

4. Diskussion

4.1. *H-REV107-2* / *TIG3*

H-REV107-2 wird in einer Vielzahl von normalen Geweben exprimiert, jedoch nicht in den daraus entstandenen Tumorzelllinien (siehe Punkt 1.3.3.; DiSepio *et al.*, 1998). *H-REV107-2* wurde in der Literatur mehrfach als Klasse II Tumor-Suppressor-Gen beschrieben (DiSepio *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000; Duvic *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wird klar nachgewiesen, dass die *H-REV107-2* mRNA in immortalen Ovarialepithelzellen in Zellkultur exprimiert wird und dass die Expression in vier von sieben Ovarialkarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene supprimiert ist. In mehr als 42% (9 von 21) der mit verschiedenen Methoden untersuchten Ovarialkarzinome zeigte sich ebenfalls eine stark reduzierte *H-REV107-2* Expression. Die Transfektion von A27/80 Ovarialkarzinom-Zellen mit pc*H-REV107-2* führte zu einer signifikanten Wachstumssuppression von mehr als 60%. Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse für eine Tumor-Suppressor-Aktivität von *H-REV107-2* im Ovarialkarzinom, wie sie bereits für andere Gewebe beschrieben wurde (DiSepio *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000; Duvic *et al.*, 2000).

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass die *H-REV107-2* Suppression in etablierten Ovarialkarzinom-Zelllinien reversibel ist und über mindestens zwei verschiedene Wege erfolgt. Das Gen ist in ES-2 Zellen komplett, in CAOv-3 und SK-OV-3 Zellen partiell supprimiert. Diese Suppression ist über die RAS-abhängige RAF/MEK/ERK-Signalkaskade vermittelt. In Anwesenheit des MEK-Inhibitors PD098059 kam es zu einer deutlichen Aktivierung der *H-REV107-2* Expression. Eine solche reversible Suppression ist die Eigenschaft von Klasse II Tumor-Suppressor-Genen (Sager R, 1997). Im Gegensatz dazu ist die vollständige *H-REV107-2* Suppression in den Zelllinien MDAH-2774, PA-1 und A27/80 unabhängig von der RAF/MEK/ERK-Signalkaskade.

RAS-Onkoproteine sind zentrale Mediatoren der Signalübertragung eines breiten Spektrums extrazellulärer Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone und Neurotransmitter. Diese binden an spezifische Zelloberflächen-Rezeptoren (Sato und Kaziro, 1992; Khosravi-Far und Der, 1994) und führen zu einer transienten Aktivierung der RAS-Proteine (Campbell *et al.*, 1998). Aktiviertes, GTP-gebundenes RAS besitzt eine Vielzahl an Effektoren. Zu diesen gehören z.B. Raf, p120-GAP, RalGDS, MEKK, PI-3-Kinase, NF1-GAP, AF-6, PKC ζ und RIN-1 (Hunter, 1997; Campbell *et al.*, 1998). Einen zentralen, gut untersuchten Zweig der vielen verschiedenen, durch aktiviertes RAS vermittelten Signalwege stellt die mitogene

