# „Zielgene der RAS-Onkoprotein-abhängigen Signaltransduktion: Identifizierung und Charakterisierung von Klasse II Tumor-Suppressorgenen“

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Medizinische Molekularbiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dr. Christine Sers

geboren am 5.10. 1962 in München

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht am: 7.1.2003

Tag der letzten Prüfung: 26.6.2003

Gutachter: 1. Prof. Bartram

2.Prof. Höfler

**INHALTSVERZEICHNIS**

**1. Einleitung ..... 1**

**2. Transformationsmodelle zur Identifizierung RAS-abhängig regulierter Gene ..... 6**

2.1. Immortale, konstitutiv mit *HRAS* (V12)-transformierte Ratten Fibroblasten ..... 6

2.2. Immortale Fibroblasten mit induzierbarem *HRAS* (V12) ..... 7

2.3. Immortale, konstitutiv mit *KRAS* (V12)-transformierte Ratten Ovarial Epithelzellen . 8

*2.3.1. Identifizierung von RAS-RAF-MEK -und PI-3 Kinase-abhängigen Regulations-Modulen ..... 9*

*2.3.2. Promoter Analysen RAS-regulierter Gene ..... 11*

**3. Identifizierung differentiell exprimierter Gene in humanen Ovarialkarzinomen mittels Hybridisierung von cDNA-Arrays ..... 12**

**4. Funktionelle Charakterisierung von Klasse II Tumor-Suppressorgenen ..... 15**

4.1. Caveolin-1 (CAV1) ..... 15

4.2. Identifizierung und Charakterisierung einer neuen RAS-Suppressor Genfamilie ..... 17

*4.2.1. H-REV107-1 ..... 17*

*4.2.2. H-REV107-2 ..... 25*

**5. Zusammenfassung und Ausblick ..... 27**

**6. Literaturverzeichnis ..... 29**

**7. Glossar ..... 38**

**8. Veröffentlichungen ..... 43**

**9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG ..... 47**

Zusammenfassung

**RAS-Onkogene, Signalübertragung, Genexpressionsprofil, Klasse II Tumorsuppressor Gen, Caveolin-1, H-REV107-1**

Die Entstehung und Progression maligner Tumoren ist ein mehrstufiger Prozeß, der auf einer Vielzahl genetischer Alterationen beruht. Essentielle Schritte sind die Aktivierung von Proto-Onkogenen und die Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen. Infolge dessen können die Zellen unabhängig von externen Wachstumssignalen ungebremst proliferieren, die Apoptose wird gehemmt, die Angiogenese wird aktiviert, und es kommt schließlich zur Metastasierung. Zu den bekanntesten Proto-Onkogenen, die in humanen Tumoren aktiviert werden, gehören die *RAS* Gene. Sie sind in einer Vielzahl von Tumoren mutiert und führen zu einer Stimulation der Proliferation.

Um den Einfluß aktivierter *RAS* Onkogene auf die Regulation der Genexpression zu untersuchen wurden Genexpressionsprofile in Zellkultur-Modellen und humanen Tumoren erstellt. In einem Fibroblasten- und einem Epithelzell-basierten System konnten mehrere hundert, RAS-abhängig differenziell exprimierte Genen identifiziert werden. Aufgrund der bekannten Funktionen ihrer Genprodukte spielen sie eine wichtige Rolle im Verlust der Zellzyklus-Kontrolle, der Kontrolle der Signalübertragung, in der Angiogenese-Induktion sowie in der Invasion und damit Metastasierung. Die Zusammenhänge zwischen der Aktivierung bestimmter Signalkaskaden wie z.B. Raf-Mek-Erk oder PI-3K und der Expression von definierten Genmustern wurden hergestellt. Weiterhin konnte mit Hilfe von Microarray Analysen eine Vielzahl potentieller Tumormarker und Zielgene für therapeutische Intervention im Ovarialkarzinom identifiziert werden. Die Rolle der KlasseII Tumorsuppressor Gene Caveolin-1 und H-REV107-1 in humanen Ovarialkarzinomen wurde detailliert untersucht und ihre Rolle in der Regulation des Zellüberlebens nachgewiesen. Caveolin-1, ein negativer Regulator der RAS-abhängigen Signalübertragung, wird in über 80% der untersuchten humanen Ovarialkarzinome gehemmt. Hierbei spielen epigenetische Mechanismen eine Rolle, die jedoch nicht Caveolin-1 selbst, sondern einen unbekannten Regulator des Caveolin-1 Gens betreffen.

Das H-REV107-1 Gen, ein Wachstumsregulator mit unbekannter Funktion wird in ca. 50% der untersuchten Ovarialkarzinome nicht mehr exprimiert. Ähnlich wie bei Caveolin-1, führt eine gezielte Expression des Gens in Tumorzellen zur Apoptose. Die Suche nach Interaktionspartnern des H-REV107-1 Gens führte zur Identifizierung der ubiquitär

exprimierten Phosphatase2A (PP2A). Die Bindung zwischen H-REV107-1 und PP2A wurde weiter charakterisiert und ihre Rolle in der H-REV107-1 vermittelten Apoptose analysiert.

Summary

**RAS-oncogene, Signaltransduction, Genexpressionprofile, class II tumorsuppressor gen, Caveolin-1, H-REV107-1.**

Development and progression of human tumours is a multistep process depending on numerous genetic alterations. Essentiell steps herein are the mutational activation of oncogenes and the inactivation of tumour suppressor genes. As a result of these alterations, the cells acquire the potential of unlimited growth independent of external growth factor signals, apoptosis is diminished, angiogenesis is stimulated and finally metastasis can occur. Among the best known proto-oncogenes, mutated in a number of human tumours, are the RAS genes.

To investigate the role of RAS oncogenes in transformation-related transcriptional alterations, expressionsprofiling was performed from cell culture models and human tumours. Several hundred genes were identified to be de-regulated in a RAS-dependent manner in a fibroblast and an epithelial cell-based model. The protein products encoded by these genes play important roles in the loss of cell cycle control, control of signal transduction, angiogenesis induction as well as invasion and metastasis. Groups of de-regulated genes could be assigned to distinct signaling pathways such as the Raf-Mek-Erk or the PI-3 kinase dependent pathways. In addition, a number of potential tumour markers and potential target structures for therapeutic intervention were identified in ovarian carcinomas with the help of microarray studies. The role of the class II tumor suppressor genes Caveolin-1 and H-REV107-1 in human ovarian carcinomas was further investigated and their role in the regulation of cell survival was demonstrated. Caveolin-1, a negative regulator of RAS-dependent signal transduction, is supressed in more than 80% of the ovarian carcinomas analysed. This suppression is mediated by epigenetic mechanisms which due not target Caveolin-1 itself but an unknown regulator of the Caveolin-1 gene.

The H-Rev107-1 gene, a growth regulator with unknown function, is no longer expressed in nearly 50% of the ovarian carcinomas analysed. Similar to Caveolin-1, also re-expression of H-REV107-1 results in apoptosis in the tumour cells. The search for proteins interacting with H-REV107-1 led to the identification of the ubiquitously expressed phosphatase 2A (PP2A). The interaction between H-REV107-1 and PP2A was further characterised and its role in the H-REV107-1 mediated apoptosis investigated.

# 1. Einleitung

Die Entstehung und Progression maligner Tumoren ist ein mehrstufiger Prozeß, der auf einer Vielzahl genetischer Alterationen beruht. Als essentielle Schritte wurden die Aktivierung von Proto-Onkogenen und die Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen erkannt. Infolge dessen können die Zellen unabhängig von externen Wachstumssignalen ungebremst proliferieren, die Apoptose wird gehemmt, die Angiogenese wird aktiviert, und es kommt schließlich zur Metastasierung (1, 2). Zu den bekanntesten Proto-Onkogenen, die in humanen Tumoren aktiviert werden, gehören die *RAS* und *MYC* Gene. Sie sind in einer Vielzahl von Tumoren mutiert oder amplifiziert (3, 4). Die Produkte beider Gene stimulieren direkt oder indirekt die Proliferation (5).

Zu den wichtigsten Tumor-Suppressorgenen, deren Inaktivierung in zahlreichen menschlichen Tumoren nachgewiesen wurde, zählen die Gene für den Transkriptionsregulator *p53*, die Zellzyklusproteine *RB* und *p16* sowie für den Signalketten-Inhibitor *PTEN* (6-9). In normalen Zellen spielen ihre Genprodukte eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Genomstabilität sowie in der Kontrolle der intrazellulären Signalübertragung und des Zellzyklus. In Tumoren werden aufgrund von Deletionen oder Mutationen in den kodierenden Regionen dieser Tumor-Suppressorgene keine funktionsfähigen Proteine mehr gebildet. Diese klassischen Mechanismen der Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen können auch den Expressionsverlust weiterer, potentiell wachstumshemmender Gene nach sich ziehen. Genen, die in Tumoren zwar als Wildtyp-Sequenzen vorliegen, aber nicht mehr exprimiert werden können, hat Ruth Sager erstmals eine Funktion als Tumor-Suppressoren zugeschrieben (10, 11).

Inzwischen werden zwei verschiedene Wege unterschieden über die während der Tumorentwicklung Expressionsänderungen erzeugt werden. Sie können sowohl Tumor-Suppressorgene, als auch Proto-Onkogene betreffen:

***a.*** Irreversible Veränderung einer Gensequenz: Durch Mutationen oder Deletionen wird die Expression eines Tumor-Suppressorgens gestört (z.B. *P53*). Gleiches gilt für die Gen-Amplifikationen oder Punktmutationen von Proto-Onkogenen, die hierdurch verstärkt exprimiert werden (z.B. *HER2*) oder für permanent aktivierte Proteine kodieren (z.B *RAS*). Solche Gene werden als Klasse I Gene bezeichnet.

***b.*** Reversible Expressionsveränderungen ohne Defekt in der Gensequenz. Solchermaßen supprimierte Gene werden als Klasse II Tumor-Suppressoren bezeichnet. Verantwortlich für

die Expressionsveränderung sind neben epigenetischen Mechanismen auch Defekte in übergeordneten Klasse I Genen. Zwei bekannte Beispiele hierfür sind die p53-Zielgene für Thrombospondin-1, ein Angiogenese-Inhibitor (12, 13), oder die Serin-Protease Maspin, deren Expressionsverlust in Mamma-Karzinomen mit der Metastasierung korreliert (14). Dieses Konzept beinhaltet auch die Möglichkeit, daß Klasse II Gene während der Tumorprogression durch Mutationen inaktiviert und damit zu Klasse I Genen werden und birgt ein hohes Maß an Flexibilität bezüglich der Genexpression in sich.

Eine der bekanntesten Gen-Familien, die Klasse I Gene repräsentieren schliesst die *RAS* Proto-Onkogene ein. Mutationen in den *RAS* Genen führen zu konstitutiv aktivierten RAS Protein-Isoformen. Die Gene *HRAS*, *KRAS* und *NRAS* kodieren für Membran-assozierte, kleine GDP/GTP-bindende Proteine. In normalen, ruhenden Zellen liegen über 99% dieser Proteine im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand vor (15). Bindet ein Wachstumsfaktor (z.B. EGF, PDGF) an seinen Rezeptor, kommt es am intrazellulären Teil des Rezeptors zur Aktivierung verschiedener Adapter- und GDP/GTP-Austausch Proteine (Shc, Grb2, SOS). Der Austausch des RAS-gebundenen GDP zu GTP aktiviert RAS. Eine schwache endogene GTPase sowie spezielle Aktivatoren dieser GTPase schalten das aktivierte RAS Molekül normalerweise rasch wieder ab. Die RAS Aktivierung hat im weiteren die Stimulation einer ganzen Anzahl von Effektorproteinen zur Folge, von denen die bekanntesten die Serin/Threonin Kinase RAF, RalGDS und die PI-3 Kinase darstellen (16). Über diese Proteine werden zytoplasmatische Phosphorylierungskasdaden gesteuert, die eine Modulation der Translation (17, 18), eine direkte Veränderung des Zytoskelettes (19, 20) und vor allem gravierende Veränderungen der Genexpression auslösen. (Abbildung.1)
Bereits 1989 wurde von Johannes L. Bos in einer umfassenden Studie nachgewiesen, daß in etwa 30% aller humanen Tumoren Mutationen in einem der *RAS*-Gene auftreten. Hinsichtlich der Frequenz und der Isoform der mutierten *RAS*-Gene gibt es zwischen den Tumortypen allerdings große Unterschiede (3). Pankreaskarzinome weisen mit über 90% die höchsten Mutationsraten im *KRAS*-Gen auf, ca. 50% der Kolonkarzinome haben *KRAS*-Mutationen, während bei Mamma– oder Prostatakarzinomen kaum Mutationen nachgewiesen werden konnten. Die häufigsten Mutationen führen zu einem Austausch der Aminosäuren 12, 13, 59

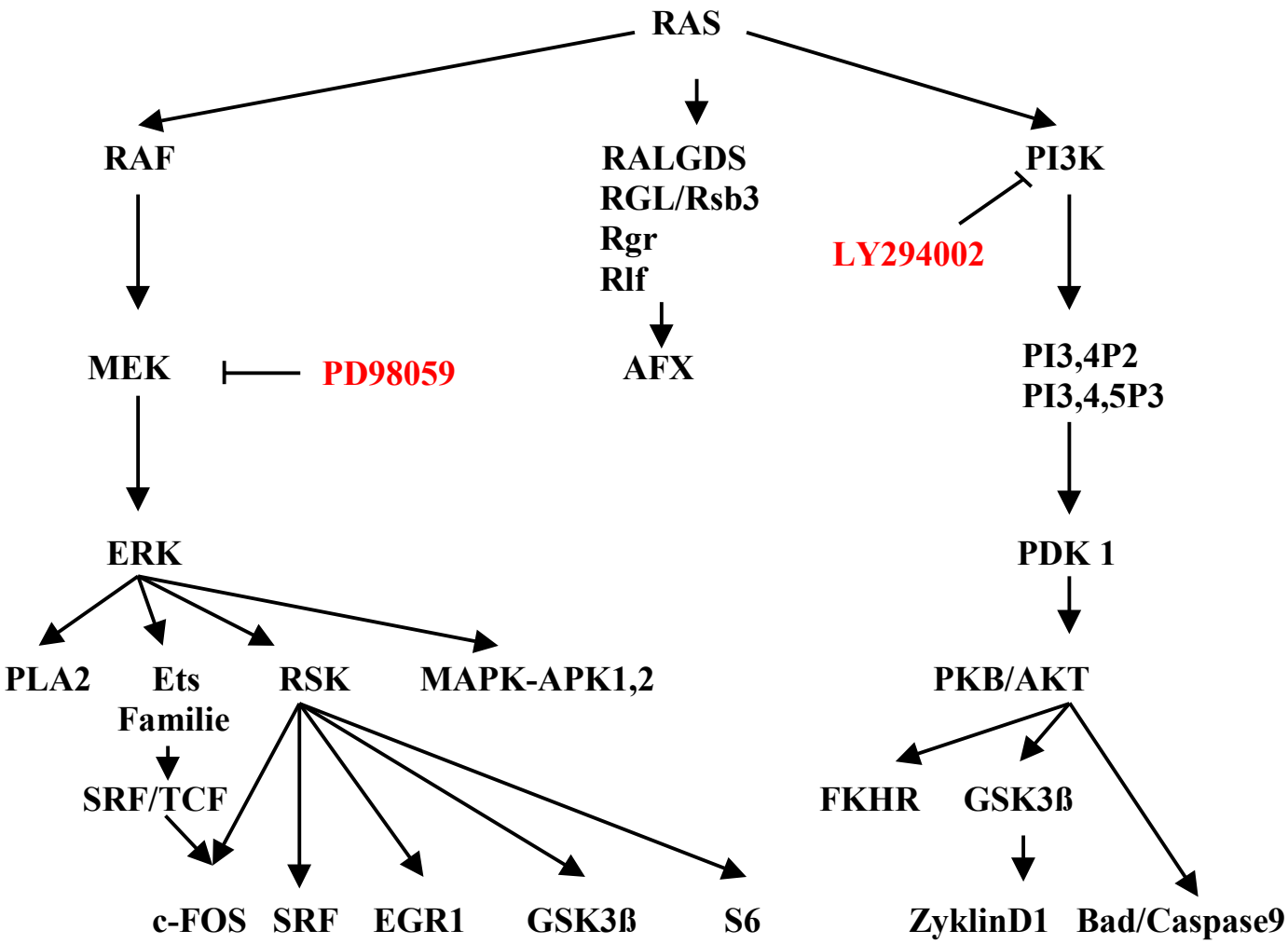


Abbildung 1. Effektoren der RAS Signalübertragung.

