Behandlung von Krebszelllinien, die das endogene *RASSF1A* inaktiviert haben mit einem DNA Methyltransferase Inhibitor, führten zu einer Reexpression von *RASSF1A*. In Krebszellen unterdrückte die ektopische Expression von *RASSF1A* das Wachstum der Zellen *in vitro* und *in vivo*. *RASSF1A* wirkt als negativer Effektor von Ras und hemmt die zelluläre Proliferation und kann Apoptose induzieren. Die Inaktivierung von *RASSF1A* und die *K-Ras* Aktivierung schließen sich in der Entwicklung von Pankreaskarzinomen gegenseitig aus. Die häufige epigenetische Inaktivierung des *RASSF1A* Gens in einer Vielzahl von primären humanen Tumorentitäten und die Fähigkeit von *RASSF1A* die Proliferation von Krebszellen zu inhibieren, deuten an, dass *RASSF1A* ein Tumorsuppressorgen aus dem Segment 3p21.3 ist. Die *RASSF1A* Inaktivierung wurde mit verschiedenen Parameter der verschlechterten Prognose und fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert. Methylierungsanalyse von *RASSF1A* könnte sich als nützlicher diagnostischer Krebsmarker und als prognostischer Faktor für Krebspatienten erweisen.

## 10. Literaturverzeichnis

- Agathangelou, A., Honorio, S., Macartney, D.P., Martinez, A., Dallol, A., Rader, J., Fullwood, P., Chauhan, A., Walker, R., Shaw, J.A., Hosoe, S., Lerman, M.I., Minna, J.D., Maher, E.R. and Latif, F. (2001) Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene*, **20**, 1509-1518.
- Antequera, F., Boyes, J. and Bird, A. (1990) High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell*, **62**, 503-514.
- Astuti, D., Agathangelou, A., Honorio, S., Dallol, A., Martinsson, T., Kogner, P., Cummins, C., Neumann, H.P., Voutilainen, R., Dahia, P., Eng, C., Maher, E.R. and Latif, F. (2001) RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours. *Oncogene*, **20**, 7573-7577.
- Bar-Sagi, D. (2001) A Ras by any other name. *Mol Cell Biol*, **21**, 1441-1443.
- Bar-Sagi, D. and Feramisco, J.R. (1985) Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell*, **42**, 841-848.
- Barbacid, M. (1990) ras oncogenes: their role in neoplasia. *Eur J Clin Invest*, **20**, 225-235.
- Baylin, S.B. and Herman, J.G. (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*, **16**, 168-174.
- Baylin, S.B. and Herman, J.G. (2001) Promoter hypermethylation--can this change alone ever designate true tumor suppressor gene function? *J Natl Cancer Inst*, **93**, 664-665.
- Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M. and Issa, J.P. (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*, **72**, 141-196.
- Belinsky, S.A., Palmisano, W.A., Gilliland, F.D., Crooks, L.A., Divine, K.K., Winters, S.A., Grimes, M.J., Harms, H.J., Tellez, C.S., Smith, T.M., Moots, P.P., Lechner, J.F., Stidley, C.A. and Crowell, R.E. (2002) Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res*, **62**, 2370-2377.
- Bird, A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, **321**, 209-213.
- Bos, J.L. (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, **49**, 4682-4689.
- Burbee, D.G., Forgacs, E., Zochbauer-Muller, S., Shivakumar, L., Fong, K., Gao, B., Randle, D., Kondo, M., Virmani, A., Bader, S., Sekido, Y., Latif, F., Milchgrub, S., Toyooka, S., Gazdar, A.F., Lerman, M.I., Zbarovsky, E., White, M. and Minna, J.D. (2001) Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 691-699.
- Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J. and Der, C.J. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, **17**, 1395-1413.

- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed, J.C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, **282**, 1318-1321.
- Chen, C.Y., Liou, J., Forman, L.W. and Faller, D.V. (1998) Differential regulation of discrete apoptotic pathways by Ras. *J Biol Chem*, **273**, 16700-16709.
- Clifford, S.C., Prowse, A.H., Affara, N.A., Buys, C.H. and Maher, E.R. (1998) Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, **22**, 200-209.
- Crespo, P. and Leon, J. (2000) Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 1613-1636.
- Dammann, R., Li, C., Yoon, J.H., Chin, P.L., Bates, S. and Pfeifer, G.P. (2000) Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet*, **25**, 315-319.
- Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Liu, L., Otto, N., Gimm, O., Dralle, H., Boehm, B.O., Pfeifer, G.P. and Hoang-Vu, C. (2003a) Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene*, **22**, 3806-3812.
- Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Strunnikova, M., Rastetter, M., Seidel, C., Liu, L., Tommasi, S. and Pfeifer, G.P. (2003b) Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol. Histopathol.*, **18**, 665-677.
- Dammann, R., Takahashi, T. and Pfeifer, G.P. (2001b) The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene*, **20**, 3563-3567.
- Dammann, R., Yang, G. and Pfeifer, G.P. (2001a) Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res*, **61**, 3105-3109.
- Datta, S.R., Brunet, A. and Greenberg, M.E. (1999) Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev*, **13**, 2905-2927.
- Dietrich, W.F., Radany, E.H., Smith, J.S., Bishop, J.M., Hanahan, D. and Lander, E.S. (1994) Genome-wide search for loss of heterozygosity in transgenic mouse tumors reveals candidate tumor suppressor genes on chromosomes 9 and 16. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9451-9455.
- Downward, J. (1998) Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 49-54.
- Dreijerink, K., Braga, E., Kuzmin, I., Geil, L., Duh, F.M., Angeloni, D., Zbar, B., Lerman, M.I., Stanbridge, E.J., Minna, J.D., Protopopov, A., Li, J., Kashuba, V., Klein, G. and Zbarovsky, E.R. (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**, 7504-7509.
- Fullwood, P., Marchini, S., Rader, J.S., Martinez, A., Macartney, D., Broggin, M., Morelli, C., Barbanti-Brodano, G., Maher, E.R. and Latif, F. (1999) Detailed genetic and physical mapping of tumor suppressor loci on chromosome 3p in ovarian cancer. *Cancer Res*, **59**, 4662-4667.

- Guo, Z., Hu, X., Afink, G., Ponten, F., Wilander, E. and Ponten, J. (2000) Comparison of chromosome 3p deletions between cervical precancers synchronous with and without invasive cancer. *Int J Cancer*, **86**, 518-523.
- Gure, A.O., Altorki, N.K., Stockert, E., Scanlan, M.J., Old, L.J. and Chen, Y.T. (1998) Human lung cancer antigens recognized by autologous antibodies: definition of a novel cDNA derived from the tumor suppressor gene locus on chromosome 3p21.3. *Cancer Res*, **58**, 1034-1041.
- Hung, J., Kishimoto, Y., Sugio, K., Virmani, A., McIntire, D.D., Minna, J.D. and Gazdar, A.F. (1995) Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *Jama*, **273**, 558-563.
- Jackers, P., Minoletti, F., Belotti, D., Clause, N., Sozzi, G., Sobel, M.E. and Castronovo, V. (1996) Isolation from a multigene family of the active human gene of the metastasis-associated multifunctional protein 37LRP/p40 at chromosome 3p21.3. *Oncogene*, **13**, 495-503.
- Jensen, D.E., Proctor, M., Marquis, S.T., Gardner, H.P., Ha, S.I., Chodosh, L.A., Ishov, A.M., Tommerup, N., Vissing, H., Sekido, Y., Minna, J., Borodovsky, A., Schultz, D.C., Wilkinson, K.D., Maul, G.G., Barlev, N., Berger, S.L., Prendergast, G.C. and Rauscher, F.J., 3rd. (1998) BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*, **16**, 1097-1112.
- Ji, L., Nishizaki, M., Gao, B., Burbee, D., Kondo, M., Kamibayashi, C., Xu, K., Yen, N., Atkinson, E.N., Fang, B., Lerman, M.I., Roth, J.A. and Minna, J.D. (2002) Expression of several genes in the human chromosome 3p21.3 homozygous deletion region by an adenovirus vector results in tumor suppressor activities in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **62**, 2715-2720.
- Jones, P.A. and Baylin, S.B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, **3**, 415-428.
- Jones, P.A. and Laird, P.W. (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, **21**, 163-167.
- Jones, P.A. and Taylor, S.M. (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, **20**, 85-93.
- Jones, P.A., Wolkowicz, M.J., Rideout, W.M.r., Gonzales, F.A., Marziasz, C.M., Coetzee, G.A. and Tapscott, S.J. (1990) De novo methylation of the MyoD1 CpG island during the establishment of immortal cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 6117-6121.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A.P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, **19**, 187-191.
- Kaelin, W.G., Jr. and Maher, E.R. (1998) The VHL tumour-suppressor gene paradigm. *Trends Genet*, **14**, 423-426.
- Kang, G.H., Lee, S., Kim, W.H., Lee, H.W., Kim, J.C., Rhyu, M.G. and Ro, J.Y. (2002) Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma. *Am J Pathol*, **160**, 787-794.
- Katz, M.E. and McCormick, F. (1997) Signal transduction from multiple Ras effectors. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 75-79.