RAF/MEK/ERK-Kaskade dar. Über sie wird auch die *H-REV107-2* Expression in Ovarialkarzinom-Zelllinien teilweise reguliert (diese Arbeit). Sie ist neben den MAP-Kinase-Signalkaskaden (mitogen activated protein kinase), p38 und JNKs (c-Jun-N-terminal kinase) eine von drei Hauptsignalkaskaden. Am Ende dieser Kaskade steht die Translokation von aktiviertem p44^{MAPK}/ERK1 (extracellular signal-regulated kinase) und p42^{MAPK}/ERK 2 (Crews *et al.*, 1992) in den Zellkern. Dort aktivieren ERK1 und ERK2 eine Vielzahl von Substraten, unter anderem den Transkriptionsfaktor Elk-1 (Marais *et al.*, 1993). Dieser trägt in Verbindung mit *c-jun* zur Expressionsstimulation verschiedenster Gene bei. Eine Aktivierung der RAF/MEK/ERK-Kaskade führt zur Stimulation des Zellzyklusses und einer umfassenden Veränderung der Genexpression. Chemische Inhibitoren wie PD098059 oder dominant negative Mutanten von Raf-1 oder MEK können die transformierende Aktivität von RAS beeinflussen (Kolch *et al.*, 1991; Schaap *et al.*, 1993; Cowley *et al.*, 1994; Westwick *et al.*, 1994; Qiu *et al.*, 1995a,b; Khosravi-Far *et al.*, 1995). Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung dieser Signalkaskade in der malignen Transformation. Die RAF/MEK/ERK-Kaskade führt jedoch nicht nur zur Aktivierung der Genexpression, über sie wird auch eine Vielzahl von Genen supprimiert. Über den genauen Mechanismus der RAS-abhängigen Gensuppression ist momentan noch sehr wenig bekannt (Sers *et al.*, 2002). Eine Möglichkeit wäre die Suppression über ID-Proteine (inhibition of DNA binding). ID-Proteine sind Transkriptionsrepressoren, die in die Zelldifferenzierung und die Zellzyklusregulation involviert sind (Sikder *et al.*, 2003). Sie können HRAS-abhängig aktiviert werden (Belletti *et al.*, 2002). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Wechselwirkung zwischen der Proteinkinase B (PKB oder auch Akt) und ERK1/2. PKB wird über den PI-3-Kinase-Signalweg reguliert und ist in der Lage, die Aktivität von ERK zu reduzieren. Das wiederum führt zur Inaktivierung des Transkriptionsfaktors Elk1 und somit zur Suppression der Gentranskription (Galetic *et al.*, 2003). Der RAS-abhängige Transkriptionsfaktor ets-2 war bisher nur als ein Aktivator der Genexpression charakterisiert. Neue Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass ets-2 auch in der Lage ist die Genexpression zu supprimieren. Dies wurde für das bekannte Tumor-Suppressor-Gen BRCA1 nachgewiesen (Baker *et al.*, 2003).

Für die maligne Transformation einer Zelle über RAS-Onkoproteine sind sowohl die Stimulation als auch die Suppression der Genaktivität von gleicher Bedeutung. In letzter Zeit ist es gelungen, eine große Anzahl RAS-abhängiger Gene zu identifizieren. In der ersten genomweiten Analyse RAS-induzierter Veränderungen der Genexpression (Zuber *et al.*, 2000) zeigten HRAS-transformierte Ratten-Fibroblasten eine erhöhte Expression von Genen, die Invasion und Metastasierung beeinflussen. Diese kodieren z.B. für den Laminin-Rezeptor, Mmp-1 (Kollagenase), Mmp-3 (Stromelysin-1), Mmp-10 (Stromelysin-2) und das Cd44 Glycoprotein. In