oder 61 und hemmen die Sensitivität des aktivierten RAS-Proteins gegenüber GTPase-stimulierenden Proteinen. Damit kann das mutierte RAS-Protein, einmal aktiviert, nicht mehr deaktiviert werden und stimuliert so permanent die verschiedenen intrazellulären Kinasekaskaden, unabhängig von externen Signalen. Die direkte Konsequenz einer RAS-Mutation in humanen Tumoren ist bis heute nicht hinreichend geklärt, obwohl zahlreiche experimentelle Ansätze mit transgenen Mäusen und durch Kanzerogene erzeugte Tumoren eine kausale Rolle nahe legen. Neuere Funktionsstudien in Zellkultur deuten jedoch auf eine entscheidende Rolle des *RAS* Onkogens in der Transformation normaler humaner Zellen hin (21).

Die Aufklärung und detaillierte Analyse der RAS-abhängigen Signalwege zeigte außerdem, daß insbesondere die PI-3-Kinase und RAF/MEK-Wege in Tumorzellen große Bedeutung

haben (22). Ihre Aktivierung kommt in humanen Tumoren nicht nur als Folge eines mutiertes RAS Proteins vor, sondern kann ebenso die Folge von Rezeptor-Amplifikation und Inaktivierung von Tumor-Suppressoren sein (2, 8, 22, 23). Die permanente Stimulation der zytoplasmatischen Signalkaskaden ist mit der Aktivierung bestimmter kritischer Zielgene verbunden. Dazu gehört z.B. das Gen für Zyklin D1, das für einen der wichtigsten Zellzyklus Regulatoren kodiert, aber auch Gene für Matrix Metalloproteasen, deren Bedeutung in Invasion und Metastasierung seit langem bekannt ist (24, 25).

Die Aktivierung der Gen-Expression durch RAS-abhängige Signalkaskaden ist gut untersucht, und viele der beteiligten Transkriptionsfaktoren sind bekannt. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Mitglieder der AP-1 Familie, Fos und Jun Proteine, das SRF Protein (serum response factor) und die Ets Familie (26). Erst in den letzten Jahren wurde klar, daß RAS-abhängige Signalübertragung auch zur Repression der Genexpression führen kann. Die ersten Ergebnisse, die auf eine solche Hemmung in RAS-transformierten Zellen hinwiesen, wurden mit Hilfe von Revertanten-Zellinien und differenzieller Klonierung erzielt (27-30). Revertanten sind Zellinien, die ihren malignen Phänotyp bei gleichbleibender Onkogenexpression wieder verloren haben. In solchen Zellen wurde die Re-Expression von potentiell wachstumshemmenden Genen, wie z.B. Lysyl Oxidase oder Gelsolin, beobachtet, und man zog den Schluß, daß die Expression dieser Gene in den RAS-transformierten Zellen nur transient supprimiert war (31). Der hierfür verantwortliche Mechanismus war und ist bislang völlig unbekannt.

Globale Analysen der Genexpression haben in den letzten Jahren zur Identifizierung einer Vielzahl von Genen geführt, die an der RAS-vermittelten Transformation in vitro und in vivo beteiligt sind. Trotzdem bleiben eine Reihe offener Fragen, deren Klärung für das Verständnis der Mechanismen, die an der Tumorentstehung beteiligt sind, und damit auch langfristig für eine Verbesserung der molekularen Diagnostik und Tumortherapie von entscheidender Bedeutung sind:

**1.** Welche funktionelle Bedeutung haben einzelne RAS-regulierte Gene und die von ihnen kodierten Proteine?

**2.** Wie viele Gene werden im Zuge der malignen Transformation dereguliert und in welcher biochemischen Beziehung stehen ihre Genprodukte zueinander?

**3.** Wie werden diese Gene aktiviert oder supprimiert, und welche dieser Gene werden über gemeinsame Mechanismen reguliert?

Die Aufklärung dieser Probleme wird zum Beispiel anhand von Markergenen die Möglichkeit eröffnen, die Aktivierung pathogenetisch relevanter Signalwege in Tumoren diagnostisch zu

erfassen und eine entsprechende Therapie in die Wege zu leiten. Weiterhin werden mit Hilfe dieser Analysen neue therapeutische Zielstrukturen, zusätzlich zu den bereits bekannten, wie z.B. Bcr-Abl in chronisch-myeloischen Leukämien oder c-ErbB2 in Mammakarzinomen, sichtbar werden. Darüber hinaus wird man die Möglichkeit haben, mehrere Signalwege oder Zielproteine gleichzeitig oder nacheinander anzugreifen, um Resistenzentwicklung vorzubeugen.

In der vorliegenden Arbeit werden drei Zellkultur-Modelle beschrieben, mit deren Hilfe Gene analysiert wurden, deren Expression als Folge der RAS-Signalübertragung gehemmt wird. Unter Verwendung von PCR- und Microarray-gestützten Methoden wurden mehrere hundert Gene identifiziert, die in RAS-transformierten Zellen und auch in humanen Tumoren supprimiert werden. Mit Hilfe dieser Systeme konnte so erstmals nachgewiesen werden, daß die Hemmung der Genexpression in RAS-transformierten Zellen ebenso wichtig ist wie die Aktivierung. Weiterhin wird die funktionelle Analyse und Regulation der drei RAS-abhängigen Klasse II Tumor-Suppressoren H-REV107-1, H-REV107-2 und Caveolin-1 beschrieben. Die Mechanismen ihrer Regulation und Funktion wurden teilweise aufgeklärt. Sie zeigen exemplarisch, welche kausalen Zusammenhänge zwischen Signalketten-Aktivierung und Regulation von Zielgenen bestehen können und weisen auf generelle Mechanismen der Fehlfunktionen in der Genregulation bei Tumorzellen hin.

# 2. Transformationsmodelle zur Identifizierung RAS-abhängig regulierter Gene

## 2.1. Immortale, konstitutiv mit *HRAS* (V12)-transformierte Ratten Fibroblasten

Zuber, J., Tschernitsa, O.I., Hinzmann, B., Schmitz, A.-C., Grips, M., Hellriegel, M., Sers, C., Rosenthal, A. & Schäfer, R. *A genome-wide survey of RAS transformation targets.* Nat Genet. 2000, 24:144-52.

Für die Analyse globaler Genexpressionsveränderungen in Abhängigkeit von der RAS-Signalübertragung wurden Zellkultur-Modelle verwendet. 208F Zellen sind immortale, nicht-tumorigene Ratten Fibroblasten, FE-8 Zellen sind Derivate von 208F, die mit einem konstitutiv aktivierten humanen *HRAS* Onkogen transformiert wurden (32). Mittels SSH (suppression subtractive hybridization; 33) wurde von jeder dieser Zellinien ein Genexpressionsprofil erstellt (34). Bei dieser Subtraktionsmethode werden die RNA Populationen beider Zellinien revers transkribiert und die cDNA Populationen in bestimmten Verhältnissen miteinander hybridisiert. Alle cDNA Sequenzen, die in beiden Zellen gleich stark exprimiert werden, hybridisieren miteinander und werden dem Reaktionsansatz entzogen. Übrig bleiben die Sequenzen, die nur in einer der beiden Zellen exprimiert werden. Diese können dann mittels PCR amplifiziert, in geeignete Plasmide kloniert und durch Sequenzierung identifiziert werden.

Diese Experimente zeigten erstmals, daß in RAS-tranformierten Zellen eine annähernd gleiche Anzahl von Genen aktiviert und supprimiert wird. Unter den Genen, deren Expression gehemmt wird, fand sich eine Vielzahl von Sequenzen, die für Proteine mit Wachstums -oder Angiogenese-hemmender Wirkung kodieren. Beispiele hierfür sind die Gene für Lysyl Oxidase (30), p96DOC-2 (35) oder Thrombospondin-1 (13). Lysyl Oxidase fördert die Vernetzung von Kollagenfasern der extrazellulären Matrix (36, 37). Das p96DOC-2 Protein beeinflußt die Signalübertragung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren zum RAS-Protein negativ und fungiert in humanen Ovarialkarzinomzellen als Wachstumssuppressor (38). Thrombospondin-1 hemmt die Migration von Endothelzellen, und seine Wirkung als Angiogenese-Inhibitor wurde von Noel Bouck in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben (12, 13). Alle drei genannten Gene wurden zudem als direkte Zielgene des RAS/RAF/MEK-Signalweges identifiziert, d.h. ihre Expression wird durch die Aktivierung dieses Signalweges

transient supprimiert. Eine Hemmung der Kinase MEK1 durch den Inhibitor PD98059 führte zu einer vollständigen oder teilweisen Re-Expression der Gene in den FE-8 Zellen (34).

### 2.2. Immortale Fibroblasten mit induzierbarem *HRAS* (V12)

Sers, C., Tchernitsa, O.I., Zuber, J., Diatchenko, L., Zhumabayeva, B., Desai, S., Htun, S., Hyder, K., Wiechen, K., Agoulnik, A., Scharff, K.M., Siebert, P.D., and Schäfer, R. *Gene expression profiling in RAS oncogene-transformed cell lines and in solid tumors using subtractive suppression hybridization and cDNA arrays.* Adv.Enzyme Regul., 2002, 42: 63-82

Die stabile Transfektion von immortalen Zellen mit einem *RAS*-Expressionsplasmid hat multiple Auswirkungen auf die Zellen. Zusätzlich zur direkten Gen-Aktivierung und –Hemmung, führt die Expression des Onkogens auch zu chromosomalen Veränderungen während der Transformation (39). Diese haben ebenfalls Veränderungen der Genexpression zur Folge, die somit eine indirekte Auswirkung der RAS-Transformation darstellen.

Um zwischen direkter und indirekter Beeinflussung der Genexpression durch *RAS* unterscheiden zu können, wurde auf der Basis der 208F Zellen ein weiteres Fibroblasten-Modell etabliert, in dem das humane *HRAS*-Onkogen durch einen induzierbaren Promoter an- und abgeschaltet werden kann (40). Diese Zellen (IR = Inducible RAS) unterscheiden sich im nicht-induzierten Zustand kaum von den ursprünglichen 208F Zellen. Ihre Morphologie entspricht derjenigen normaler Fibroblasten, die Zellen sind kontaktinhibiert und wachsen nicht in Weichagar. Nach Induktion der RAS-Expression mit 20mM IPTG kommt es innerhalb von 3-5 Tagen zu einer deutlichen Veränderung der Zellmorphologie, und die Zellen wachsen in Weichagar, ein typisches Merkmal transformierter Zellen (41).

Von den IR-Zellen wurde wieder mittels SSH je eine subtraktive cDNA Bank im nicht-induzierten Zustand und 5 Tage nach Induktion des *RAS*-Onkogens hergestellt. Diese beiden cDNA Banken sind bisher nicht veröffentlicht. Im weiteren wurden die Zellen eingesetzt, um die Expression verschiedener Gene, die in 208F und FE-8 als differenziell exprimiert identifiziert werden konnten, zu überprüfen. In diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß die Hemmung von *Thrombospondin*, *Lysyl Oxidase (Lox)* und *Lysyl Oxidase-like-1* (*LoxL*, ein verwandtes Gen der *Lysyl Oxidase*; 42), direkt von der Expression und Aktivierung des *HRAS* Onkogens und des MEK-Signalweges abhängig ist.

Im nicht-induzierten Zustand exprimieren IR-Zellen alle dreis Gene. Fünf Tage nach Aktivierung des *RAS* Gens war jedoch keine signifikante mRNA Expression von *Thrombospondin, Lox* und *LoxL* mehr nachweisbar. Nach Abschalten der RAS-Induktion

erlangten die Zellen wieder ihre normale Morphologie und die Gene für Thrombospondin und Lysyl-Oxydase like-1 (*LoxL*) wurden re-exprimiert. Im Fall des Gens für Lysyl-Oxydase kam es auch fünfs Tage nach Abschalten des *RAS* Onkogens nicht zu einer Expression. Eine mögliche Beteiligung sezernierter Wachstumsfaktoren an der RAS-abhängigen Transformation war bereits früher vermutet worden (43, 44). Solch ein Faktor, produziert nach Induktion des *RAS*-Onkogens könnte, wenn er stabil im Zellkultur-Medium vorliegt, die mitogene Signalübertragung modulieren. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde von IR-Zellen, die 5 Tage induziert waren, Zellkultur-Überstand entnommen, konzentriert und auf normale, nicht induzierte IR-Zellen gegeben. Die Expression des Lysyl Oxydase Gens konnte dadurch innerhalb von 48 Stunden vollständig gehemmt werden. Das Experiment zeigte, daß die Hemmung der Genexpression durch aktivierte RAS-Signalübertragung direkt und indirekt bewerkstelligt werden kann. Dieser Mechanismus wurde kürzlich auch in humanen MCF10 Epithelzellen nachgewiesen (45). Anhand dieser Daten und unserer eigenen Beobachtung liegt es nahe zu vermuten, daß solche „autocrinen Verstärkungen“ in humanen Geweben nach Aktivierung der RAS-Signalübertragung vorkommen. Damit könnte die Genexpression auch in Zellen beeinflußt werden, die selbst kein aktiviertes Onkogen tragen, aber durch die sezernierten Wachstumsfaktoren von ihren Nachbarzellen beeinflußt werden.