- Kazanietz, M.G. (2000) Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Mol Carcinog*, **28**, 5-11.
- Khokhlatchev, A., Rabizadeh, S., Xavier, R., Nedwidek, M., Chen, T., Zhang, X.F., Seed, B. and Avruch, J. (2002) Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Curr Biol*, **12**, 253-265.
- Khosravi-Far, R., Campbell, S., Rossman, K.L. and Der, C.J. (1998) Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv Cancer Res*, **72**, 57-107.
- Killary, A.M., Wolf, M.E., Giambernardi, T.A. and Naylor, S.L. (1992) Definition of a tumor suppressor locus within human chromosome 3p21-p22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10877-10881.
- Kim, S.T., Lim, D.S., Canman, C.E. and Kastan, M.B. (1999) Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem*, **274**, 37538-37543.
- Knudson, A.G., Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 820-823.
- Kok, K., Draaijers, T.G., Mosselaar, A., de Jong, D. and Buys, C.H. (2000) Inclusion of new microsatellite repeats in allelic loss analysis excludes retention of heterozygosity in the renal cell carcinoma critical region in 3p21. *Cancer Genet Cytogenet*, **116**, 40-43.
- Kok, K., Naylor, S.L. and Buys, C.H. (1997) Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv Cancer Res*, **71**, 27-92.
- Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, **351 Pt 2**, 289-305.
- Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L. and Burgering, B.M. (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*, **398**, 630-634.
- Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res*, **59**, 1693s-1700s.
- Kuzmin, I., Gillespie, J.W., Protopopov, A., Geil, L., Dreijerink, K., Yang, Y., Vocke, C.D., Duh, F.M., Zbarovsky, E., Minna, J.D., Rhim, J.S., Emmert-Buck, M.R., Linehan, W.M. and Lerman, M.I. (2002) The RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells. *Cancer Res*, **62**, 3498-3502.
- Kuzmin, I., Liu, L., Dammann, R., Geil, L., Stanbridge, E.J., Wilczynski, S.P., Lerman, M.I. and Pfeifer, G.P. (2003) Inactivation of RAS association domain family 1A gene in cervical carcinomas and the role of human papillomavirus infection. *Cancer Res*, **63**, 1888-1893.
- Latif, F., Duh, F.M., Bader, S., Sekido, Y., Li, H., Geil, L., Zbar, B., Minna, J.D. and Lerman, M.I. (1997) The human homolog of the rodent immediate early response genes, PC4 and TIS7, resides in the lung cancer tumor suppressor gene region on chromosome 3p21. *Hum Genet*, **99**, 334-341.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F.M., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., Schmidt, L., Zhou, F., Li, H., Wei, M.H., Glenn, G., Richards, F.M., Crossey, P.A., Ferguson-Smith, M.A., Le Paslier, D., Chumakov, I., Cohen, D., Chinault, C.A., Maher, E.R., Linehan, W.M., Zbar, B. and Lerman, M.I. (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, **260**, 1317-1320.