dieser Analyse konnte auch erstmals gezeigt werden, dass aktiviertes RAS eine große Zahl von Genen, deren Produkte antiproliferative, antiinvasive und antiangiogene Aktivität haben, supprimiert. Darunter finden sich die Klasse II Tumor-Suppressor-Gene Lysyl Oxidase, Thrombospondin-1, Protein Kinase A II und Gas-1 (growth-arrest-specific protein). Durch Blockieren der Schlüsselkaskade RAF/MEK/ERK mit dem MEK-Inhibitor PD098059 konnten 61 Gene identifiziert werden, deren Expression über den RAF/MEK/ERK-Signalweg gesteuert wird. Die Inhibition der Kaskade in RAS-transformierten Zellen führte zur Reexpression von 36 supprimierten Genen und zur Suppression von 25 überexprimierten Genen (Zuber *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse zeigen, dass *H-REV107-2* nur eines aus einer ganzen Reihe von Genen ist, die über die RAF/MEK/ERK-Kaskade supprimiert werden. Vermutlich können auch in Ovarialkarzinom-Zellen noch weitere antiproliferative Gene über diese Kaskade gehemmt werden. Die alleinige Überexpression von *H-REV107-2* in A27/80 Zellen reichte jedoch aus, um deren Koloniewachstum um mehr als 60% zu reduzieren (siehe Punkt 3.3.1.). Trotz dieser deutlichen Wachstumsreduktion war es nicht möglich *H-REV107-2* in diesen Zellen nachzuweisen. Es konnten nur drei mit *pcH-REV107-2* transfizierte A27/80-Klone expandiert werden und in nur einem Klon war der Nachweis von *H-REV107-2* mRNA möglich. Der Nachweis des *H-REV107-2*-Proteins in diesem Klon war zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, da kein entsprechender Antikörper zur Verfügung stand. Dass es sich bei der Analyse der drei Klone nicht einfach um Zellartefakte handelt, zeigt eine spätere Wiederholung dieser Experimente. Im weiteren Verlauf wurde erneut versucht, stabil *H-REV107-2* exprimierende Klone zu erzeugen. Hier gelang es 13 A27/80-Klone zu expandieren. In 12 der Klone war *H-REV107-2* mRNA nachweisbar, aber nur in einem Klon konnte eine schwache *H-REV107-2*-Proteinexpression nachgewiesen werden. Dieser eine Klon hatte im Vergleich zu den anderen Klonen eine sehr geringe Wachstumskapazität (Lotz *et al.*, 2005). Weiterhin zeigte sich, dass der *H-REV107-2*-positive Klon der vorliegenden Arbeit ebenfalls kein Protein exprimiert. Scheinbar wachsen nur die Klone, die kein *H-REV107-2*-Protein exprimieren. Dies würde auch erklären warum es so schwierig ist *H-REV107-2* exprimierende A27/80-Klone zu expandieren. Klone, die das Protein exprimieren, wachsen so langsam oder stellen das Wachstum ein, so dass eine Anzucht nicht möglich ist. Dies unterstreicht einmal mehr die Bedeutung von *H-REV107-2* als negativen Wachstumsregulator in Ovarialepithel-Zellen.

Neben *H-REV107-2* wurde bereits eine Reihe weiterer Gene identifiziert, die in Ovarialkarzinomen supprimiert sind (Sers *et al.*, 2002; Hough *et al.*, 2001). Eines der supprimierten Gene, CAV1 (Caveolin-1), ist ein wichtiger Signalregulator (Wiechen *et al.*, 2001a,b). CAV1 ist in der Lage, die Aktivierung der RAF/MEK/ERK-Kaskade, über die auch

H-REV107-2 supprimiert ist, zu inhibieren (Galbiati *et al.*, 1998). Möglicherweise trägt die Suppression von CAV1 in der Mehrzahl der G2 und G3 Ovarialkarzinome zu einer erhöhten Aktivierung des RAF/MEK/ERK-Signalweges bei und fördert damit indirekt die Suppression von *H-REV107-2*. Der Verlust von CAV1 ist jedoch nur eine von mehreren Möglichkeiten, die in Tumorzellen zur Aktivierung RAS-abhängiger Signalwege und damit zur Suppression von *H-REV107-2* und anderen antiproliferativen Genen führen können.