### 2.3. Immortale, konstitutiv mit *KRAS* (V12)-transformierte Ratten Ovarial Epithelzellen

Tchernitsa, O.I.*, Sers, C.*, Zuber, J., Hinzmann, B., Schwendel, A., Schramme, A., Lund, P., Rosenthal A. and Schäfer, R. *The transriptional basis of KRAS-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells*; eingereicht
(*Die beiden Autoren haben in gleichem Umfang zu der Arbeit beigetragen)s

Mit Hilfe der beiden Fibroblasten Modelle konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, deren Expression in der RAS-abhängigen Genexpression modifiziert wird. Da Karzinome jedoch aus Epithelzellen entstehen, wurde ein weiteres, Epithelzell-basiertes Zellkultur-Modell etabliert. Es besteht aus immortalen, nicht-tumorigenen Oberflächen-Epithelzellen der Ratte (Rose 199; 46) und einem davon abgeleiteten, *KRAS*-transformierten Derivat (Rose A2/5; Tchernitsa & Sers; eingereicht). Rose 199 Zellen entstanden durch spontane Immortalisierung von kultivierten Epithelzellen des Ovars. Die kodierende Sequenz des *KRAS*-Onkogens wurde mittels RT-PCR aus RNA der humanen Kolonkarzinomzelle SW480 amplifiziert und unter der Kontrolle des humanen Promoters für den

Elongationsfaktor EF1α (47) stabil in Rose 199 Zellen transfiziert. Mehrere Zellklone (A2/1-A2/5) wurden expandiert. Alle Klone weisen eine deutlich veränderte Morphologie hin zu einem Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp auf (epithelial-mesenchymale Transition) und zeigen im Western-Blot eine starke Expression des KRAS-Proteins. Die im weiteren Verlauf verwendeten Zellen Rose A2/5 besitzen im Gegensatz zu den immortalen Rose 199 die Fähigkeit in Weichagar zu wachsen. Sie zeigen eine Aktivierung des mitogenen RAS/RAF/MEK-Signalweges. Eine Inkubation der Zellen mit dem spezifischen MEK Inhibitor PD98059 führt zu einer Hemmung des Weichagar-Wachstums und zur morphologischen Reversion des transformierten Phänotyps.

Zur Identifizierung derjenigen Gene, die signifikante Expressionsunterschiede zwischen Rose 199 und Rose A2/5 zeigen, wurden mittels SSH (subtractive suppression hybridization; 33) zwei subtraktive cDNA Banken hergestellt. 1070 Klone wurden sequenziert, dabei wurden 569 individuelle Sequenzen gefunden. Eine differenzielle Expression dieser Sequenzen wurde mit zwei Methoden bestätigt. Im sog. umgekehrten Northern-Blot wurden die klonierten PCR Fragmente aus den beiden cDNA Banken re-amplifiziert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Diese wurde anschließend mit radioaktiv markierten cDNA-Proben der beiden Zellinien hybridisiert. Weiterhin wurde die differenzielle Expression aller klonierten Sequenzen, die für bekannte Gene kodieren, in Standard-Northern-Blotanalysen mit RNA aus den beiden Zellinien Rose 199 und Rose A2/5 überprüft. Von den bekannten Genen und ESTs (expressed sequence tags) wurden mit Hilfe der oben beschriebenen Methoden 68% der in Rose A2/5 überexprimierten Sequenzen bestätigt. Von den in den Rose199 exprimierten Sequenzen konnten 65% bestätigt werden. Von den überprüften Fragmente waren 44 mit diesen Methoden nicht nachweisbar, sie repräsentieren mit großer Wahrscheinlichkeit mRNA Transkripte, die in sehr geringen Mengen in den Zellen vorliegen.

### *2.3.1. Identifizierung von RAS-RAF-MEK -und PI-3 Kinase-abhängigen Regulations-Modulen*

Um zu untersuchen, welche Gene in ihrer Expression durch den RAS/RAF/MEK-Signalweg beeinflußt werden, wurden Rose A2/5 Zellen für 48 Stunden mit dem MEK-Inhibitor PD98059 behandelt (siehe Abbildung 1). Die Expression von 178 Genen wurde mittels Northern-Blotanalysen in den Rose A2/5 Zellen mit und ohne PD98059 Inkubation untersucht. Von den in Rose A2/5 supprimierten Genen wurden 46 partiell oder vollständig re-exprimiert. Von der in Rose A2/5 überexprimierten Genen wurden 52 durch PD98059

partiell oder vollständig supprimiert. Das bedeutet, daß sowohl die Unterdrückung der Genexpression als auch die Aktivierung der Genexpression ein wichtiger Bestandteil der RAS-Onkogen-abhängigen Transformation ist. Neben dem RAS/RAF/MEK-Signalweg spielt auch die direkte oder indirekte Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI 3K) eine wichtige Rolle in humanen Tumoren (48, 49, 22). Insbesondere der Hemmung der Apoptose durch aktivierte PI 3-Kinase wird in humanen Tumoren eine wichtige Rolle zugeschrieben (50, 8). Die Analyse der Kinase Akt, welche durch PI 3-Kinase gesteuerte Prozesse phosphoryliert wird, zeigte jedoch, daß in den *KRAS*-transformierten Rose A2/5 keine signifikante Erhöhung der Akt Phosphorylierung nachweisbar ist. Eine Inkubation der Zellen mit 10µM des PI 3-Kinase Inhibitors LY294002 ergab aber eine 50%ige Hemmung des Anker-unabhängigen Wachstums von Rose A2/5 Zellen. Wir vermuten, daß die minimale Aktivierung dieses Signalweges, die in den Zellen nachweisbar ist, bereits ausreicht, um das Wachstum positiv zu beeinflussen. Alternativ ist die PI 3-Kinase in Rose A2/5 Zellen aktiviert, stimuliert aber keine Akt-abhängige Signalübertragung, sondern beeinflußt das Wachstum über einen anderen, bisher nicht bekannten Weg. Die Hemmung der PI 3-Kinase mit LY294002 konnte die Expression von 24 der 49 getesteten, in den Rose A2/5 über-experimierten Gene ganz oder teilweise revertieren. Im Gegensatz dazu zeigte sich keinerlei Einfluß auf die supprimierten Gene. Besonders interessant war die Beobachtung, daß von den 24 über PI 3-Kinase regulierten Genen, 19 auch teilweise über den RAS/RAF/MEK-Signalweg gesteuert werden können. Mit diesen Experimenten wurden 4 Gruppen von Genen identifiziert. Gene, die *a.* über den RAS-RAF-MEK Signalweg gesteuert werden; *b.* Gene, die über den RAS-PI-3 Kinase Weg gesteuert werden; *c.* Gene, die über beide Wege reguliert werden; *d.* Gene, die über andere Mechanismen reguliert werden.

Wie die Steuerung der Genexpression über eine Kombination der beiden Signalwege funktioniert, ist völlig unbekannt. Eine Interaktion der RAS/RAF/MEK- und des RAS/PI 3-Kinase-Wege wurde 1999 von der Arbeitsgruppe Karin Möllings beschrieben (51). Sie konnten zeigen, daß die PI-3 Kinase-abhängige Kinase Akt die Serin-Threonin-Kinase RAF phosphorylieren und damit hemmen kann. Dieser Mechanismus ist höchst wahrscheinlich auch in den Rose A2/5 Zellen aktiv, da bei einer vollständigen Hemmung des sehr schwach aktivierten PI-3 Kinase Weges mit LY294002 immer eine klare Steigerung der ERK1/2-Aktivierung zu beobachten war. Eine umgekehrte Beeinflussung des PI-3 Kinase-Weges durch den RAF/MEK-Weg konnte nicht beobachtet werden.

Die Zielgene des PI-3 Kinase-Weges, die in diesem System identifiziert wurden, finden sich in allen funktionellen Proteinklassen und lassen keine spezifischen Rollen in der Steuerung

der Apoptose erkennen. Bislang wurden zwei Gruppen von Transkriptionsfaktoren beschrieben, deren Lokalisation und Aktivierung über den PI-3K/AKT-Weg reguliert werden kann. Dies sind zum einen die Mitglieder der „Forkhead"-Transkriptionsfaktoren, die direkt durch Akt phosphoryliert werden können. Die Phosphorylierung resultiert in einer zytoplasmatischen Lokalisation dieser Proteine, wodurch sie ihre spezifischen Zielgene nicht mehr aktivieren können (50). Dieser Mechanismus betrifft jedoch Gene, deren Expression durch den RAS/PI-3K/AKT-Signalweg gehemmt wird. In unserem Modell konnte die Hemmung der PI-3 Kinase mit LY294002 jedoch ausschließlich Gene beeinflussen, die in den RAS-transformierten Zellen überexprimiert waren. Aus diesem Grund wird hier keine Beteiligung der „Forkhead"-Transkriptionsfaktoren vermutet. Ein anderer, kürzlich beschriebener Mechanismus der AKT-abhängigen Regulation der Genexpression läuft über den Transkriptionsfaktor CREB. CREB kann direkt von AKT phosphoryliert und aktiviert werden (52). Einige Mitglieder der CREB/ATF-Familie können Heterodimere mit den AP-1 Proteinen der FOS-und JUN-Gruppen bilden (53). Ob die RAS/RAF/MEK-und RAS/PI3K-abhängige Regulation der Genexpression über diese Proteine gesteuert wird, ist bislang noch nicht bekannt.

### *2.3.2. Promoter Analysen RAS-regulierter Gene*

Herzel, H., Beule, D., Kielbasa, K., Korbel, J., Sers, C., Malik, A., Eickhoff, H., Lehrach, H., Schuchhardt, J. *Extracting Information from cDNA Arrays.* CHAOS 2001, 11 (1), 1-10

Die Identifizierung RAS-abhängiger Expressionsmodule lieferte zum ersten Mal Hinweise darauf, daß es Gruppen von gemeinsam regulierten Genen gibt, deren Expression gleichzeitig durch die Aktivität bestimmter Signalwege gesteuert werden kann. Um die Mechanismen dieser Regulation besser zu verstehen, wurde der Versuch unternommen, die Promoter-sequenzen solcher Gene detailliert zu untersuchen. Diese Analysen wurden am Innovationskolleg Theoretische Biologie (ITB) in der Arbeitsgruppe von Prof. Hanspeter Herzel vorgenommen. Mit Hilfe eines neu entwickelten Algorithmus wurde nach definierten, in den Promotorbereichen über-repräsentierten Sequenzabfolgen gesucht. Diese Suche wurde mit den Promotoren der fünf RAS-abhängig supprimierten Gene *LOX, LOXL, LOXL2*, *RIL* und *THBS* durchgeführt. Dabei wurde eine signifikant über-repräsentierte Sequenzabfolge gefunden, die in 4 der 5 Promotorregionen 9 mal auftaucht. Die Analysen zeigten, daß es möglicherweise konservierte Sequenz-Motive gibt, die für eine parallele Regulation von Genen verantwortlich sind. Um solche jedoch in Zukunft exakt zu definieren, muß eine

größere Anzahl von Promotoren untersucht und die funktionelle Rolle einzelner Sequenzen in vitro analysiert werden. Diese in vitro Analysen werden zu Zeit mit zwei RAS-abhängig supprimierten Promotoren (*RIL*, *H-REV107-1*) durchgeführt. Der Promotor des humanen *H-REV107-1* Gens, welches in Teratokarzinomzellen über den RAS-RAF-MEK Weg supprimiert wird (siehe IV, 2a), wurde in meinem Labor charakterisiert.

## 3. Identifizierung differentiell exprimierter Gene in humanen Ovarialkarzinomen mittels Hybridisierung von cDNA-Arrays

Sers, C., Tchernitsa, O.I., Zuber, J., Diatchenko, L., Zhumabayeva, B., Desai, S., Htun, S., Hyder, K., Wiechen, K., Agoulnik, A., Scharff, K.M., Siebert, P.D., and Schäfer, R. *Gene expression profiling in RAS oncogene-transformed cell lines and in solid tumors using subtractive suppression hybridization and cDNA arrays.* Adv.Enzyme Regul., 2002, 42: 63-82

Mit Hilfe der SSH-Analyse der normalen und *KRAS*-transformierten Ovarialepithelzellen wurde eine Reihe von differentiell exprimierten Genen identifiziert, deren potentielle Rolle in der Tumorgenese des Ovarialkarzinoms bereits beschrieben worden war. Dazu gehören das Zink-Finger Protein LOT1 (54), das Wilms-Tumor Suppressor- Protein WT1 und Sparc/Osteonectin (55), um nur einige zu nennen. Die Häufigkeit von *KRAS* Mutationen ist in humanen Ovarialkarzinomen ist eher gering, durch die Überexpression von Tyrosinkinase-Rezeptoren wie cErbB2 werden aber RAS-abhängige Signalwege aktiviert. Damit ist das Rose 199 – Rose A2/5 System ein sehr gutes Modell, um die Funktionen der differenziell exprimierten Gene und ihrer Genprodukte zu analysieren.

In humanen Tumoren kommt es jedoch neben und durch die Aktivierung der mitogenen Signalwege auch zu chromosomalen Aberrationen, die stabile Veränderungen der Gen-expression erzeugen. Darüber hinaus ist das normale Ovarialepithel im Gegensatz zu den immortalen Rose 199 Zellen proliferations-inaktiv. Während der Tumorentstehung in situ spielen nicht nur die Veränderungen innerhalb der Epithelzellen eine Rolle, sondern auch die Interaktion des Epithels mit dem darunterliegenden Stroma. All diese Komponenten werden im Zellkultur Modell nicht berücksichtigt. Darüber hinaus werden nicht alle im Gewebe aktiven Gene in kultivierten Zellen exprimiert.

Um auch solche Einflüsse und damit Gene zu erfassen, die in Zellkultur eine untergeordnete Rolle spielen, wurden in Zusammenarbeit mit Luda Diatchenko, Bakhyt Zhumabayeva und Sejal Desai der Clontech Inc. in Palo Alto (Kalifornien, USA) differenziell exprimierte Gene

in humanen Ovarialkarzinomen untersucht. Die Identifizierung und Verifizierung der potentiell interessanten, differenziell exprimierten Gene erfolgte in drei Schritten: *a.* RNA Proben aus normalen humanen Ovarien und aus serösen Ovarialkarzinomen (G3) wurden gegen einen Atlas „*Select* Human Tumor Array™“ hybridisiert. Der RAS und cErbB2 Status der Tumoren war unbekannt. Dieser Array repräsentiert 437 Gene, die durch die Herstellung subtraktiver cDNA Banken aus verschiedenen humanen Geweben (Leber, Lunge, Mamma, Prostata, Blase) identifiziert worden waren. Ihre Expression unterscheidet sich signifikant zwischen Tumor-und Normalgewebe. *b.* Gene, die nach der Hybridisierung der Ovarialproben auf diesem Array einen mehr als zweifachen Expressionsunterschied zwischen Tumor und Normalgewebe aufwiesen, wurden auf einem zweiten Array getestet, dem sogenannten „Matched Tumor /Normal Array™“. Dieser Array enthält 68 cDNA-Paare, die aus verschiedenen humanen Tumoren und den korrespondierenden Normalgeweben einzelner Patienten hergestellt, normalisiert und auf den Array aufgebracht wurden (56). *c.* Die Produkte einzelner Gene, deren Expressionsmuster auf diesem Array wieder einen deutlichen Unterschied zwischen den cDNA Pools aus normalem Ovar und aus Ovarialkarzinomen aufwiesen, wurden mittels Immunhistochemie und Western-Blot weiter analysiert.