- Leevers, S.J. and Marshall, C.J. (1992) Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein. *Embo J*, **11**, 569-574.
- Lehmann, U., Langer, F., Feist, H., Glockner, S., Hasemeier, B. and Kreipe, H. (2002) Quantitative assessment of promoter hypermethylation during breast cancer development. *Am J Pathol*, **160**, 605-612.
- Lerman, M.I. and Minna, J.D. (2000) The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res*, **60**, 6116-6133.
- Liu, L., Yoon, J.H., Dammann, R. and Pfeifer, G.P. (2002) Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. *Oncogene*, **21**, 6835-6840.
- Lo, K.W., Kwong, J., Hui, A.B., Chan, S.Y., To, K.F., Chan, A.S., Chow, L.S., Teo, P.M., Johnson, P.J. and Huang, D.P. (2001) High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, **61**, 3877-3881.
- Marshall, C. (1999) How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 732-736.
- Martinez, A., Fullwood, P., Kondo, K., Kishida, T., Yao, M., Maher, E.R. and Latif, F. (2000) Role of chromosome 3p12-p21 tumour suppressor genes in clear cell renal cell carcinoma: analysis of VHL dependent and VHL independent pathways of tumorigenesis. *Mol Pathol*, **53**, 137-144.
- Maruyama, R., Toyooka, S., Toyooka, K.O., Virmani, A.K., Zochbauer-Muller, S., Farinas, A.J., Minna, J.D., McConnell, J., Frenkel, E.P. and Gazdar, A.F. (2002) Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res*, **8**, 514-519.
- Mayo, M.W., Wang, C.Y., Cogswell, P.C., Rogers-Graham, K.S., Lowe, S.W., Der, C.J. and Baldwin, A.S., Jr. (1997) Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science*, **278**, 1812-1815.
- Mitsudomi, T., Viallet, J., Mulshine, J.L., Linnoila, R.I., Minna, J.D. and Gazdar, A.F. (1991) Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene*, **6**, 1353-1362.
- Morrissey, C., Martinez, A., Zatyka, M., Agathangelou, A., Honorio, S., Astuti, D., Morgan, N.V., Moch, H., Richards, F.M., Kishida, T., Yao, M., Schraml, P., Latif, F. and Maher, E.R. (2001) Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res*, **61**, 7277-7281.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. and Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386-389.
- Newton, A.C. (1995) Protein kinase C. Seeing two domains. *Curr Biol*, **5**, 973-976.

- Ortiz-Vega, S., Khokhlatchev, A., Nedwidek, M., Zhang, X.F., Dammann, R., Pfeifer, G.P. and Avruch, J. (2002) The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene*, **21**, 1381-1390.
- Pfeifer, G.P., Yoon, J.H., Liu, L., Tommasi, S., Wilczynski, S.P. and Dammann, R. (2002) Methylation of the RASSF1A gene in human cancers. *Biol Chem*, **383**, 907-914.
- Ponting, C.P. and Benjamin, D.R. (1996) A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci*, **21**, 422-425.
- Reuther, G.W. and Der, C.J. (2000) The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 157-165.
- Romashkova, J.A. and Makarov, S.S. (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, **401**, 86-90.
- Schagdarsurengin, U., Gimm, O., Hoang-Vu, C., Dralle, H., Pfeifer, G.P. and Dammann, R. (2002) Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma. *Cancer Res*, **62**, 3698-3701.
- Schagdarsurengin, U., Wilkens, L., Steinemann, D., Flemming, P., Kreipe, H.H., Pfeifer, G.P., Schlegelberger, B. and Dammann, R. (2003) Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, **22**, 1866-1871.
- Sekido, Y., Ahmadian, M., Wistuba, II, Latif, F., Bader, S., Wei, M.H., Duh, F.M., Gazdar, A.F., Lerman, M.I. and Minna, J.D. (1998) Cloning of a breast cancer homozygous deletion junction narrows the region of search for a 3p21.3 tumor suppressor gene. *Oncogene*, **16**, 3151-3157.
- Sekido, Y., Bader, S., Latif, F., Chen, J.Y., Duh, F.M., Wei, M.H., Albanesi, J.P., Lee, C.C., Lerman, M.I. and Minna, J.D. (1996) Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4120-4125.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. and Lowe, S.W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, **88**, 593-602.
- Shao, J., Sheng, H., DuBois, R.N. and Beauchamp, R.D. (2000) Oncogenic Ras-mediated cell growth arrest and apoptosis are associated with increased ubiquitin-dependent cyclin D1 degradation. *J Biol Chem*, **275**, 22916-22924.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, **20**, 2390-2400.
- Shivakumar, L., Minna, J., Sakamaki, T., Pestell, R. and White, M.A. (2002) The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol*, **22**, 4309-4318.
- Smiraglia, D.J., Rush, L.J., Fruhwald, M.C., Dai, Z., Held, W.A., Costello, J.F., Lang, J.C., Eng, C., Li, B., Wright, F.A., Caligiuri, M.A. and Plass, C. (2001) Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet*, **10**, 1413-1419.
- Smith, A.J., Xian, J., Richardson, M., Johnstone, K.A. and Rabbitts, P.H. (2002) Cre-loxP chromosome engineering of a targeted deletion in the mouse corresponding to the 3p21.3 region of homozygous loss in human tumours. *Oncogene*, **21**, 4521-4529.