Etwa 30% aller humanen soliden Tumoren und Leukämien weisen eine aktivierende RAS-Mutation auf (Bos *et al.*, 1989). Aber nur in 2–12% der Ovarialkarzinome konnte eine RAS-Mutation bzw. Amplifikation beobachtet werden (Bast *et al.*, 1992; O'Briant *et al.*, 1992; Berchuck *et al.*, 1993). In normalen Ovarialkarzinom-Zellen beträgt der Anteil an aktivem GTP-gebundenen RAS 12–25%. In acht untersuchten Ovarialkarzinom-Zelllinien steigt dieser Anteil bis auf 62%. Aber nur eine der verwendeten Zelllinien (OVCAR5) besaß eine RAS-Mutation (Patton *et al.*, 1998). Eine erhöhte Aktivität der Signalwege ohne Veränderungen des RAS-Gens kann außer durch CAV1-Verlust auch durch eine Überexpression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie c-ERB2/Her-2 oder EGF verursacht werden, wie es für gynäkologische Tumoren beschrieben wurde (Von Lintig *et al.*, 2000). Der RAS-Signalweg kann zusätzlich durch inaktivierende Mutationen des RAS-Regulatorgens NF-1 GAP, wie im Fall der Neurofibromatose Typ 1, dauerhaft aktiv sein (DeClue *et al.*, 1992). Die Aktivierung der RAF/MEK/ERK-Kaskade führt darüber hinaus zu einem stimulierenden, extrazellulären, autokrinen Loop, ausgelöst durch die Expression von HB-EGF (Schulze *et al.*, 2001). Eine Suppression der Genexpression ist dann entweder direkt über den aktiven RAF/MEK/ERK-Weg oder in Abhängigkeit des extrazellulären, autokrinen Loops möglich (Sers *et al.*, 2002). Über einen solchen Mechanismus wäre es auch möglich, die Genexpression von Nachbarzellen zu beeinflussen, die keine onkogene Aktivierung des RAS-Proteins haben. Welcher der verschiedenen Mechanismen in Ovarialkarzinomen zur Hemmung der *H-REV107-2* Expression führt, muss noch geklärt werden. Neben der RAS-abhängigen RAF/MEK/ERK-Signalkaskade muss es auch noch einen oder mehrere andere Wege geben, über die die Expression von *H-REV107-2* im Ovarialkarzinom reguliert wird. In vier der sieben Ovarialkarzinom-Zelllinien konnte durch den MEK-Inhibitor PD098059 keine Reexpression von *H-REV107-2* erreicht werden. Demzufolge wird *H-REV107-2* in diesen Zellen unabhängig von der RAF/MEK/ERK-Kaskade reguliert.

Für das verwandte Gen *H-REV107-1* konnte eine Aktivierung der Genexpression durch Behandlung mit IFN γ (interferon gamma) in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A27/80 und OVCAR-3 nachgewiesen werden. Es wurde auch gezeigt, dass *H-REV107-1* ein direktes Ziel-

Gen des IRF-1 (interferon-regulatory factor-1) Tumor-Suppressor Proteins ist (Sers *et al.*, 2002). IRFs sind Transkriptionsfaktoren, deren Expression durch IFN γ aktiviert wird. Sie vermitteln durch die Aktivierung der Genexpression IFN γ -abhängige Effekte (Tanaka und Taniguchi, 2000). Die transiente Transfektion von IRF-1 führte in den Zelllinien ES-2 und PA-1 zu einer verstärkten Expression von *H-REV107-1*. In Ovarialkarzinom-Zelllinien wird *H-REV107-1* vermutlich über einen Verlust der Aktivierung von IRF-1 supprimiert (Sers *et al.*, 2002). Möglicherweise trifft das auch für *H-REV107-2* zu. Zur Klärung dieser Frage bedarf es jedoch noch weiterer Experimente.

Die Klasse II Tumor-Suppressor-Funktion eines Genes kann auch über die transkriptionelle Ausschaltung nach Methylierung von CpG-Inseln in der 5' Promotor Region unterdrückt werden. Dieser Mechanismus wurde für viele Tumor-Suppressor-Gene nachgewiesen (Herman *et al.*, 1994; Merlo *et al.*, 1995). Hierzu liegen für *H-REV107-2* bisher noch keine Erkenntnisse vor.

Auf welchem Weg führt *H-REV107-2* zur beobachteten Wachstumshemmung? Kürzlich durchgeführte Untersuchungen konnten zeigen, dass *H-REV107-2* einen Einfluss auf die Apoptose-Induktion und auf die Aktivität der MAP-Kinase-Signalwege ERK, Jnk und p38 hat (Huang *et al.*, 2002). Jnk und p38 spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose-Induktion (Cano *et al.*, 1995; Dhanasekaran *et al.*, 1998; Erhardt *et al.*, 1999; Nagata *et al.*, 1999). In der Zervixkarzinom-Zelllinie HtTA und in der Magenkarzinom-Zelllinie TSGH9201 führte eine ektopische *H-REV107-2* Expression zu einem verminderten Zellwachstum und zu einer erhöhten Anzahl an Zellen mit Apoptosekörperchen. Genauere Analysen konnten in 83% der transfizierten HtTA Zellen und in 47% der TSGH9201 Zellen in situ DNA-Brüche als Indikatoren für Apoptose nachweisen (Huang *et al.*, 2002). Auch für *H-REV107-1* konnte eine Induktion der Apoptose in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A27/80 und OVCAR-3 nachgewiesen werden (Sers *et al.*, 2002).