Die Hybridisierung der RNA aus normalen und tumorigenen Ovarialgeweben auf den „Atlas *Select* Tumor Array“ ergab 15 Gene mit einer mehr als zweifachen Stimulation der Expression und 40 Gene mit einer mehr als zweifachen Hemmung der Expression in den Tumoren, verglichen mit den Normalgeweben. Drei der überexprimierten Gene (*KOP*, *ODC* und *MCM3*) wurden mit Hilfe des „Matched Tumor/Normal Array“ weiter analysiert. Dabei zeigte sich, daß nur *KOP* auch in den cDNAs aus Ovarialkarzinomen auf diesem Array eine Stimulation aufwies. Das *KOP*-Gen kodiert für einen Protease-Inhibitor, dessen Expression in Pankreaskarzinomen gefunden wurde (57). Eine Stimulation der *KOP*-Expression in Ovarialkarzinomen wurde inzwischen auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt, die Funktion des KOP-Proteins in der Entstehung oder Progression des Ovarialkarzinoms ist bislang unbekannt (58).

Von den 40 supprimierten Sequenzen wurden die Gene für die beiden Transkriptionsfaktoren *ZFP36* und *EGR-1* genauer untersucht. Weiterhin wurden die Gene für die Membranproteine Caveolin-1 und -2 sowie das Gen für Clusterin-1, welches für ein sezerniertes Chaperon-Protein kodiert (59), analysiert. *ZFP36* und *EGR-1* zeigten im „Matched Tumor/Normal Array“ eine konsistente Suppression in allen Mamma -und Ovarialkarzinomen. Interessanterweise scheint *ZFP36* hauptsächlich in diesen beiden Tumorarten unter-repräsentiert zu sein, was hier auf eine besondere Rolle dieses Gens schließen läßt. Die

Hemmung der Clusterin-Expression hingegen ließ sich mit dem „Matched Tumor/Normal Array“ nicht bestätigen, und die kürzlich erschienene Arbeit von Hough et al. weist sogar auf eine Überexpression von Clusterin in ca. 50% der serösen Ovarialkarzinome hin (58). Um Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle von Clusterin in Ovarialkarzinomen ziehen zu können, muß eine größere Anzahl von Tumoren analysiert werden, und soweit möglich, die Expression und intrazelluläre Lokalisation des Proteins untersucht werden.

Die Gene für die beiden Membranproteine Caveolin-1 und -2 waren nach den Ergebnissen des „Matched Tumor/Normal Array“ in allen Ovarialkarzinomen deutlich supprimiert. Darüber hinaus zeigte sich eine Suppression in Tumoren aus Mamma, Lunge und Kolon. Caveoline sind eine kleine Familie von Membranproteinen, welche die Hauptkomponenten der sog. Caveolae bilden, Omega-förmige Einstülpungen der Zytoplasmamembran, die in allen Säugerzellen vorkommen. Innerhalb dieser Strukturen bilden die Caveoline eine Art „Steuer-Gerüst“ für Signalmolekule, wie z.B. den EGF-Rezeptor, RAS-Proteine und RAS-abhängige Proteinkinasen, und fungieren als negative Regulatoren der Signalkaskaden (60, 61). Kürzlich wurde vorgeschlagen, daß die RAS-Isoformen HRAS und KRAS unterschiedlich über Caveolae reguliert werden (62, 63). Die differenzielle Regulation von Caveolin-1 und –2 war daher von besonderem Interesse, da hier die Regulatoren der RAS-abhängigen Signalübertragung in Tumoren offenbar modifiziert waren. Daher wurde die Expression und Regulation von Caveolin-1 in humanen Ovarialkarzinomen und Tumorzellinien weiter untersucht.

# 4. Funktionelle Charakterisierung von Klasse II Tumor-Suppressor- genen

## 4.1. Caveolin-1 (CAV1)

Wiechen, K., Diatchenko, L., Agoulnik, A., Zhumabayeva, B., Desai, S., Htun, S., Scharff, K.M., Hyder, K., Siebert, P.D., Dietel, M., Schäfer, R. and Sers, C. *Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinomas and acts as a candidate tumor suppressor gene.* Am. J. Pathol. 2001, 159: 1635-1643

Wiechen, K., Sers, C., Dietel, M., Schlag, P.M. and Schneider U. *Down-regulation of Caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas*. Am. J. Pathology 2001, 158: 833-839

Die Analyse der Expression von Caveolin-1 in humanen Karzinomen und die Regulation des Caveolin-1-Gens (*CAV1*) in Zellinien wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Kai Wiechen im Institut für Pathologie durchgeführt.
Eine immunhistochemische Analyse von mehr als 70 humanen Ovarialgeweben mit einem Caveolin-1-spezifischen Antikörper ergab, daß Caveolin-1 im normalen Ovarialepithel exprimiert wird. In der überwiegenden Mehrzahl der serösen G2- und G3- Ovarialkarzinome zeigte sich jedoch eine deutliche Reduktion oder ein Verlust der Caveolin-1 Expression. Diese Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse aus den Array-Hybridisierungen.
Untersuchungen in Ovarialkarzinom-Zellinien ergaben ein ähnliches Bild, nur zwei der sechs untersuchten Linien waren im Western-Blot positiv für Caveolin-1. Warum diese beiden Zellinien trotzdem ungehindert wachsen, ist bislang nicht klar. Die forcierte Expression des Caveolin-1-Gens in der Caveolin-negativen Zellinie OVCAR-3 hingegen resultierte in einer massiven Reduktion der Kolonieausbeute, und trotz wiederholter Versuche gelang es nicht, Klone zu etablieren, die Caveolin-1 stabil exprimieren. Dies bedeutet, daß in Ovarialkarzinomzellen, die einen Verlust von Caveolin-1 aufweisen, dieser Defekt auch funktionell für das Überleben und das Wachstum der Zellen von Bedeutung ist.
Auch die Mechanismen der Regulation von Caveolin-1 in Ovarialkarzinomen wurden untersucht. Das *CAV1* Gen liegt auf Chromosom 7q31.1, einer Region, die in verschiedenen humanen Tumoren Deletionen aufweist (64-67). Ein Verlust des *CAV1* Gens selbst konnte bisher aber nicht nachgewiesen werden (68). Diese Daten ließen darauf schließen, daß Caveolin-1 möglicherweise als Klasse II Tumor-Suppressor fungiert. Die Experimente in den

humanen Ovarialkarzinomlinien OVCAR-3 und OAW42 bestätigten diese Vermutung. Die Suppression des Caveolin-1 Gens in diesen beiden Zellinien konnte durch eine Hemmung der DNA-Methylierung mit 5-Aza-2‘Desoxycytidin und der Histon-Deacetylierung mit Trichostatin A (TSA) fast vollständig aufgehoben werden. In diesen Experimenten fand sich jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen der Regulation der Caveolin-1-Expression auf Ebene der mRNA und des Proteins. Die Inkubation der Zellinien mit 5-Aza-2‘Desoxycytidin und TSA konnte die Caveolin-1 mRNA-Expression nur geringfügig steigern, die Protein-Expression wurde hingegen deutlich verstärkt.

Diese Ergebnisse zeigten, daß mit Caveolin-1 ein negativer Regulator der RAS-abhängigen Signalübertragung in humanen Ovarialkarzinomen über epigenetische Mechanismen gehemmt wird. Diese betreffen nicht notwendigerweise das Caveolin-1 Gen selbst, sondern übergeordnete, bislang unbekannte Regulatoren. Die Häufigkeit der Caveolin-1 Suppression in humanen Tumoren ist ein klarer Hinweis darauf, daß die RAS-abhängige Signalübertragung in Ovarialkarzinomen nicht über Mutationen in den *RAS* Genen, sondern über die andere Mechanismen zustande kommt. Eine reine Analyse von Mutationen ist daher in Zukunft kein geeignetes Mittel um einen möglichen Einfluß von aktiviertem RAS in diesen Tumoren zu untersuchen.

Im Zuge der immunhistochemischen Untersuchungen von Caveolin-1 wurde eine Expression des Proteins in mesenchymalen Zellen beobachtet. Dazu gehörten Adipozyten, glatte Muskulatur und Endothelzellen der Gefäße. Weitergehende Analysen zeigten eine starke Expression in benignen mesenchymalen Tumoren, wie z.B. Fibromatosen, Leiomyomen und Lipomen. Die meisten der 77 untersuchten malignen Tumoren dagegen wiesen eine deutliche Reduktion oder einen Verlust der Caveolin-1-Expression auf. Analysiert wurden Fibrosarkome, Leiomyosarkome, Histiozytome und Angiosarkome. In einem mesenchymalen Zellkulturmodell, bestehend aus den immortalen humanen Fibroblasten IMR90 und *NRAS*-transformierten HT1080 Fibrosarkomzellen, wurde die Expression und Regulation von Caveolin-1 weiter untersucht. Während eine starke Expression beider Caveolin-1-Isoformen (22 und 24 kDa) in IMR-90 Zellen im Western Blot nachgewiesen werden konnte, waren HT1080 Zellen nur schwach positiv. Ein klarer Einfluß der Caveolin-1-Expression auf die Koloniebildung der HT1080 Zellen wurde in zwei unabhängigen Transfektionen nachgewiesen. Die Kolonieausbeute mit dem Caveolin-1-exprimierenden Plasmid ging jeweils auf 12% und 18% der Ausbeute mit dem Leervektor zurück. Eine stabile Überexpression von Caveolin-1 war auch in den HT1080 Zellen nicht

möglich. Diese Ergebnisse deuten auf eine wachstumshemmende Funktion von Caveolin-1 in mesenchymalen Zellen hin.
Wie bereits in Mauszellen beschrieben, wird die Expression des Caveolin-1 Gens über den RAS/RAF/MEK-Signalweg negativ reguliert und hat selbst einen hemmenden Einfluß auf diesen mitogenen Signalweg (69, 70). Die Hemmung der Kinase MEK mit dem spezifischen Inhibitor PD98059 führte in den humanen HT1080 Zellen zu einer teilweisen Re-Expression von Caveolin-1. Wie bereits für die Ovarialkarzinom Zellen gezeigt, fungiert Caveolin-1 auch hier als Klasse II-Tumor-Suppressor und die an der Caveolin-1-Hemmung beteiligten Signalwege konnten zum Teil identifiziert werden.

Die Experimente zur Charakterisierung von Caveolin-1 haben deutlich den Nutzen und die Grenzen der Microarray-Technologie gezeigt. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Wachstum und/oder Überleben von Ovarialkarzinomzellen und dem Verlust der Caveolin-1-Expression konnte erst durch eine ganze Reihe von Experimenten in vitro nachgewiesen werden. Durch diese Versuche wurde insbesondere klar, daß nicht nur die Regulation der Caveolin-1 mRNA-Expression, sondern auch seine post-translationale Regulation, sowie die Modifikation und intrazelluläre Lokalisation des Proteins in Tumoren verändert sind. Auf der Basis dieser Erfahrungen bleibt die Microarray-Technologie ein wichtiges Mittel, um Hinweise auf Tumor-relevante Gene zu erhalten. Sie ist aber nur der erste Schritt auf dem Weg zu einer wissenschaftlich fundierten Aussage über die Rolle eines Gens und seines Produktes in einem humanen Tumor.

## 4.2. Identifizierung und Charakterisierung einer neuen RAS-Suppressor Genfamilie

### *4.2.1. H-REV107-1*

Sers, C., Emmenegger, U., Husmann, K., Bucher, K., Andres, A.-K. & Schäfer, R.. *Growth-inhibitory activity and downregulation of the classII tumor-suppressor gene H-rev107 in tumor cell lines and experimental tumors.* Journal of Cell Biology, 1997, 136: 935-944

Husmann, K., Sers, C., Fietze, E., Mincheva, A., Lichter, P. and Schäfer, R. *Transcriptional and translational downregulation of H-REV107-1, a tumor suppressor gene located on human chromosome 11q11-13*. Oncogene 1998, 17: 1305-1312 (Die beiden Erstautoren haben in gleichem Umfang zu der Arbeit beigetragen): Knut Husmann and Christine Sers

Sers, C., Husmann, K., Nazarenko, I., Reich, R., Wiechen, K., Zhumabayeva, B., Adhikari, P., Schroeder, K., Gontarewicz, A. and Schäfer, R. *The classII tumorsuppressor gene H-REV107-1 is a target of interferon-regulatory factor 1 and is involved in interferon gamma-dependent growth suppression in human ovarian carinoma.* Oncogene, 2002, 21: 2829-2839

Eines der ersten RAS-abhängig supprimierten Gene, welches in der Arbeitsgruppe identifiziert worden war, ist das *H-rev107* Gen. Es wurde mit Hilfe von cDNA-Subtraktionsexperimenten isoliert, in denen die Genexpression in der immortalen, nicht tumorigenen Zellinie 208F und einer Revertanten-Zellinie F9 verglichen wurde (28). Zum Zeitpunkt seiner Klonierung wies das Gen keine Homologien zu bekannten Sequenzen in den Datenbanken auf. In den beschriebenen Zellkultur-Modellen (208F/FE-8 und Rose199/A2/5) ist *H-rev107* jeweils klar differenziell exprimiert. In den beiden immortalen Zellinien 208F und Rose 199 läßt sich eine starke Expression nachweisen, nicht aber in den *HRAS*- und *KRAS*-transformierten FE-8 und Rose A2/5 Zellen.