- Sozzi, G., Veronese, M.L., Negrini, M., Baffa, R., Cotticelli, M.G., Inoue, H., Tornielli, S., Pilotti, S., De Gregorio, L., Pastorino, U., Pierotti, M.A., Ohta, M., Huebner, K. and Croce, C.M. (1996) The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*, **85**, 17-26.
- Spugnardi, M., Tommasi, S., Dammann, R., Pfeifer, G.P. and Hoon, D.S. (2003) Epigenetic inactivation of RAS association domain family protein 1 (RASSF1A) in malignant cutaneous melanoma. *Cancer Res*, **63**, 1639-1643.
- Sundaresan, V., Ganly, P., Hasleton, P., Rudd, R., Sinha, G., Bleehen, N.M. and Rabbitts, P. (1992) p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene*, **7**, 1989-1997.
- Thiberville, L., Payne, P., Vielkinds, J., LeRiche, J., Horsman, D., Nouvet, G., Palcic, B. and Lam, S. (1995) Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus. *Cancer Res*, **55**, 5133-5139.
- Todd, S., Franklin, W.A., Varella-Garcia, M., Kennedy, T., Hilliker, C.E., Jr., Hahner, L., Anderson, M., Wiest, J.S., Drabkin, H.A. and Gemmill, R.M. (1997) Homozygous deletions of human chromosome 3p in lung tumors. *Cancer Res*, **57**, 1344-1352.
- Tomizawa, Y., Kohno, T., Kondo, H., Otsuka, A., Nishioka, M., Niki, T., Yamada, T., Maeshima, A., Yoshimura, K., Saito, R., Minna, J.D. and Yokota, J. (2002) Clinicopathological significance of epigenetic inactivation of RASSF1A at 3p21.3 in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, **8**, 2362-2368.
- Tommasi, S., Dammann, R., Jin, S.G., Zhang Xf, X.F., Avruch, J. and Pfeifer, G.P. (2002) RASSF3 and NORE1: identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1. *Oncogene*, **21**, 2713-2720.
- Toyooka, S., Pass, H.I., Shivapurkar, N., Fukuyama, Y., Maruyama, R., Toyooka, K.O., Gilcrease, M., Farinas, A., Minna, J.D. and Gazdar, A.F. (2001) Aberrant methylation and simian virus 40 tag sequences in malignant mesothelioma. *Cancer Res*, **61**, 5727-5730.
- van den Berg, A. and Buys, C.H. (1997) Involvement of multiple loci on chromosome 3 in renal cell cancer development. *Genes Chromosomes Cancer*, **19**, 59-76.
- van den Berg, A., Hulsbeek, M.F., de Jong, D., Kok, K., Veldhuis, P.M., Roche, J. and Buys, C.H. (1996) Major role for a 3p21 region and lack of involvement of the t(3;8) breakpoint region in the development of renal cell carcinoma suggested by loss of heterozygosity analysis. *Genes Chromosomes Cancer*, **15**, 64-72.
- van Engeland, M., Roemen, G.M., Brink, M., Pachen, M.M., Weijnenberg, M.P., de Bruine, A.P., Arends, J.W., van den Brandt, P.A., de Goeij, A.F. and Herman, J.G. (2002) K-ras mutations and RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer. *Oncogene*, **21**, 3792-3795.
- Vavvas, D., Li, X., Avruch, J. and Zhang, X.F. (1998) Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J Biol Chem*, **273**, 5439-5442.
- Vos, M.D., Ellis, C.A., Bell, A., Birrer, M.J. and Clark, G.J. (2000) Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *J Biol Chem*, **275**, 35669-35672.