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *H-REV107-2* in einem Teil der Ovarialkarzinom-Zellen über den RAF/MEK/ERK Signalweg supprimiert wird. *H-REV107-2* ist gleichzeitig ein negativer Regulator dieses Signalweges (Huang *et al.*, 2002). Möglicherweise ist *H-REV107-2* hier in einen negativen Feedback-Loop involviert, der normalerweise die Aktivität von RAF/MEK/ERK kontrolliert. Ein solcher regulierender Loop wurde im Ovarialkarzinom bereits für Caveolin-1 beschrieben (s.o.).

Die Expression von *H-REV107-2* scheint auch bei der Zelldifferenzierung eine Rolle zu spielen. Hinweise darauf findet man in der B-Zell CLL (chronisch lymphatische Leukämie) und in kolorektalen Karzinomen. In normalen B-Zellen kann *H-REV107-2* nachgewiesen werden,

jedoch nicht in B-Zellen von CLL-Proben. In den frühen Stadien der CLL unterscheidet sich die *H-REV107-2* Expression nicht wesentlich von der in normalen B-Zellen. In späteren Stadien (undifferenziertes, unkontrolliertes Wachstum der B-Zellen) kommt es zu einer progressiven und signifikanten Verminderung der Genexpression. Die Suppression von *H-REV107-2* in der CLL ist klar mit einer Progression der Erkrankung verbunden (Casanova *et al.*, 2001). In kolorektalen Karzinomen findet man ein ähnliches Expressionsmuster. In normalen Gewebeproben ließ sich in 94,2% der Fälle eine starke *H-REV107-2* Expression nachweisen, genau so wie in allen untersuchten Adenomen. In den Adenokarzinomen war die Expression abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors. So zeigte sich in 85,4% der gut differenzierten Tumoren eine starke *H-REV107-2* Expression. In den mäßig differenzierten Tumoren konnte in 20,6% der Fälle keine Expression nachgewiesen werden. In den undifferenzierten Adenokarzinomen haben 72,7% kein *H-REV107-2* exprimiert. Die Abhängigkeit der Genexpression vom Differenzierungsgrad zeigte sich auch bei der Untersuchung des angrenzenden Gewebes im Vergleich zu den Tumoren. Bei gut differenzierten Proben zeigten Tumor und angrenzendes Gewebe eine ähnlich starke *H-REV107-2* Expression. Bei den undifferenzierten Proben war die Expression im angrenzenden Gewebe wesentlich stärker als im Tumor (Shyu *et al.*, 2003). Auch das Ergebnis aus der Hybridisierung des Ovarian Tumor Blot (siehe Punkt 3.1.2.) in der vorliegenden Arbeit lässt vermuten, dass *H-REV107-2* im Ovar differenzierungsabhängig exprimiert wird. In den drei schlecht differenzierten Tumoren lässt sich kein *H-REV107-2* nachweisen. Im papillären serösen Zystadenom vom Borderline Typ, einem gut differenzierten Ovarialtumor, zeigt sich hingegen eine genau so starke *H-REV107-2* Expression wie im Normalgewebe. Um den Zusammenhang jedoch wirklich nachweisen zu können, müsste eine wesentlich größere Probenzahl untersucht werden. Differenzierung und Apoptose sind zwei Mechanismen der Anti-Tumor-Aktivität eines Gens. Möglicherweise stimuliert *H-REV107-2* normalerweise die Differenzierung. Eine Überexpression in Tumoren führt jedoch zur Apoptose.