Um das *H-rev107* Gen genauer zu charakterisieren, wurde seine mRNA Expression in Rattengeweben, in Tumorzellinien der Ratte und in *HRAS*-abhängig induzierten Tumoren der Maus untersucht (71). *H-rev107* war in den meisten normalen Geweben stark exprimiert. Ein deutliches mRNA-Signal wurde auch in immortalen Fibroblasten und Epithelzellen nachgewiesen, Tumorzellen aus Pankreas, Niere und Leber hingegen waren nur schwach positiv oder negativ. Mit Hilfe eines H-rev107-spezifischen polyklonalen Antiserums, konnte das Protein in Epithelzellen normaler Gewebe nachgewiesen werden. Dagegen exprimierten die meisten Zellen in Zellkultur nur sehr geringe Mengen an H-rev107 Protein. Auch in *HRAS*-induzierten Mammakarzinomen der Maus konnte kein H-rev107 Protein detektiert werden, und 50% der untersuchten Tumoren wiesen darüber hinaus einen Verlust der *H-rev107* mRNA Expression auf. Die Suppression des *H-rev107* Gens in Tumorzellinien und Tumoren war ein erster Hinweis auf seine mögliche Funktion als Wachstumsinhibitor.
Die forcierte Expression von *H-rev107* in den *RAS*-transformierten FE-8 Zellen sowie in Anr4 Ratten Hepatokarzinomzellen ergab eine Suppression der Koloniebildung von 75%. Weiterhin gelang es nicht, H-rev107-exprimierende FE-8-oder Anr4-Klone herzustellen. Daher wurde ein Doxycyclin-induzierbares *H-rev107* in FE-8 Zellen eingebaut, welches nach Induktion ebenfalls zu einer massiven Hemmung der Koloniebildung führte. Um einen möglichen Effekt der H-rev107 Expression in vivo zu untersuchen, wurden *H-rev107*-transfizierte FE-8 und Anr4 Zellpopulationen in Nackmäuse injiziert und das Tumorwachstum beobachtet. Die Ausgangszellen bilden normalerweise innerhalb von 4-8

Tagen tastbare Tumoren. Die injizierten Zellpopulationen waren zu maximal 50% H-rev107-positiv. Insbesondere bei den langsamer wachsenden Anr4 Zellen zeigte sich, daß die Expression des Wildtyp-H-rev107-Proteins die Latenzzeit bis zur Entstehung tastbarer Tumorknoten um bis zu 50% verlängerte.
Als Kontrollen dienten in diesen Experimenten Zellpopulationen, die mit einem H-rev107-Antisense-Konstrukt transfiziert waren sowie solche mit einem Expressionsvektor, der ein um den C-terminalen Anteil verkürztes Protein (H-rev107 ΔC) exprimiert. Der C-terminale Anteil von H-rev107 besteht aus 21 hydrophoben Aminosäuren. Mittels biochemischer Fraktionierung von H-rev107-transfizierten COS-Zellen und anschließendem Western-Blot wurde nachgewiesen, daß das Wildtyp-H-rev107-Protein im Zytoplasma an intrazellulären Membranen und vermutlich an der nukleären Membran gebunden vorliegt. Ein mutiertes H-rev107-Protein dem die letzen 21 Aminosäuren fehlen, kommt nur im Zytoplasma, jedoch nicht mehr Membran-gebunden vor. Dieses Protein hatte in vitro eine deutlich verringerte Kapazität, die Koloniebildung zu hemmen und war in vivo in den Nacktmäusen wirkungslos. Offenbar spielt die intrazelluläre Lokalisation des Proteins eine wichtige Rolle. Mit diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß H-rev107 das Wachstum *RAS*-transformierter Zellen in vitro und in vivo hemmt und die Suppression seiner Expression eine wichtige Voraussetzung für die Transformation durch *RAS*-Onkogene ist.

Um eine mögliche Funktion dieses Gens in der humanen Tumorentwicklung studieren zu können, wurde das homologe humane *H-REV107* kloniert und analysiert. Eine cDNA-Bank aus Leberzellen wurde mit einer Ratten-*H-rev107* cDNA-Sonde hybridisiert, und vier positive cDNA Klone wurden sequenziert. Der längste Klon von 1064 Basenpaaren enthielt einen vollständigen offenen Leserahmen, 407 Basenpaare 5‘- und 167 Basenpaare 3‘-untranslatierte Sequenzen. Ein Vergleich der Proteinsequenzen aus Ratte und Mensch mit einer Übereinstimmung von 83 % zeigte, daß H-REV107 in der Evolution hoch konserviert ist. Das humane H-REV107-Protein ist mit 162 Aminosäuren zwei Aminosäuren länger als das Ratten-Protein und läßt sich im Western-Blot mit dem polyklonalen Kaninchen-Antiserum als etwa 18 kDa grosse Bande nachweisen. Das humane *H-REV107*-Gen ist ubiquitär in den meisten normalen Geweben exprimiert. Eine fehlende bzw. sehr schwache Expression in peripheren Lymphozyten und im Thymus zeigte, daß *H-REV107* in hämatopoetischen Organen oder Zellen nicht exprimiert ist. In den ersten Northern-Blotanalysen, die mit der kodierenden Region als cDNA-Sonde durchgeführt wurden, traten zwei Banden auf. Mit Hilfe einer spezifischen Sonde aus dem 5‘-untranslatierten Anteil des

*H-REV107*-Gens konnte die ca. 1,2 kb lange, größere Bande als die H-REV107-spezifische mRNA identifiziert werden. Ein Vergleich der *H-REV107* cDNA-Sequenz mit der GenEMBL EST-Datenbank ergab mehrere verwandte Sequenzen, die eine Homologie von etwa 65% aufwiesen. Zwei dieser Klone, TS 53996 und TS 71932, konnten über die Universität Washington bezogen und vollständig sequenziert werden. Beide enthielten die gleiche Sequenz in verschiedener Länge und wiesen einen offenen Leserahmen mit einer Identität von 57% zur *H-REV107*-Sequenz auf. Inzwischen wurde noch eine weitere Sequenz in die EMBL-Datenbank eingegeben, über die jedoch noch wenig bekannt ist. Die *H-REV107*-Genfamilie hat derzeit 3 Mitglieder.

**H-REV107-Proteine**

```
H-REV107-1      ------MRAPIPEPKP-GDLIEIFRPFYRHWAIYVGDGYVVHLAPPSEVAGAGAASVMSA
H-REV107-2/TIG3 ------MASPHQ-EPKPGDLIEIFRLGYEHWALYIGDGYVIHLAPPSEYPGAGSSSVFSV
H-REV107-3/Kato MAFNDCFSLNYPGNPCPGDLIEVFRPGYQHWALYLGDGYVINIAPVDGIP-ASFTSAKSV
                      :      .*  *****: *  * ***:*:*****:::** .  . *. :*. *.

H-REV107-1      LTDKAIVKKELLYDVAGSDKYQVNNKHDDKYSPLPCTKIIQRAEELVGQEVLYKLTSENC
H-REV107-2/TIG3 LSNSAEVKRGRLEDVVGGCCYRVNNSLDHEYQPRPVEVIISSAKEMVGQKMKYSIVSRNC
H-REV107-3/Kato FSSKALVKMQLLKDVVGNDTYRINNKYDETYPPLPVEEIIKRSEFVIGQEVAYNLLVNNC
                ::..* **   *  *.*.  *::**. *. * * *   *:. :: ::**:: *.:   **

H-REV107-1      EHFVNELRYGVARSDQVRDVIIAASVAGMGLAAMRLIGVMFSRNKRQKQ--- 162 aa
H-REV107-2/TIG3 EHFVAQLRYGKSRCKQVEKAKVEVGVAT-ALGILVVAGCSFAIRRYQKKATA 164 aa  57%
H-REV107-3/Kato EHFVTLLRYGEGVSEQANRAISTVEFVTAAVGVFSFLG-LFPKGQRAKYY-- 168 aa  59%
                ****  **** . ..*.  .   . ..   :.   . *  :.  :  :
```

**H-REV107 Proteinfamilie**. Die zwischen den Proteinen stark konservierten Bereiche sind unterlegt. Die Homologie zwischen den verschiedenen Proteinen ist in Prozent wiedergegeben. Identische Aminosäuren sind mit `*`, konservative Austausche mit **:** markiert.

Das ursprünglich identifizierte Ratten-Homolog wird im weiteren als *H-REV107-1*, das neu identifizierte Gen als *H-REV107-2* bezeichnet. Mit Hilfe einer *H-REV107-2*-spezifischen Sonde konnte nachgewiesen werden, daß auch dieses Gen ubiquitär exprimiert wird, allerdings zeigten sich einige Unterschiede zum *H-REV107-1*-Gen. Die ca. 1 kb große *H-REV107-2*-mRNA wurde in den hämatopoetischen Zellen und Organen wie Thymus und Milz stark exprimiert, konnte aber in mRNA aus Gehirn, Pankreas und Testis nicht nachgewiesen werden. Im gleichen Jahr wurde die *H-REV107-2* Sequenz von einer Arbeitsgruppe aus Kalifornien als *RARRES/TIG3* veröffentlicht (72). *H-REV107-2/RARRES/TIG3* wurde in

dieser Arbeit als Retinsäure-induzierbares Gen mit wachstumshemmender Aktivität beschrieben. Damit war ein weiteres *H-REV107* Gen als potentieller Tumor-Suppressor identifiziert.

Das Expressionsmuster des *H-REV107-1*-Gens wurde zunächst in humanen Tumorzellinien untersucht. In 19 von 27 analysierten Tumorzellinien konnte keine *H-REV107-1*-Expression nachgewiesen werden. Wie bereits beim Rattenprotein beobachtet, erwies sich der Nachweis des humanen *H-REV107-1*-Proteins in kultivierten Zellen als schwierig. Obwohl das polyklonale Rattenserum in transient transfizierten COS-Zellen eine spezifische Bande erkennt, ließ sich auch in den positiven Zellinien kein H-REV107-1-Protein nachweisen. Die forcierte Expression von H-REV107-1 in der Hepatomzellinie SkHep-1 ergab eine Reihe von stabilen Zellklonen, welche jedoch nur die mRNA exprimierten. Offenbar kann die Expression von *H-REV107-1* sowohl auf mRNA-Ebene wie auch auf Proteinebene reguliert werden. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Peter Lichter (DKFZ Heidelberg) konnte das *H-REV107-1*-Gen in der Nähe des Centromers auf dem Chromosom 11 lokalisiert werden. Im Rahmen des Humangenomprojektes konnte diese Lokalisation präzisiert werden, das *H-REV107-1*-Gen befindet sich auf Chromosom 11q12-13. *H-REV107-2/RARRES/TIG3* liegt ebenfalls auf Chromosom 11, am Ende des langen Arms auf 11q23 (72).

Nach dem beobachteten Verlust der Expression des *H-REV107-1*-Gens in humanen Tumorzellinien wurde auch die Expression in humanen Tumoren analysiert. Hierfür wurde zunächst ein neuartiger Array verwendet, der 241 cDNA-Pools aus humanen Tumoren und den zugehörigen Normalgeweben enthält (73). Die Hybridisierung dieses Arrays mit einer *H-REV107-1*-spezifischen Sonde ergab wieder eine ubiquitäre Expression in den normalen Geweben, mit dem höchsten Spiegel in Mamma und Niere. Beim Vergleich der jeweiligen Tumor-und Normalpaare zeigte sich, daß *H-REV107-1* in etwa 50% der Tumoren aus Mamma, Lunge und Ovar sowie in 10% der Tumoren aus der Niere deutlich schwächer exprimiert wird (> 2-fach) als in den Normalgeweben. Im Gegensatz dazu ergab sich eine leichte Überexpression in Tumoren aus dem Kolon; in den anderen Geweben (Uterus, Magen, Rektum, Schilddrüse, Prostata) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe festgestellt werden. Die so gewonnen Daten wurden mittels RT-PCR an einer Reihe von Nieren-und Ovarialkarzinomen überprüft. Die Ergebnisse aus der Array-Analyse konnten mit dieser unabhängigen Methode bestätigt werden. Die *H-REV107-1*-spezifischen PCR-Fragmente, die aus den Ovarialkarzinomen amplifiziert werden konnten, wurden

sequenziert. Diese Analyse ergab keine Anhaltspunkte für Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenz von *H-REV107-1*.

Der Mechanismus der *H-REV107-1*-Suppression wurde in immortalen und transformierten Ovarialepithellinien der Ratte und des Menschen untersucht. *H-REV107-1* war ursprünglich als Zielgen der RAS-Signalübertragung in Ratten-Fibroblasten identifiziert worden. In den immortalen Rattenepithelzellen (Rose 199) wird *H-rev107-1* stark exprimiert, in den KRAS-transformierten Rose A2/5 Zellen konnte die Suppression von *H-rev107-1* erneut beobachtet werden. In diesen Zellinien wird durch das aktivierte KRAS-Onkoprotein der RAF/MEK/ERK-Signalweg stark aktiviert. Eine Hemmung dieses mitogenen Signalweges führt zur einer Wachstumshemmung der Zellen und zu einer deutlichen Re-Expression von *H-rev107-1*. Das gleiche Expressionsmuster wurde in der humanen Teratokarzinomzelle PA1 nachgewiesen. Diese Zellen enthalten ein mutiertes *NRAS*-Onkogen, welches für die Aktivierung von RAS-abhängigen Signalwegen verantwortlich ist. Diese Ergebnisse zeigten zum ersten Mal, daß *H-REV107-1* ein Zielgen des mitogenen RAS/RAF/MEK-Signalweges sein kann. Eine Aktivierung dieses Weges wurde in verschiedenen humanen Tumoren, z.B. aus Lunge, Mamma und Ovar, bereits gezeigt (23, 74). In den meisten epithelialen Ovarialkarzinomlinien konnte die Expression von *H-REV107-1* jedoch nicht über diesen Weg beeinflußt werden, so daß ein weiterer Mechanismus der Suppression existieren mußte. Bereits 1994 war eine Aktivierung der *H-rev107*-Expression durch IFNγ in Astrozytomzellen aus Ratten nachgewiesen worden. Experimente mit IFNγ in humanen Ovarialkarzinom-Zellinien zeigten, daß die Expression von *H-REV107-1* mittels IFNγ rekonstituiert werden kann. Interferone können in humanen Zellen eine Vielzahl von Genen positiv oder negativ steuern (75). Ein wichtiger Mediator der Interferon-induzierten Genexpression ist der Interferon regulatory factor-1, IRF-1 (76, 77). Mit Hilfe einer Mauszellinie, welche ein Östrogen-induzierbares Fusionsprotein aus dem Maus IRF-1 und dem humanen Östrogen-Rezeptor exprimiert (78), konnte nachgewiesen werden, daß H-rev107 direkt über IRF-1 induziert werden kann. IRF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der selbst wachstumsinhibitorische Eigenschaften aufweist. Das Gen für *IRF-1* wurde auf Chromosom 5q31.1 lokalisiert und ist in zahlreichen myeloischen Leukämien deletiert (79, 80). In soliden Tumoren ist über die Rolle von IRF-1 und seinen Zielgenen wenig bekannt. Die Analyse der Expression von *IRF-1* und *H-REV107-1* in einer humanen immortalen Ovarialepithel-Zellinie (HOSE) sowie in 5 epithelialen Ovarialkarzinom-Zellinien ergab eine Korrelation der mRNA-Niveaus beider Gene. Insbesondere die immortale Zellinie HOSE exprimiert viel *IRF-1*-und ebenso *H-REV107-1*-mRNA. Die Tumorzellinien hingegen exprimieren deutlich weniger

*IRF-1*- und *H-REV107-1*–mRNA. Werden diese Zellen mit IFNγ inkubiert, wird zunächst *IRF-1* exprimiert und nach 9-12 Stunden auch *H-REV107-1*. In diesen Zellen wurde somit gezeigt, daß die verminderte Expression von IRF-1 in den Tumorzellen, verglichen mit den normalen Zellen, zur Suppression von mindestens einem IRF-1-Zielgen mit wachstumsinhibitorischer Funktion führt. Ob dieser Mechanismus auch für humane Tumoren zutrifft, ist derzeit Gegenstand der Untersuchungen.
Die Induktion der *H-REV107-1*-Expression in humanen Ovarialkarzinomlinien durch IFNγ ist auf mRNA Ebene leicht nachweisbar. Das H-REV107-1-Protein hingegen wird nur schwach induziert. Der Vergleich von Westernblot-und Immunfluoreszenz-Analysen zeigte, daß nur wenige Zellen eine starke H-REV107-1-Expression aufwiesen. Diese Zellen zeigten jedoch eine Kernmorphologie, wie sie für apoptotische Zellen typisch ist. In Zellen, die mit einem H-REV107-1-Expressionsvektor transfiziert waren und nachweisbare Mengen an H-REV107-1-Protein exprimierten, zeigte sich ebenfalls eine deutliche apoptotische Kernmorphologie. Kürzlich konnten wir nachweisen, daß die Menge an H-REV107-1-Protein nach 24-stündiger Inkubation mit Tumornekrosefaktor-alpha (TNFα) deutlich ansteigt. Offenbar wird über TNFα, selbst ein Induktor der Apoptose, das H-REV107-1-Protein entweder produziert oder stabilisiert. Ob und vor allem wie H-REV107-1 selbst in humanen Ovarialkarzinomzellen Apoptose induzieren kann wird derzeit genauer untersucht.