- Wagner, S.N., Muller, R., Boehm, J., Putz, B., Wunsch, P.H. and Hofler, H. (1993) Neuroendocrine neoplasms of the lung are not associated with point mutations at codon 12 of the Ki-ras gene. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, **63**, 325-329.
- Wei, M.H., Latif, F., Bader, S., Kashuba, V., Chen, J.Y., Duh, F.M., Sekido, Y., Lee, C.C., Geil, L., Kuzmin, I., Zbarovsky, E., Klein, G., Zbar, B., Minna, J.D. and Lerman, M.I. (1996) Construction of a 600-kilobase cosmid clone contig and generation of a transcriptional map surrounding the lung cancer tumor suppressor gene (TSG) locus on human chromosome 3p21.3: progress toward the isolation of a lung cancer TSG. *Cancer Res*, **56**, 1487-1492.
- Wistuba, II, Behrens, C., Milchgrub, S., Bryant, D., Hung, J., Minna, J.D. and Gazdar, A.F. (1999) Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene*, **18**, 643-650.
- Wistuba, II, Montellano, F.D., Milchgrub, S., Virmani, A.K., Behrens, C., Chen, H., Ahmadian, M., Nowak, J.A., Muller, C., Minna, J.D. and Gazdar, A.F. (1997) Deletions of chromosome 3p are frequent and early events in the pathogenesis of uterine cervical carcinoma. *Cancer Res*, **57**, 3154-3158.
- Wolthuis, R.M. and Bos, J.L. (1999) Ras caught in another affair: the exchange factors for Ras. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 112-117.
- Xian, J., Clark, K.J., Fordham, R., Pannell, R., Rabbitts, T.H. and Rabbitts, P.H. (2001) Inadequate lung development and bronchial hyperplasia in mice with a targeted deletion in the Dutt1/Robo1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15062-15066.
- Xiang, R.H., Hensel, C.H., Garcia, D.K., Carlson, H.C., Kok, K., Daly, M.C., Kerbacher, K., van den Berg, A., Veldhuis, P., Buys, C.H. and Naylor, S.L. (1996) Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer. *Genomics*, **32**, 39-48.
- Yamakawa, K., Takahashi, T., Horio, Y., Murata, Y., Takahashi, E., Hibi, K., Yokoyama, S., Ueda, R. and Nakamura, Y. (1993) Frequent homozygous deletions in lung cancer cell lines detected by a DNA marker located at 3p21.3-p22. *Oncogene*, **8**, 327-330.
- Yamamoto, T., Taya, S. and Kaibuchi, K. (1999) Ras-induced transformation and signaling pathway. *J Biochem (Tokyo)*, **126**, 799-803.
- Yoon, J.H., Dammann, R. and Pfeifer, G.P. (2001) Hypermethylation of the CpG island of the RASSF1A gene in ovarian and renal cell carcinomas. *Int J Cancer*, **94**, 212-217.
- zur Hausen, H. (1989) Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res*, **49**, 4677-4681.

## Anhang

## Der Habilitation zugrunde liegende Originalarbeiten<sup>2</sup>:

[Anhang 1] **Dammann R**, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25: 315-319.

[Anhang 2] **Dammann R**, Yang G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res* 2001; 61: 3105-3109.

[Anhang 3] **Dammann R**, Takahashi T, Pfeifer GP. The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene* 2001; 20: 3563-3567.

[Anhang 4] Yoon JH, **Dammann R**, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of the RASSF1A gene in ovarian and renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 94: 212-217.

[Anhang 5] Tommasi S, **Dammann R**, Jin SG, Zhang XF, Avruch J, Pfeifer GP. RASSF3 and NORE1: identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1. *Oncogene* 2002; 21: 2713-2720.

[Anhang 6] Schagdarsurengin U, Gimm O, Hoang-Vu C, Dralle H, Pfeifer GP, **Dammann R**. Frequent epigenetic silencing of the CpG island promotor of RASSF1A in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 3698-3701.

[Anhang 7] Liu L, Yoon JH, **Dammann R**, Pfeifer GP. Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. *Oncogene* 2002; 21: 6835-6840.

[Anhang 8] Ortiz-Vega S, Khokhlatchev A, Nedwidek M, Zhang XF, **Dammann R**, Pfeifer GP, Avruch J. The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene* 2002; 21: 1381-1390.

---

<sup>2</sup> Aus urheberrechtlichen Gründen sind die Arbeiten in der Online-Version der Habilitationsschrift nicht enthalten.

[**Anhang 9**] Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann D, Flemming P, Kreipe HH, Pfeifer GP, Schlegelberger B, **Dammann R**. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 1866-1871.