Ein weiterer Hinweis für die Klasse II Tumor-Suppressor-Aktivität von *H-REV107-2* war zu Beginn der Arbeit die chromosomale Lokalisation des Gens. DiSepio *et al.* beschrieb 1998 *H-REV107-2* auf Chromosom 11q23. In der chromosomalen Region 11.q22-q25 besteht eine hohe Inzidenz für LOHs in Ovarialkarzinomen. Hier werden noch unbekannte Tumor-Suppressor-Gene vermutet. Dies war mit ein Grund, die Expression von *H-REV107-2* im Ovarialkarzinom zu untersuchen (siehe Punkt 1.2.1.). Im Rahmen der anschließend durchgeführten Literaturrecherche stellte sich jedoch heraus, dass *H-REV107-2* nicht auf 11q23, sondern auf 11q12 (Auer *et al.*, 2002) lokalisiert ist. Interessanterweise ist in dieser Region auch das als Klasse II Tumor-Suppressor-Gen bekannte *H-REV107-1* lokalisiert (Husmann *et al.*, 1998; siehe

Punkt 1.3.1). Für *H-REVI07-1* konnte nicht nur in Ovarialkarzinom-Zelllinien, sondern auch in Ovarialkarzinomen eine Suppression nachgewiesen werden. Die Hybridisierung des gleichen Cancer Profiling Arrays, wie er in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, zeigte in sieben der 14 Ovarialkarzinome eine deutliche Suppression der *H-REVI07-1* Expression. Die Reexpression des Gens in A27/80 Zellen führte zu einer Verminderung der Koloniebildung um durchschnittlich 50% (Sers *et al.*, 2002). Beide Gene (*107-1*, *107-2*) teilen die Eigenschaft, als negativer Wachstumsregulator zu fungieren. Während *H-REVI07-1* zu IFN γ -abhängiger Wachstumshemmung führt (Sers *et al.*, 2002), verhält sich *H-REVI07-2* in ähnlicher Weise nach Induktion mit Retinsäure (DiSepio *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000). Wie IFN γ spielt auch Retinsäure eine wichtige Rolle in der Regulation der Zell-Differenzierung bzw. Zell-Wachstumskontrolle (Evans und Kaye, 1999; Rohwedel *et al.*, 1999). Diese Eigenschaften haben dazu geführt, dass Retinsäure und IFN γ in der Therapie von bestimmten Leukämien und Ovarialkarzinomen Anwendung finden (Chelbi-Alix und Pelicano, 1999; Windbichler *et al.*, 2000).

Die vielen Gemeinsamkeiten beider Gene wie chromosomale Lokalisation, 65%ige Sequenzhomologie, reversible Suppression über die RAF/MEK/ERK-Kaskade, Wachstumshemmung in Ovarialkarzinom- und anderen Zelllinien, Bedeutung der intrazellulären Lokalisation und die Tatsache, dass beide Gene nach Überexpression zum programmierten Zelltod führen, lassen vermuten, dass beide Proteine ähnliche Funktionen haben. Bisher konnte allerdings nur *H-REVI07-2* als negativer Regulator aller drei MAP-Kinase-Signalwege (ERK, Jnk, p38) nachgewiesen werden (Huang *et al.*, 2002).

4.2. *MUC18 / Mel-CAM*

Eine Vielzahl von Studien hat sich mit der Expression von *MUC18*, insbesondere im malignen Melanom und dessen Metastasen, beschäftigt (siehe Punkt 1.4.2). In diesen Tumoren wurde *MUC18* als Onkogen beschrieben. Im Mammakarzinom scheint es dagegen als Tumor-Suppressor-Gen zu agieren (Shih *et al.*, 1997). Erkenntnisse über die *MUC18* Expression im Ovarialepithel bzw. Ovarialkarzinom lagen bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vor. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zum ersten Mal mit der *MUC18* mRNA-Expression in Ovarialepithel- und Ovarialkarzinom-Zelllinien sowie in Ovarialkarzinomen. *MUC18* wird in normalen Ovarialepithel-Zellen exprimiert. In vier von sieben untersuchten Ovarialkarzinom-Zelllinien war hingegen keine *MUC18* Expression nachweisbar, eine Zelllinie war schwach positiv. Zwei Zelllinien PA1 und CAOv-3 waren positiv (siehe Punkt 3.2.1.). Hier scheint die