Alle bisher beschriebenen Untersuchungen zum *H-REV107-1*-Gen zeigen, daß die Hemmung seiner Expression eine Rolle in der Entstehung und/oder Progression humaner Tumoren spielt. Die Funktion des H-REV107-1-Proteins ist bislang jedoch völlig unbekannt und seine Proteinsequenz gibt nach wie vor keine Aufschlüsse über mögliche funktionelle Domänen. Um dennoch den Mechanismus der H-REV107-1-vermittelten Tumorsuppression aufzuklären, führen wir derzeit funktionelle Studien mit dem H-REV107-1-Protein durch.
Mit Hilfe des „yeast two hybrid"-Systems (deutsch: Hefe-2-Hybrid-System) konnten Proteine identifiziert werden, die mit H-REV107-1 interagieren, darunter Proteine mit bereits bekannter Funktion in der Wachstumsregulation. Eines der Partner-Proteine, die Phosphatase PP2A, hat eine wichtige Funktion in der Regulation des RAF-Proteins im mitogenen RAS-Signalweg (81, 82, 83). Außerdem wird vermutet, daß PP2A ein negativer Regulator des Zellwachstums ist, und in humanen Tumoren aus Lunge und Kolon wurden Mutationen in einem der Gene, die für eine PP2A Untereinheit kodieren, gefunden (84). Zum Nachweis der in der Hefe identifizierten Interaktion wurden die potentiellen Interaktionspartner in Säugerzellen exprimiert und die Proteinkomplexe mittels Ko-Immunopräzipitation aus den

Zellen isoliert. Im weiteren wird nun die funktionelle Rolle dieser Protein-Protein Interaktionen untersucht.

Die oben beschriebenen Experimente erlauben ausschließlich Aussagen über die Funktion von H-REV107-1 in vitro. Für Untersuchungen in vivo wird derzeit an einer H-rev107-1-defizienten Maus gearbeitet. Dazu wurde zunächst das Maus *H-rev107-1* Gen identifiziert und teilweise sequenziert. Zur Zeit wird ein *H-rev107-1*-Vektor hergestellt, der nach seiner Fertigstellung in embryonale Stammzellen von Mäusen eingebracht und über homologe Rekombination zu einer Zerstörung des *H-rev107-1* Gens in den Maus Embryonen führen soll.

### *4.2.2. H-REV107-2*

Rosen, O., Massenkeil, G., Teutsch, C., Martin, T., Arnold, R., Schäfer, R. and Sers, C. *Induction of the class II tumor suppressor gene H-REV107-2 (TIG3) by ATRA and gamma IFN correlates with growth inhibition of myeloid cell lines*. Abstract: J. Cancer Research and Clinical Oncology 2001, 127: S23; Manuskript in Vorbereitung

Die Analyse des *H-REV107-2* Gens in hämatopoetischen Zellen und Tumoren wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Oliver Rosen, ehem. Klinik für Hämatologie/Onkologie der Charité durchgeführt.

Die Ergebnisse der Northern Blot Analysen von *H-REV107-1* und *–2* hatten einen deutlichen Expressionunterschied der beiden Gene in den hämatopoetischen Organen ergeben. Während *H-REV107-1* hier meist nur schwach oder gar nicht nachweisbar war, konnte ein *H-REV107-2*-spezifisches Transkript in RNA aus peripheren Lymphozyten, aus Milz und Thymus nachgewiesen werden. Die von DiSepio (72) beschriebene Aktivierung der *H-REV107-2*-Genexpression durch Retinsäure veranlaßte uns, eine mögliche Regulation dieses Gens in hämatopoetischen Zellinien und Tumoren zu untersuchen. Retinoide regulieren komplexe physiologische Vorgänge während der Entwicklung von Organismen. Insbesondere ihre starke Differenzierungs-induzierende Wirkung hat den Einsatz von Retinoiden in der Therapie von hämatopoetischen Tumoren begünstigt (85).

Mittels semiquantitativer RT-PCR und Northern Blot Analysen konnte eine schwache Expression beider Gene in den meisten der untersuchten Zellpopulationen aus peripherem Blut nachgewiesen werden. CD34-positive Zellen aus Blut und Knochenmark exprimierten sehr wenig *H-REV107-1* und *–2*, die Expression von *H-REV107-2* konnte in diesen Zellen durch IFNγ stimuliert werden. In weiteren untersuchten Subpopulationen (CD3-, CD19-, CD14-positive) waren ebenfalls beide Gene nachweisbar, jedoch ohne signifikante Reaktion auf IFNγ oder IL-2.

Die Expression von *H-REV107-1* und *–2* wurde auch in 7 hämatopoetischen Tumorzellinien untersucht. Die Zellinien U937, HL60 und NB4 entstammen akuten myeloischen Leukämien, Jurkat und CEM sind aus akuten T-Zell Leukämien abgeleitet, K562 entstammt einer chronisch-myeloischen Leukämie und Raji einem Burkitt (B-Zell)-Lymphom. Während die meisten der untersuchten normalen Zellen beide Gene zwar gering, aber gut nachweisbar exprimieren, können *H-REV107-1* und *-2* spezifische Transkripte nur in CEM nachgewiesen werden. Eine sehr schwache *H-REV107-2* mRNA-Expression findet sich auch in HL60 und

Jurkat. Interssanterweise läßt sich die Expression von H-REV107-2 in allen Zellinien durch IFNγ und ATRA (all trans retinoic acid) deutlich steigern, die Kombination der beiden hat hierbei einen synergistischen Effekt. In den 4 myeloischen Zellinien ist die starke Stimulation der *H-REV107-2* Expression von einer deutlichen Wachstumshemmung der Zellen durch ATRA und/oder IFNγ begleitet.

Expression und Induzierbarkeit von *H-REV107-2* wurden auch in Blut und /oder Knochenmark von Patienten untersucht. In allen 15 Fällen (10 AML, 5 ALL) wurde durch IFNγ alleine oder in Kombination mit ATRA eine Stimulation der Expression erreicht. Die Experimente zeigten, daß kein Verlust des *H-REV107-2* Gens in diesen Tumoren vorliegt, seine Expression hingegen durch differenzierende Agenzien deutlich stimuliert werden kann.

Diese Untersuchungen deuten daraufhin, daß die beiden eng verwandten Klasse II-Tumor-Suppressoren *H-REV107-1* und *H-REV107-2* in hämatopoetischen Geweben und Tumoren klar unterschiedliche Funktionen haben. Obwohl in den meisten untersuchten Zellen beide Gene mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnten, war nur *H-REV107-2* durch IFNγ oder ATRA stimulierbar, die Expression des *H-REV107-1* Gens wird nicht beeinflußt.

Um eine mögliche funktionelle Rolle des *H-REV107-2* Gens in myeloischen Leukämien zu klären, sind weitere Experimente nötig. Wie neuere Arbeiten zeigen, kann ATRA in den NB4 Zellen über eine autokrine/parakrine Schleife Apoptose auslösen (86). Eine mögliche Rolle des *H-REV107-2*-Gens in diesen Prozessen kann jedoch nur über einen gezielten Gentransfer oder eine selektive Hemmung der *H-REV107-2* Expression analysiert werden.

# 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Identifizierung und Analyse von Genexpressionsprofilen in Zellkultur-Modellen und humanen Tumoren hat uns eine Vorstellung von der Komplexität der molekularen Vorgänge, die während der malignen Transformation ablaufen, gegeben. Sowohl im Fibroblasten- wie auch im Epithelzell-basierten System konnte ein große Anzahl von differenziell exprimierten Genen identifiziert werden, die aufgrund der bekannten Funktionen ihrer Genprodukte eine wichtige Rolle im Verlust der Zellzyklus-Kontrolle, der Kontrolle der Signalübertragung, in der Angiogenese-Induktion sowie in der Invasion und damit Metastasierung spielen. Die Zusammenhänge zwischen der Aktivierung bestimmter Signalkaskaden und der Expression von definierten Genmustern hat zum ersten Mal konkrete Hinweise dafür geliefert, warum eine rationale Tumortherapie, die auf der gezielten Blockade solcher Signalwege beruht (87, 88), in Zukunft Erfolg verspricht. Darüber hinaus konnte durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Molekular-und Zellbiologen sowie klinischen Pathologen eine Vielzahl potentieller Tumormarker und Zielgene für therapeutische Intervention im Ovarialkarzinom identifiziert werden. Die Zusammenarbeit mit den Firmen CLONTECH (Palo Alto, USA) und MetaGen (Berlin) führte hier zu einer raschen, genomweiten und kostengünstigen Erfassung aller Gene, da beide Firmen ihre Expertise in der Array Hybridisierung bzw. ihre Kapazität der Sequenzierung zur Verfügung stellten.

Die vorhandenen Daten liefern nun die Grundlage für weitergehende Analysen die zum einen den Nachweis aller interessanten, differenziell exprimierten Gene auf Proteinebene im humanen Gewebe beinhaltet. Zum anderen können die vorhandenen Zellkulturmodelle genutzt werden, um aus einer Vielzahl von Kandidaten potentiell diagnostisch einsetzbare oder therapeutisch relevante Gene durch funktionelle Studien zu erkennen. So hat z.B. die detaillierte Analyse des Caveolin-1-Gens in Ovarialkarzinomen zu der Vermutung geführt, daß die Regulation RAS-abhängiger Signalwege in diesen Tumoren trotz fehlender RAS-Mutationen offenbar signifikant gestört ist. Diese Beobachtungen haben bereits weitere Analysen bezüglich der Signalweg Aktivierungen nach sich gezogen, die diese Vermutung am Tumormaterial bestätigen und diesen Tumortyp für zukünftige Therapien mit Signalblockern interessant werden lassen. Ebenfalls auffällig war die starke und reproduzierbare Überexpression des RAS-abhängigen Transkriptionsfaktors FRA-1 in den Modellsystemen. Dieses Protein wurde bereits in verschiedenen humanen Karzinomen, z.B. aus der Lunge, Mamma sowie bei Kopf-Hals Tumoren, überexprimiert gefunden. FRA-1

könnte für die De-Regulation verschiedener RAS-Zielgene eine entscheidende Rolle spielen und ist daher ein interessantes Ziel zukünftiger therapeutischer Eingriffe.

Diese beiden Beispiele verdeutlichen, daß auf der Basis globaler Genexpressionsanalysen in Zukunft sehr viel spezifischere Möglichkeiten zur Verfügung stehen werden, maligne Eigenschaften von Tumoren zu erkennen und zu beeinflussen. Genexpressionsanalysen liefern aber primär korrelative und nicht kausale Informationen. In den nächsten Jahren wird daher ein großes Maß an Grundlagenforschung zu leisten sein, welche die genauen Funktionen der einzelnen Gene und ihrer Proteine analysieren muss. Wie viele der heute bekannten potentiellen Zielgene als essentielle Faktoren dabei übrigbleiben ist im Augenblick noch nicht absehbar. Diese Arbeiten werden uns jedoch mit Unterstützung bioinformatischer Methoden ein realistischeres Modell der Transkriptomveränderungen in den verschiedenen Phasen der Tumorentwicklung liefern. Heute besteht noch eine erhebliche Diskrepanz zwischen der geringen Anzahl der Mutationen, welche für die Tumorentstehung als notwendig erachtet werden, und der Vielzahl der Tumoreigenschaften und –typen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Klasse II-Gene, reguliert durch eine begrenzte Zahl essentieller Signalwege und Transkriptionsfaktoren, für diese mannigfaltigen Eigenschaften direkt verantwortlich sind.

# 6. Literaturverzeichnis


1. Fearon, E.R. and Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, *61*: 759-767, 1990.

2. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. Cell, *100*: 57-70, 2000.

3. Bos, J.L. Ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res., *49*: 4682-4689, 1989.

4. Eisenman, R.N. and Cooper, J.A. Beating a path to Myc. Nature, *378*: 438-439, 1995.

5. Kerkhoff, E. and Rapp, U.R. Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. Oncogene, *17*: 1457-1462, 1998.

6. Stanbridge, E.J. Human tumor suppressor genes. Annu.Rev.Genet., *24*: 615-657, 1991.

7. Karp, J.E. and Broder, S. Molecular foundations of cancer: New targets for intervention. Nature Medicine, *1*: 309-320, 1995.

8. Simpson, L. and Parsons, R. PTEN: life as a tumor suppressor. Exp.Cell Res., *264*: 29-41, 2001.

9. Di Cristofano, A. and Pandolfi, P.P. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. Cell, *100*: 387-390, 2000.

10. Lee, S.W., Tomasetto, C., and Sager, R. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, *88*: 2825-2829, 1991.

11. Sager, R. Expression genetics in cancer: Shifting the focus from DNA to RNA. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, *94*: 952-955, 1997.

12. Good, D.J., Polverini, P.J., Rastinejad, F., Le Beau, M.M., Lemons, R.S., Frazier, W.A., and Bouck, N.P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., *87*: 6624-6628, 1990.

13. Tolsma, S.S., Volpert, O.V., Good, D.J., Frazier, W.A., Polverini, P.J., and Bouck, N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein

thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. J.Cell.Biochem., *122*: 497-511, 1993.

14. Zou, Z., Anisowicz, A., Hendrix, M.J.C., Thor, A., Neveu, M., Sheng, S., Rafidi, K., Seftor, E., and Sager, R. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. Science, *263*: 526-529, 1994.

15. Malumbres, M. and Pellicer, A. Ras pathways to cell cycle control and cell transformation. Frontiers in Bioscience, *3*: 887-912, 1998.

16. Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., and Der, C.J. Increasing complexity of Ras signaling. Oncogene, *17*: 1395-1413, 1998.

17. Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. Annu.Rev.Biochem., *68*: 913-963, 1999.

18. Polunovsky, V.A., Gingras, A.C., Sonenberg, N., Peterson, M., Tan, A., Rubins, J.B., Manivel, J.C., and Bitterman, P.B. Translational control of the anti-apoptotic function of Ras. J.Biol.Chem, *275*: 24776-24780, 2000.

19. Maruta, H. and Kohama, K. G Proteins, cytoskeleton and cancer. Austin: R.G. Landes, 1998.

20. Nobes, C.D. and Hall, A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell, *81*: 53-62, 1995.

21. Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. and Weinberg, R.A. Creation of human tumour cells with defined genetic elements Nature, *400*: 464-468, 1999.