[**Anhang 10**] Kuzmin I, Liu L, **Dammann R**, Geil L, Stanbridge EJ, Wilczynski SP, Lerman MI, Pfeifer GP. Inactivation of RAS association domain family 1A gene in cervical carcinomas and the role of human papillomavirus infection. *Cancer Res* 2003; 63: 1888-1893.

[**Anhang 11**] Spugnardi M, Tommasi S, **Dammann R**, Pfeifer GP, Hoon DS. Epigenetic inactivation of Ras association domain family protein 1 (RASSF1A) in malignant cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1639-1643.

[**Anhang 12**] **Dammann R**, Schagdarsurengin U, Limin L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 3806-3812.

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Habilitationsschrift beigetragen haben.

Bei Herrn Gerd Pfeifer, dem Direktor der Abteilung für Biologie des City of Hope Medical Center und seinen Mitarbeitern, Stella Tommasi und Steven Bates möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof Dr. I. Hansmann, dem Direktor des Institutes für Humangenetik und Medizinischen Biologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, danke ich für die Unterstützung.

Mein besonderer Dank gebührt dem Dekan Herrn Prof. B. Fischer, Herrn Prof. Dr. B. Osten, Herrn Prof. Dr. W. Fleig und Herrn Prof. Dr. T. Braun, den Mitgliedern der Steuergruppe NBL3 der Medizinischen Fakultät der MLU Halle-Wittenberg.

Dem Dekan Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß und dem FB Biochemie/Biotechnologie danke ich für die bereitwillige Unterstützung des Habilitationsverfahrens.

Ich möchte mich bei den Mitarbeiter meiner Arbeitsgruppe Tumorgenetik Undraga Schagdarsurengin, Claudia Seidel, Maria Strunnikova, Christel Trümpler und Matthias Rastetter für ihre engagierte Arbeit und das gute Arbeitsklima bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Katrin Dammann für ihre Unterstützung und meinen Eltern Erich und Madeleine Dammann.

Die Untersuchungen wurden mit der dankenswerteren Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (FKZ: 01ZZ0104) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DA 552/1) durchgeführt

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: **Dr. Reinhard Heinrich Dammann**  
Geburtsdatum,-ort: 23.04.1965, Zürich/CH  
Familie: verheiratet mit Katrin Dammann, 2 Kinder: Alexander und Helena  
Nationalität: Franzose und Schweizer

### **Ausbildung:**

1971 - 1975: Grundschule in Hohentengen am Hochrhein, Deutschland  
1975 - 1985: Hochrhein-Gymnasium in Waldshut, Deutschland  
Allgemeine Hochschulreife (Note 1,5)  
1985 - 1991: Studium der Naturwissenschaften (Abteilung XA/Biologie) an der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH), Zürich  
Diplomfächer: Genetik, Immunbiologie, Mikrobiologie, Zellbiologie und Zytologie; Diplomarbeit: ‚Chromatin Struktur von ribosomalen Genen in Hefe‘  
Diplom als Naturwissenschaftler (Biologische und chemisch-biologische Richtung) am 6. Juni 1991 (Note 1.3)  
1992 – 04/1995: Promotion am Institut für Zellbiologie ETH, Zürich:  
‚Chromatin structures and transcription of rDNA in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*‘, Prüfung am April 5, 1995. Titel: Dr. sc. nat.

### **Wissenschaftliche Tätigkeit:**

04/95 – 08/95: Postdoktorand am Institut für Zellbiologie ETH, Zürich.  
09/95 – 03/00: Postdoktorand am Department of Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope Medical Center, Duarte, Kalifornien, USA.  
Forschung über DNA Reparatur, Mutagenese, DNA Replikation, DNA Methylierung, DNA Footprinting, Protein Interaktionen  
04/00 – 04/01: Senior Research Fellow am Department of Biology, Duarte, Kalifornien.  
Seit Mai 2001: Leiter der unabhängigen Nachwuchsgruppe Tumorgenetik der Medizinischen Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden. Die Arbeit wurde bislang an keiner anderen Einrichtung vorgelegt.

Ein Habilitationsverfahren wurde bislang an einer anderen Universität weder eröffnet noch beantragt. Frühere Habilitationsverfahren wurden bislang an der Martin-Luther-Universität meinerseits nicht unternommen.

Halle (Saale), den 18.08.2003

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Dammann', is centered on a light gray rectangular background.

Reinhard Dammann