Expression von *MUC18* sogar verstärkt. In zwei von drei untersuchten Ovarialkarzinomen zeigte sich ebenfalls eine verminderte *MUC18* Expression im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe (siehe Punkt 3.2.2.). Um allerdings eine fundierte Aussage über den möglichen Verlust von *MUC18* in Tumoren machen zu können, müsste eine wesentlich größere Anzahl von Geweben auf mRNA- und Proteinexpression untersucht werden. Die Transfektion der Zelllinie A27/80 mit pc*MUC18* führte zu einer signifikanten Reduktion des Koloniewachstums um 44,5% im Vergleich zur Kontrolltransfektion. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass *MUC18* auch im Ovarialkarzinom eine Tumor-Suppressor-Aktivität hat, so wie sie bereits für das Mammakarzinom beschrieben wurde (Shih *et al.*, 1997). Dort hat man die *MUC18* Expression im normalen Mammagewebe, in benignen proliferativen epithelialen Läsionen und in primären sowie metastasierten Mammakarzinomen untersucht. Alle Proben aus dem normalen sowie aus dem benignen proliferativen Mammagewebe waren *MUC18* positiv. Aber nur zehn von 57 primären (18%) und zwei von 15 metastasierten (13%) Mammakarzinomen wiesen eine *MUC18* Expression auf. Es besteht also ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression in normalem/benignem proliferativen Mammagewebe und Mammakarzinomen. Diese Ergebnisse wurden in einer Western Blot Analyse bestätigt (Shih *et al.*, 1997). In den untersuchten normalen Mammaepithel-Zelllinien zeigte sich eine *MUC18* Expression, in den untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien hingegen nicht. *In vivo* führen *MUC18*-positive MCF-7 Mammakarzinom-Zellen zu signifikant kleineren Tumoren, die histologisch stärker kohäsiv und weniger infiltrierend wachsen als *MUC18*-negative MCF-7 Zellen. Diese Beobachtung lässt auf eine hemmende Rolle von *MUC18* in der Entwicklung des Mammakarzinoms schließen. Die exakte Funktion des Proteins ist bis jetzt jedoch unklar (Shih *et al.*, 1999).

Shih *et al.* konnten immunhistochemisch keine *MUC18* Expression im Ovarialepithel nachweisen. Durch die Northern Blot Analyse der vorliegenden Arbeit konnte aber eine *MUC18* Expression in der Ovarialepithel-Zelllinie HOSE auf mRNA-Ebene gezeigt werden (siehe Punkt 3.2.1.). Bei dieser Beobachtung könnte es sich um ein Zellkulturartefakt handeln. Das *MUC18* Protein ist sehr stark glykosyliert. Bis zu 35% seines Molekulargewichtes bestehen aus Kohlehydratresten, deren Zusammensetzung zelltypspezifisch ist (Shih *et al.*, 1994). Möglicherweise ist *MUC18* im Ovarialepithel anders glykosyliert und konnte so durch den von Shih *et al.* verwendeten monoklonalen Antikörper nicht nachgewiesen werden. Gegen ein Zellkulturartefakt spricht auch die eindeutige Reduktion des Koloniewachstums (um 44,5%) nach Transfektion von A27/80 Zellen mit pc*MUC18* (siehe Punkt 3.3.2.).

Ob es sich bei *MUC18* im Ovarialkarzinom um einen Klasse I oder Klasse II Tumor-Suppressor-Gen handelt, konnte durch diese Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Die Blockade der