22. Hunter, T. Oncoprotein networks. Cell, *88*: 333-346, 1997.

23. von Lintig, F.C., Dreilinger, A.D., Varki, N.M., Wallace, A.M., Casteel, D.E., and Boss, G.R. Ras activation in human breast cancer. Breast Cancer Res.Treat., *62*: 51-62, 2000.

24. Amanatullah, D.F., Zafonte, B.T., Albanese, C., Fu, M., Messiers, C., Hassell, J., and Pestell, R.G. Ras regulation of cyclin D1 promoter. Methods Enzymol., *333*: 116-127, 2001.

25. Reddy, K.B., Krueger, J.S., Kondapaka, S.B., and Diglio, C.A. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells. Int.J.Cancer, *82*: 268-273, 1999.

26. Hill, C.S. and Treisman, R. Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity. Cell, *80*: 199-211, 1995.

27. Noda, M. Mechanisms of Reversion. FASEB.J., *7*: 834-846, 1993.

28. Hajnal, A., Klemenz, R., and Schäfer, R. Subtraction cloning of H-Rev107, a gene specifically expressed in H-ras resistant fibroblasts. Oncogene, *9*: 479-490, 1994.

29. Hajnal, A., Klemenz, R., and Schäfer, R. Upregulation of lysyl oxidase in spontaneous revertants of H-ras transformed rat fibroblasts. Cancer Res., *53*: 4670-4675, 1993.

30. Contente, S., Kenyon, K., Rimoldi, D., and Friedman, R.M. Expression of gene rrg is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-Ha-ras. Science, *249*: 796-798, 1990.

31. Schäfer, R. Suppression of ras oncogene-mediated transformation. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, *124*: 29-92, 1994.

32. Griegel, S., Traub, O., Willecke, K., and Schäfer, R. Suppression and re-expression of transformed phenotype in hybrids of Ha-ras1 transformed Rat-1 cells and early passage rat embryo fibroblasts. Int.J.Canc., *38*: 697-705, 1986.

33. Diatchenko, L., Lau, Y.-F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S.A., Lukyanov, K.A., Gurskaya, N.D., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tssue-specific cDNA probes and libraries. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, *93*: 6025-6030, 1996.

34. Zuber, J., Tchernitsa, O.I., Hinzmann, B., Schmitz, A.-C., Grips, M., Hellriegel, M., Sers, C., Rosenthal, A., and Schäfer, R. A genome-wide survey of Ras transformation targets. Nature Genet., *24*: 144-152, 2000.

35. Mok, S.C., Chan, W.Y., Wong, K.K., Cheung, K.K., Lau, C.C., Ng, S.W., Baldini, A., Colitti, C.V., Rock, C.O., and Berkowitz, R.S. DOC-2, a candidate tumor suppressor gene in human epithelial ovarian cancer. Oncogene, *16*: 2381-2387, 1998.

36. Siegel, R.C., Fu, J.C., and Chang, Y. Collagen cross-linking: the substrate specificity of lysyl oxidase. Adv.Exp.Med.Biol., *74*: 438-446, 1976.

37. Siegel, R.C., Pinnell, S.R., and Martin, G.R. Cross-linking of collagen and elastin. Properties of lysyl oxidase. Biochemistry, *9*: 4486-4492, 1970.

38. Tseng, C.P., Ely, B.D., Pong, R.C., Wang, Z., Zhou, J., and Hsieh, J.T. The role of DOC-2/DAB2 protein phosphorylation in the inhibition of AP-1 activity. An underlying mechanism of its tumor-suppressive function in prostate cancer. J.Biol.Chem, *274*: 31981-31986, 1999.

39. Denko, N.C., Giaccia, A.J., Stringer, J.R., and Stambrook, P.J. The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, *91*: 5124-5128, 1994.

40. Liu, H.S., Scrable, H., Villaret, D.B., Lieberman, M.A., and Stambrook, P.J. Control of Ha-ras-mediated mammalian cell transformation by Escherichia coli regulatory elements. Cancer Res., *52*: 983-989, 1992.

41. Sers, C., Tchernitsa, O.I., Zuber, J., Diatchenko, L., Zhumabayeva, B., Desai, S., Htun, S., Hyder, K., Wiechen, K., Agoulnik, A., Scharff, K.M., Siebert, P.D., and Schäfer, R. Gene expression profiling in RAS oncogene-transformed cell lines and insolid tumors using subtractive suppression hybridization and cDNA arrays. Adv.Enzyme Regul., *in press*

42. Szabo, Z., Light, E., Boyd, C.D. and Csiszar K. The human lysyl oxidase-like gene maps between STS mark D15S215 and GHLC.GCT7C09 on chromosome 15. Hum. Genet. 101: 198-200, 1997

43. Filmus, J., Shi, W., and Spencer, T. Role of transforming growth factor alpha (TGF-alpha) in the transformation of ras-transfected rat intestinal epithelial cells. Oncogene, *8*: 1017-1022, 1993.

44. Pironin, M., Clement, G., Benzakour, O., Barritault, D., Lawrence, D., and Vigier, P. Growth in serum-free medium of NIH3T3 cells transformed by the EJ-H-ras oncogene: evidence for multiple autocrine growth factors. Int.J.Cancer, *51*: 980-988, 1992.

45. Schulze, A., Lehmann, K., Jefferies, H.B., McMahon, M., and Downward, J. Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. Genes Dev., *15*: 981-994, 2001.

46. Adams, A.T. and Auersperg, N. A cell line, ROSE 199, derived from normal rat ovarian surface epithelium. Exp.Cell Biol., *53*: 181-188, 1985.

47. Mizushima, S. and Nagata, S. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. Nucleic Acids Res., *18*: 53221990.

48. Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B., and Gray, J.W. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer Nat.Genet., *21*: 99-102, 1999.

49. Jimenez, C., Jones, D.R., Rodriguez-Viciana, P., Gonzalez-Garcia, A., Leonardo, E., Wennstrom, S., von Kobbe, C., Toran, J.L., Borlado, L., Calvo, V., Copin, S.G., Albar, J.P., Gaspar, M.L., Diez, E., Marcos, M.A., Downward, J., Martinez, A., Merida, I., and Carrera, A.C. Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. EMBO J., *17*: 743-753, 1998.

50. Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev., *13*: 2905-2927, 1999.

51. Zimmermann, S. and Moelling, K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). Science, *286*: 1741-1744, 1999.

52. Du, K. and Montminy, M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. J.Biol.Chem, *273*: 32377-32379, 1998.

53. Shaulian, E. and Karin, M. AP-1 in cell proliferation and survival. Oncogene, *20*: 2390-2400, 2001.

54. Abdollahi, A., Bao, R., and Hamilton, T.C. LOT1 is a growth suppressor gene down-regulated by the epidermal growth factor receptor ligands and encodes a nuclear zinc-finger protein. Oncogene, *18*: 6477-6487, 1999.

55. Mok, S.C., Chan, W.Y., Wong, K., Muta, M.G., and Berkowitz, R.S. SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. Oncogene, *12*: 1895-1901, 1996.

56. Zhumabayeva, B., Diatchenko, L., Chenchik, A., and Siebert, P.D. Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors. BioTechniques, *30*: 158-163, 2001.

57. Muller-Pillasch, F., Wallrapp, C., Bartels, K., Varga, G., Friess, H., Buchler, M., Adler, G., and Gress, T.M. Cloning of a new Kunitz-type protease inhibitor with a putative transmembrane domain overexpressed in pancreatic cancer. Biochim.Biophys.Acta, *1395*: 88-95, 1998.

58. Hough, C.D., Cho, K.R., Zonderman, A.B., Schwartz, D.R., and Morin, P.J. Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. Cancer Res., *61*: 3869-3876, 2001.

59. Wilson, M.R. and Easterbrook-Smith, S.B. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. Trends.Biochem.Sci., *25*: 95-98, 2000.

60. Anderson, R.G. The caveolae membrane system. Annu.Rev.Biochem., *67*: 199-225, 1998.

61. Smart, E.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Engelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T., and Lisanti, M.P. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. Mol.Cell Biol., *19*: 7289-7304, 1999.

62. Parton, R.G. and Hancock, J.F. Caveolin and Ras function. Methods Enzymol., *333*: 172-183, 2001.

63. Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J.F., and Parton, R.G. Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras

function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. Nat.Cell Biol., *1*: 98-105, 1999.

64. Koike, M., Takeuchi, S., Park, S., Hatta, Y., Yokota, J., Tsuruoka, N., and Koeffler, H.P. Ovarian cancer: loss of heterozygosity frequently occurs in the ATM gene, but structural alterations do not occur in this gene. Oncology, *56*: 160-163, 1999.

65. Zenklusen, J.C., Thompson, J.C., Troncoso, P., Kagan, J., and Conti, C.J. Loss of heterozygosity in human primary prostate carcinomas: a possible tumor suppressor gene at 7q31.1. Cancer Res., *54*: 6370-6373, 1994.

66. Nishizuka, S., Tamura, G., Terashima, M., and Satodate, R. Commonly deleted region on the long arm of chromosome 7 in differentiated adenocarcinoma of the stomach. Br.J.Cancer, *76*: 1567-1571, 1997.

67. Shridhar, V., Sun, Q.C., Miller, O.J., Kalemkerian, G.P., Petros, J., and Smith, D.I. Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas. Oncogene, *15*: 2727-2733, 1997.

68. Hurlstone, A.F., Reid, G., Reeves, J.R., Fraser, J., Strathdee, G., Rahilly, M., Parkinson, E.K., and Black, D.M. Analysis of the CAVEOLIN-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines. Oncogene, *18*: 1881-1890, 1999.

69. Engelman, J.A., Zhang, X.L., and Lisanti, M.P. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. FEBS Lett., *448*: 221-230, 1999.

70. Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J.A., Watanabe, G., Burk, R., Pestell, R.G., and Lisanti, M.P. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. EMBO J., *17*: 6633-6648, 1998.

71. Andres, A.-C., Schönenberger, C.-A., Groner, B., Henninghausen, L., LeMeurs, M., and Gerlinger, P. Ha-ras oncogene expression directed by a milk protein gene

promoter: tissue specificity, hormonal regulation, and tumor induction in transgenic mice. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, *84*: 1299-1303, 1987.

72. DiSepio, D., Ghosn, C., Eckert, R.L., Deucher, A., Robinson, N., Duvic, M., Chandraratna, R.A., and Nagpal, S. Identification and characterization of a retinoid-induced class II tumor suppressor/growth regulatory gene. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., *95*: 14811-14815, 1998.

73. Zhumabayeva, B. and Adhikari, P. Cancer Profiling array: a new approach for evaluation of differential gene expression in various cancer tissues. Clontechniques *16*, 27-28, 2001.

74. Patton, S.E., Martin, M.L., Nelsen, L.L., Fang, X., Mills, G.B., Bast-RC, J., and Ostrowski, M.C. Activation of the ras-mitogen-activated protein kinase pathway and phosphorylation of ets-2 at position threonine 72 in human ovarian cancer cell lines. Cancer Res., *58*: 2253-2259, 1998.

75. Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., and Silverman, R.H. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, *95*: 15623-15628, 1998.

76. Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., and Taniguchi, T. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. Cell, *54*: 903-913, 1988.

77. Tanaka, N. and Taniguchi, T. The interferon regulatory factors and oncogenesis. Semin.Cancer Biol., *10*: 73-81, 2000.

78. Kirchhoff, S., Schaper, F., and Hauser, H. Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) mediates cell growth inhibition by transactivation of downstream target genes. Nucleic.Acids.Res., *21*: 2881-2889, 1993.

79. Green, W.B., Slovak, M.L., Chen, I.M., Pallavicini, M., Hecht, J.L., and Willman, C.L. Lack of IRF-1 expression in acute promyelocytic leukemia and in a subset of acute myeloid leukemias with del(5)(q31). Leukemia, *12*: 1960-1971, 1999.

80. Willman, C.L., Sever, C.E., Pallavicini, M.G., Harada, H., Tanaka, N., Slovak, M.L., Yamamoto, H., Harada, K., Meeker, T.C., List, A.F., and Taniguchi, T. Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preneoplastic myelodysplasia. Science, *259*: 968-970, 1993.

81. Janssens, V. and Goris, J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem.J., *353*: 417-439, 2001.

82. Sontag, E. Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. Cell Signal., *13*: 7-16, 2001.

83. Abraham, D., Podar, K., Pacher, M., Kubicek, M., Welzel, N., Hemmings, B.A., Dilworth, S.M., Mischak, H., Kolch, W., and Baccarini, M. Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. J.Biol.Chem, *275*: 22300-22304, 2000.

84. Ruediger, R., Pham, H.T., and Walter, G. Disruption of protein phosphatase 2A subunit interaction in human cancers with mutations in the A alpha subunit gene. Oncogene, *20*: 10-15, 2001.

85. Chelbi-Alix, M.K. and Pelicano, L. Retinoic acid and interferon signaling cross talk in normal and RA- resistant APL cells. Leukemia, *13*: 1167-1174, 1999.

86. Altucci, L., Rossin, A., Raffelsberger, W., Reitmair, A., Chomienne, C., and Gronemeyer, H. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. Nat.Med., *7*: 680-686, 2001.

87. Sebolt-Leopold, J.S. Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. Oncogene, *19*: 6594-6599, 2000.

88. Adjei, A.A. Blocking oncogenic RAS signaling for Cancer therapy. J. Natl. Cancer Inst., *93*: 1062-1074, 2001

# 7. GLOSSAR

*5-Aza-2'Desoxycytidin*
Cytosin Analog, das anstelle des normalen Cytosins während der Replikation in die DNA eingebaut wird und nicht methyliert werden kann (→DNA Methylierung)

*cDNA*
„complementary" oder „copy" DNA. DNA, die mit Hilfe reverser Transkriptase anhand einer mRNA synthetisiert wurde

*Chaperon Protein*
Protein, welches andere Proteine in einer bestimmten Konformation erkennt und die Änderung dieser Konformation unterstützt.

*DNA Methylierung*
Epigenetische Modifikation der DNA, die durch das Anhängen einer Methyl-Gruppe (CH3) an die 5' Position des Cytosins entsteht.

*EST*
"expressed sequence tag"; Teilsequenz einer spezifischen cDNA, die einer bestimmten mRNA eindeutig zugeordnet werden kann (→cDNA)

*Forkhead Transkriptionsfaktor*
Mitglied einer Familie von nukleären Proteinen, die an DNA binden und dort die Transkription regulieren.

Gene

**AKT**
Homolog des viralen v-akt Gens. Es kodiert für eine Serin/Threonin Protein Kinase, auch als Protein Kinase B (PKB) bezeichnet.

**AP-1**
„Activating protein 1". Nukleärer Transkriptionsfaktor bestehend aus je einem Mitglied der FOS (→FOS) und JUN (→JUN) Familie. Aktivierung durch Wachstumsfaktoren, Stress oder Zytokine während der Zellteilung und Tumorentstehung

**CREB**
„cAMP response element binding" Protein. Nukleärer Transkriptionsfaktor aus der Familie der basischen Leucin-Zipper Familie.