RAF/MEK/ERK-Signalkaskade mit dem MEK-Inhibitor PD098059 und des PI-3-Kinase-Signalweges mit LY294002 führte in keiner der sieben untersuchten Zelllinien zu einer für Klasse II Tumor-Suppressoren typischen reversiblen Suppression der *MUC18* Expression. Über diese Wege wird *MUC18* offenbar nicht reguliert. Ob andere Mechanismen der Gensuppression, wie z.B. Methylierung, für die Hemmung der *MUC18* Expression verantwortlich sind, muss noch weiter untersucht werden. Die chromosomale Lokalisation des *MUC18* Gens auf 11q23.3 (Kuske *et al.*, 1999) ist ein Hinweis auf eine mögliche Funktion als Klasse I Tumor-Suppressor-Gen. Diese Region ist im Ovarialkarzinom sehr häufig von LOHs betroffen (Foulkes *et al.*, 1993; Gabra *et al.*, 1995, 1996; Davis *et al.*, 1996; siehe Punkt 1.2.1.). LOHs auf 11q22-q25 wiederum korrelieren mit einer schlechten Prognose für die Patientinnen (Launonen *et al.*, 1998). Es wäre möglich, dass *MUC18* eines der bisher unbekanntenen Tumor-Suppressor-Gene in dieser Region ist. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse aus einer Studie von Hauptmann *et al.*, in der 47 benigne und maligne epitheliale Ovarialtumoren mittels CGH (comparative genomic hybridization) auf chromosomale Imbalance untersucht wurden (Hauptmann *et al.*, 2002). In keinem der untersuchten Tumoren zeigte sich ein DNA-Verlust auf Chromosom 11. Zusätzlich zu den Ovarialtumoren wurden unter anderem auch die Ovarialkarzinom-Zelllinien SK-OV-3, OVCAR-3 und CAO-3 auf chromosomale Veränderungen untersucht. In der Zelllinie OVCAR-3 konnte ein DNA-Verlust auf 11q21-qter und in CAO-3 auf 11q23-qter nachgewiesen werden (Hauptmann *et al.*, 2002). Beide Zelllinien weisen jedoch eine positive *MUC18* mRNA-Expression auf (siehe Punkt 3.2.1.). In SK-OV-3 Zellen ist *MUC18* mRNA nicht exprimiert. Die CGH-Analyse dieser Zelllinie zeigt aber keine Imbalance auf Chromosom 11. Ein Grund für diese Diskrepanz könnte die relativ geringe Sensitivität der CGH-Analyse sein. Sie ermöglicht es, einen Überblick über mögliche Regionen mit chromosomalen Imbalancen zu gewinnen, trifft aber keine Aussage über einzelne Gene. Somit bleibt der Mechanismus der *MUC18* Hemmung in Ovarialkarzinom-Zelllinien weiter unklar.

Auch der Mechanismus, über den *MUC18* seine wachstumshemmende Wirkung in Ovarialkarzinom-Zelllinien entfaltet, bleibt im Dunkeln. *MUC18* ist ein Zelladhäsionsmolekül (CAM) der Immunglobulin-Superfamilie (Lehmann *et al.*, 1989; Sers *et al.*, 1993). Aber seine Funktion besteht nicht einfach darin, Zellen miteinander zu verbinden, sondern die Aktivierung durch seinen Liganden führt zur Aktivierung eines komplexen intrazellulären Signalweges. Dieser kann über einen Ca^{2+} -Einstrom als „second messenger“ die Zytoskelett-Dynamik beeinflussen. *MUC18* aktiviert die Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) p59^{fyn} und dadurch die Phospholipase $\text{C}\gamma$, die wiederum einen Ca^{2+} -Einstrom aus intrazellulären Speichern und aus dem Extrazellulärraum bewirkt (Anfosso F. *et al.*, 2001). Die Aktivierung von *MUC18* bewirkt

außerdem eine Aktivierung der PTK p125^{FAK} (FAK), ihrem Substrat Paxillin, der PTK Pyk2 und p130^{Cas}. Die Proteine FAK, Paxillin und p130^{Cas} sind Komponenten der Adhäsions-Plaques (Anfosso F. *et al.*, 1998). P130^{Cas} gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die mit FAK assoziiert und an der Zellmigration beteiligt sind (Petch *et al.*, 1995). P130^{Cas} spielt auch eine wichtige Rolle in der Organisation des Zytoskelettes (Nakamura *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 1998). *MUC18* fungiert also nicht nur als ein adhäsives Protein, sondern ist auch ein Signalmolekül, das über einen komplexen Signalweg in die Gestaltung des Zytoskelettes involviert ist. Eine Eigenschaft, die sowohl für Onkogene als auch für Tumor-Suppressor-Gene von Bedeutung ist und die Zellmigration entscheidend beeinflusst.