**EGR-1**
„Early growth response gene 1". Nukleärer Transkriptionsfaktor aus der Familie der Zink-Finger Proteine

**EFα**
Elongationsfaktor alpha.

**EGF**

„Epidermal growth factor“. Wachstumsfaktor, der das Wachstum verschiedener epithelialer Zellen und Gewebe fördert.

**ERK**

„Extracellular signal regulated kinase“. Zytoplasmatische Kinasen (ERK1, 2), die durch MEK (→MEK) phosphoryliert werden, in den Zellkern translozieren und dort Transkriptionsfaktoren aktivieren können.

**ETS**

Familie von nukleären Transkriptionsfaktoren, die durch eine definierte Proteindomäne (ETS-Domäne) charakterisiert sind. Können über RAS-abhängige Signalwege aktiviert werden.

**FOS**

Nukleäres Phosphoprotein, das kovalente Bindungen mit den Mitgliedern der JUN (→JUN) Familie eingeht, um den Transkriptionsfaktor AP-1 (→AP-1) zu bilden.

**GRB2**

„Growth factor receptor bound protein 2“. Zytoplasmatisches Adapter Protein,s das an Phosphotyrosine von aktivierten Wachstumsfaktor Rezeptoren bindet.

**IRF-1**

„Interferon regulatory factor-1“. Nukleärer Transkriptionsfaktor, aktiviert durch Interferone.

**JUN**

Nukleäres Protein, das kovalente Bindungen mit den Mitgliedern der FOS (→FOS) Familie eingeht, um den Transkriptionsfaktor AP-1 (→AP-1) zu bilden. Wird durch mitogene Signale und Strahlung rasch aktiviert.

**KOP**

„Kunitz-type protease inhibitor“. Protease Inhibitor mit bislang unbekannter Funktion

**LOX**

„Lysyl Oxydase“. Extrazelluläres, Kupfer-abhängiges Enzym, welches durch oxidative De-Aminierung von Lysinen zur Vernetzung von Kollagen -und Elastin -Fasern führt.

**LOXL**

„Lysyl oxydase-like protein-1“. Mitglied der Lysyl Oxidase Familie.

**LOXL2**

„Lysyl oxydase-like protein-2“. Mitglied der Lysyl Oxidase Familie.

**MEK**

„MAP/ERK Kinase“ (→ERK). Zytoplasmatische Serine/Threonin Kinase, phosphoryliert durch die RAF Kinase (→RAF). Direkter Aktivator der ERK1,2 Kinasen (→ERK).

**MCM3**

„Minichromosome maintenance deficient 3“. Nukleäres Protein, erforderlich für die DNA Replikation.

**MYC**

Zelluläres Homolog des viralen v-myc. Nukleärer Transkriptionsfaktor mit transfomierender Aktivität.

**ODC**

„Ornithin Decarboxylase“. Enzym, welches des ersten, limitierenden Schritt der Polyamin Biosynthese katalysiert. Die Polyamine Spermin und Spermidin sind essentielle Wachstumsfaktoren in teilungsaktiven Zellen.

**P53**

Tumor Suppressor Gen auf Chromosom 17q13.1. Nukleäres Phosphoprotein, dessen Hauptfunktion in der Zellzyklus Kontrolle nach DNA Schäden liegt.

**P16**

Tumor Suppressor Gen auf Chromosom 9p21. Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinasen cdk4/6.

**PTEN**

Tumor Suppressor Gen auf Chromosom 10q23. Phosphatase, die Phospholipide und Phosphoproteine de-phosphoryliert.

**PDGF**

„Platelet-derived growth factor“. Wachstumsfaktor, der bevorzugt das Wachstum von Fibroblasten und glatten Muskelzellen fördert.

**PI3K**

„Phosphatidylinositol-3 Kinase“. Lipid Kinase, die über RAS (→RAS) aktiviert werden kann.

**RAF**

Familie von Serin/Threonin Kinasen, die aktiviert durch RAS, die mitogene Signalübertragung steuern. Aktiviert die MAP/ERK Kinase (→MEK)

**RAS**

Zelluläres Homolog des Ratten Sarcoma Onkogens. Familie mit drei Isoformen, HRAS, KRAS, NRAS. 21 kDa GPD/GTP-bindende Protein an der inneren Zytoplasma Membran lokalisiert. Aktivierung über die Tyrosinkinase-Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (→EGF, PDGF). Aktiviert verschiedene Effektor Proteine, darunter die Serin/Threonin Kinase RAF (→RAF, PI3K).

**RB**

„Retinoblastom Gen“. Tumor Suppressor Gen auf Chromosom 13q14.1. Nucleäres Phosphoprotein, das als Regulator des Zellzyklus fungiert.

**SHC**

Zytoplasmatisches Adapter Protein, das an Phosphotyrosine von aktivierten Wachstumsfaktor Rezeptoren bindet.

**SOS**

Säuger-Homolog des Drosophila Gens „son of sevenless“. Fungiert als GDP-GTP-Austausch-Protein und aktiviert RAS (→RAS)

**SRF**

„Serum response factor“. Nukleärer Transkriptionsfaktor.

**THBS**
„Thrombospondin“. Extrazelluläres Protein mit anti-angiogener Funktion.

**WT1**
„Wilms Tumor Gen“. Tumor Suppressor Gen auf Chromosom 11p13. Nukleäres Protein der Zink-Finger Familie.

**ZFP36**
Nukleärer Transkriptionsfaktor aus der Familie der Zink-Finger Proteine

*Histon Acetylierung*
Anheftung einer Acetyl Gruppe an Lysine im N-terminalen Teil der DNA-assozierten Histone.

*Immortalisierung*
Prozess, bei dem eine Eukarytische Zelle die Fähigkeit erlangt, endlos in Kultur zu wachsen.

*IPTG*
Isopropyl beta-D-thiogalactopyranosid

*Koloniebildungs Assay*
In vivo Assay, der die Fähigkeit von Zellen Kolonien aus Einzelzellen zu bilden analysiert.

*Trichostatin A (TSA)*
Inhibitor der Histon De-Acetylasen. Histon De-Acetlyasen sind Enzyme, die Acetyl- Gruppen vom N-Terminus der Histone entfernen
*„Yeast two hybrid“*
In vivo Assay zur Identifizierung und Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen.

Quellen:

„Molekulare Medizin“

A.E. Kulozik, M.W. Hentze, C. Hagemeier, C.R. Bartram

de Gruyter 2000

„Encyclopedic Reference of Cancer“

M. Schwab

Springer 2001

**Mein Dank gilt...**

allen Mitarbeiter/Innen der Labore Sers und Schäfer.

Ganz besonders Jana Keil, die von Anfang an mit mir alle Startschwierigkeiten gemeistert hat und trotz aller Widrigkeiten wichtige Experimente erfolgreich durchgeführt hat. Oleg Tchernitsa und Johannes Zuber, den „Zwillingen“, die mit einem ausgewachsenen Maß an Verstand und Eigensinn, Unmengen interessanter Gene aus meinen Zellkultur Systemen herausgeholt haben. Conny Gieseler, deren Durchhaltevermögen und Humor uns auch in schwierigsten Zeiten nicht verlassen hat.

Kai Wiechen für die interessante und erfolgreiche Zusammenarbeit der letzten beiden Jahre. Oliver Rosen und Christian Teutsch, deren Neugier und Einsatz entscheidend für die H-REV107-2 Egebnisse in hämatospotischen Zellen und Tumoren verantwortlich ist.

Ebenso Luda Diatchenko, deren Engagement zunächst bei Clontech und inzwischen an der Universität North Carolina mit geholfen hat, die differentielle Genexpression aus den Zellkultur Modellen in die Tumoren erfolgreich zu übertragen. Bei Clontech war es besonders Bakhyt Zhumabayeva, die mir cDNA Arrays zur Verfügung gestellt hat und ohne deren technisches know-how manche Experimente nicht gelungen wären. Dieser Dank gilt auch André Rosenthal, Bernd Hinzmann und Sandra Petermann bei Metagen, die mehr als eine unserer subtraktiven Banken sequenziert haben.

Prof. Manfred Dietel, für die geduldige Unterstützung der letzten Jahre.

Reinhold Schäfer, ohne den diese Arbeit nicht hätte enstehen können!

# 8. Veröffentlichungen

Functional aspects of three molecules associated with metastasis development in human malignant melanoma
Judith P. Johnson, Jürgen M. Lehmann, Barbara G. Stade, Ute Rothbächer, Christine Sers & Gert Riethmüller
*Invasion and Metastasis 9, 338-350 (1989)*

Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains
Christine Sers, Kathrin Kirsch, Ute Rothbächer, Gert Riethmüller & Judith P. Johnson
*Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 8514-8518 (1993)*

The progression-associated antigen MUC18: a unique member of the immunoglobulin superfamily
Judith P.Johnson, Ute Rothbächer & Christine Sers
*Melanoma Research 3, 337-340 (1993)*

MUC18, a melanoma-progression associated molecule, and its potential role in tumor vascularization and hematogenous spread
Christine Sers, Gert Riethmüller & Judith P. Johnson
*Cancer Research 54, 5689-5694 (1994)*

Regulation of MUC18 expression by cAMP and phorbol esters
Margaret M. Rummel, Christine Sers & Judith P. Johnson
*Cancer Research 56, 2218-2223 (1996)*

MUC18, a cell adhesion molecule with a potential role in tumor growth and tumor cell dissemination.
Judith P. Johnson, Margaret M . Rummel, Ute Rothbächer & Christine Sers
*Current Topics in Microbiology and Immunology, 213/1, 95-104 (1996)*

Growth-inhibitory activity and downregulation of the classII tumor-suppressor gene H-rev107 in tumor cell lines and experimental tumors
Christine Sers, Urban Emmenegger, Knut Husmann, Katharina Bucher, Ann-Kathrin Andres & Reinhold Schäfer
*Journal of Cell Biology 136, 935-944 (1997)*

Transcriptional and translational downregulation of H-REV107-1, a tumor suppressor gene located on human chromosome 11q11-13.
Knut Husmann, Christine Sers, Ellen Fietze, Antoaneta Mincheva, Peter Lichter and Reinhold Schäfer
*Oncogene 17, 1305-1312 (1998)*
First authors with equal contribution: Knut Husmann and Christine Sers

Gene expression profiling of fibroblasts resistant towards oncogene-mediated transformation reveals preferential transcription of negative growth regulators.
Oleg I. Tschernitsa, Johannes Zuber, Christine Sers, Roland Brinckmann, Susan K. Britsch, Volker Adams, & Reinhold Schäfer.
*Oncogene 18, 5448-5454 (1999)*

A genome-wide survey of RAS transformation targets.
Joahnnes Zuber, Oleg I. Tschernitsa, Bernd Hinzmann, Anne-Chantal Schmitz, Martin Grips, Martin Hellriegel, Christine Sers, André Rosenthal & Reinhold Schäfer.
*Nat Genetics 24, 144-152 (2000)*

Oncogenic transformation increases the sensitivity for apoptosis induction by inhibitors of macromolecular synthesis
Agnes Schwieger, Jörg Hanusch, Christine Sers, Reinhold Schäfer & Georg Bauer
*International Journal of Oncolology 17, 89-95 (2000)*

Extracting Information from cDNA Arrays
Hanspeter Herzel, Dieter Beule, Szymon Kielbasa, Jan Korbel, Christine Sers, Arif Malik, Holger Eickhoff, Hans Lehrach, Johannes Schuchhardt
*CHAOS 11 (1), 1-10 (2001)*

Down-regulation of Caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas
Kai Wiechen, Christine Sers, Manfred Dietel, Peter M. Schlag and Ulrike Schneider
*American Journal of Pathology 158, 833-839 (2001)*

RAS oncogene expression determines sensitivity for intercellular induction of apoptosis
Agnes Schwieger, Lilian Bauer, Jörg Hanusch, Christine Sers, Reinhold Schäfer and Georg Bauer.
*Carcinogenesis 22, 1385-1392 (2001)*

Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinomas and acts as a candidate tumor suppressor gene
Kai Wiechen, Luda Diatchenko, Alexander Agoulnik, Bakhyt Zhumabayeva, Sejal Desai, Sai Htun, K. Michael Scharff, Karim Hyder, Paul D. Siebert, Manfred Dietel, Reinhold Schäfer and Christine Sers
*American Journal of Pathology 159, 1635-1643 (2001)*

Gene expression profiling in solid tumors and oncogene-transformed cell lines using subtractive suppression hybridization and cDNA arrays
Christine Sers, Luda Diatchenko, Oleg I. Tchernitsa, Johannes Zuber, Kai Wiechen, Alexander Agoulnik, Bakhyt Zhumabayeva, Sejal Desai, Sai Htun, K.Michael Scharff, Karim Hyder, Paul D. Siebert and Reinhold Schäfer
*Adv. Enzyme Reg. 42, 63-82 (2002)*

The classII tumorsuppressor gene H-REV107-1 is a target of interferon-regulatory factor 1 and is involved in IFNγ-induced cell death in human ovarian carinoma cells
Christine Sers, Knut Husmann, Irina Nazarenko, Steffen Reich, Bakhyt Zhumabayeva, Punam Adhikari, Katharina Schroeder, Artur Gontarewicz, and Reinhold Schäfer
*Oncogene 21, 2829-2839 (2002)*

Nitric oxide mediates apoptosis induction selectively in transformed fibroblasts compared to nontransformed fibroblasts
Stefanie Heigold, Christine Sers, Wibke Brechtl, Boris Ivanovas, Reinhold Schäfer and Georg Bauer
*Carcinogenesis 23, 929-941 (2002*

In the presence of bone marrow stromal cells human multiple myeloma cells become independent of the IL-6/gp130/STAT3 pathway
Manik Chatterjee, Dirk Hönemann, Suzanne Lentzsch, Kurt Bommert, Christine Sers, Pia Herrmann, Stephan Mathas, Bernd Dörken and Ralf C. Bargou
*Blood 100, 3311-3318 (2002)*

Immunocytochemistry reveals RANKL expression of myeloma cells
Orhan Sezer, Ulrike Heider, Christian Jakob, Ivana Zavrski, Jan Euker, Kurt Possinger, Christine Sers and Veit Krenn
*Blood 99, 4646-4647 (2002)*

The transcriptional basis of KRAS-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells
Oleg I. Tchernitsa, Christine Sers, Johannes Zuber, Bernd Hinzmann, Martin Grips, Martin Hellriegel, André Rosenthal and Reinhold Schäfer
First authors with equal contribution: Oleg Tchernitsa and Christine Sers
*submitted*

*Buchbeiträge*

cDNA cloning of two closely related melanoma glycoproteins: MUC18, a marker for tumor progression and MUC18rep, a new member of the immunoglobulin superfamily in:
Jürgen M. Lehmann, Christine Sers, Gert Riethmüller and Judith P. Johnson
*Human Tumor Antigens and Specific Tumor Therapy; Alan R. Liss Inc (1989) pages 45-52*

*Molekulare Medizin. Grundlagen, Pathomechanismen, Klinik*
3.9 Signalübertragung (167-168)
Reinhold Schäfer und Christine Sers
Walter de Gruyter 2000

# 9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

- der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,