

Diss ETH No. 13477

**Identification and characterization of proteins involved in tumor
formation and progression**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Florence Astrid Scholl
Dipl. Natw. ETH
born May 24, 1969
citizen of Pieterlen, BE

accepted on the recommendation of
Prof. F. E. Würzler (examiner)
PD Dr. B. W. Schäfer (co-examiner)

2000

2. A) Summary

Cancer is a disease that increasingly plays a predominant role in our society. Despite a large gain of information in cancer biology our knowledge is far from being complete, and treatment options are still very limited. Rhabdomyosarcoma (RMS), a pediatric tumor of skeletal muscle origin, usually has a bad prognosis and tends to metastasize very early. At the molecular level it is known that alterations in two fundamental groups of genes, oncogenes and tumor suppressor genes, are responsible for the onset of cancer in general. To identify novel candidate tumor suppressor genes a subtractive hybridization procedure was previously performed between human myoblasts and the RMS cell line RD. This strategy resulted in the identification of 48 independent cDNAs that are downregulated in the tumor cells, 40% of which were coding for unknown genes. In this work we first extended the investigation to other RMS cell lines, where we found that half of the investigated cDNAs were consistently reduced in all RMS compared to normal cultured myoblasts. Thereafter, one interesting clone coding for an unknown gene, was selected and cloned. It was found to belong to the LIM domain protein family and was called DRAL.

As further selection criteria of unknown genes, we then took advantage of a RD subline expressing a temperature sensitive version of the p53 tumor suppressor protein in which wt p53 functions could be achieved by drop of the temperature, since p53 is mutated in this cell line. Interestingly, it was again DRAL that could specifically be induced by wt p53 in this system. Induction of endogenous DRAL through p53 expression could be confirmed by ionizing radiation treatment of normal myoblasts. Finally, by cloning the promoter of DRAL and partial characterization of the genomic structure, we could identify four potential p53 binding sites, which further strengthens the notion that DRAL is responsive to p53. Surprisingly, attempts to stably express DRAL in several cell lines failed. Hence, transient transfection experiments were performed and revealed an increase in the proportion of apoptotic cells among the DRAL expressing cells, suggesting that overexpression of DRAL can induce apoptosis. To gain insight into mechanisms possibly involved in the role of DRAL, transfection experiments using FLAG-tagged DRAL revealed that DRAL localizes to the cytoplasm, nucleus, as well as focal adhesions. The different subcellular localizations is a typical feature of LIM domain proteins. Hence, it is likely that DRAL interacts with different partner proteins according to its subcellular localization.

As in vitro models for RMS, we established two new RMS cell lines, RUCH-2 and RUCH-3, from primary tumor material. The RUCH-2 cell line, which spontaneously progressed in vitro to a metastatic cell line, was then used to identify potential marker genes for metastatic progression. Changes between early and late cell passages were analyzed by cDNA microarray, which contained 588 known tumor related genes, resulting in 92 genes with altered expression levels. These genes can now be further investigated in primary tumor samples to identify significant markers for tumor progression.

Finally, deregulated expression of the transcription factor PAX3 was previously found in several neoplasms, including RMS and Ewing's sarcoma. We identified an additional PAX3 expressing tumor type, melanoma. Indeed, we detected expression of PAX3 in the majority of the melanomas analyzed both by RT-PCR and in situ hybridization. In addition, specific downregulation of PAX3 expression through antisense oligonucleotide-based treatment in cultured melanomas resulted in apoptosis of PAX3 expressing cell lines, whereas PAX3 negative melanoma lines showed no cell death. Thus, expression of PAX3 in melanomas might be required for tumor survival and expansion, and might represent an ideal target for tumor specific treatment.

In summary, this work describes cloning of DRAL, a potential tumor suppressor gene which is induced by p53, establishment and characterization of the RMS cell line RUCH-2 which showed spontaneous metastatic progression, and discovery of the aberrant expression of PAX3 and its inhibitory function of apoptosis in melanoma.

2. B) Zusammenfassung

Krebs ist eine Krankheit, die in unserer heutigen Gesellschaft eine immer wichtigere Rolle einnimmt. Trotz der Datenflut an biologischen Erkenntnissen über Krebs, ist unser Wissen noch lange nicht vollständig, und Behandlungsmethoden sind bis heute noch sehr limitiert. Das Rhabdomyosarkom (RMS) ist ein pediatischer Tumor muskulären Ursprungs, der schnell metastasiert und eine schlechte Prognose hat. Auf molekularer Ebene ist bekannt, dass Veränderungen in zwei Gruppen von Genen, den Onkogenen und den Tumorsuppressorgenen, die Grundlage zur Krebsentstehung bilden. Um neue potentielle Tumorsuppressorgene zu identifizieren wurde eine subtraktive Hybridisation zwischen humanen Myoblasten und der RMS Zelllinie RD durchgeführt. Diese Strategie führte zur Identifizierung von 48 unabhängigen, "herunter regulierten" cDNAs, wobei 40% dieser cDNAs für unbekannte Gene kodierten. In dieser Arbeit wurde zuerst die Untersuchung auf weitere RMS Zelllinien erweitert, wobei sich bestätigte, dass die Hälfte der analysierten Klone in allen untersuchten RMS vermindert exprimiert werden. Danach wurde ein interessanter, für ein unbekanntes Gen kodierender Klon ausgewählt und kloniert. Dieses Gen kodiert für ein Protein, das zu der LIM-Domänen-Protein-Familie gehört und wurde DRAL benannt.

Ein weiteres Selektionskriterium für unbekannte Gene ist deren Induzierbarkeit durch wt p53. Wir benutzten für diese Untersuchungen eine RD-Subzelllinie, die ein induzierbares, temperatur-sensitives p53 Gen exprimiert (da die RD Zelllinie kein funktionelles p53 Protein hat). Bei Temperaturerniedrigung exprimiert diese Zelllinie ein funktionell normales wt p53 Genprodukt. Interessanterweise konnten wir DRAL als ein neues p53 induzierbares Gen identifizieren. Die Induktion endogener DRAL Expression konnte zusätzlich durch Bestrahlung von humanen Myoblasten bestätigt werden. Schlussendlich konnten wir durch die Klonierung des DRAL-Promoters zeigen, dass vier potentielle p53 Bindungsstellen in der untersuchten Sequenz vorhanden sind. Sämtliche Versuche stabile Zellklone zu erhalten, die DRAL exprimieren, scheiterten in allen benutzten Zelllinien. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurden transiente Transfektionsexperimente durchgeführt. Dabei konnten wir beobachten, dass vornehmlich DRAL exprimierende Zellen apoptierten, woraus man schliessen kann, dass ektopische DRAL Expression Apoptose induziert. Um zusätzliche Erkenntnisse zur Funktion von DRAL zu gewinnen, wurde dessen intrazelluläre Lokalisation untersucht.

Mittels FLAG-markiertem DRAL konnte gezeigt werden, dass DRAL sowohl im Zytoplasma und Zellkern, als auch in den fokalen Adhensionspunkten lokalisiert ist. Das Auftreten unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisationen ist ein typisches Bild von LIM-Domänen-Proteinen. Es ist wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Lokalisationen von DRAL innerhalb der Zelle durch die Interaktion mit anderen Proteinen zustande kommt.

Um Modelle zur Untersuchung von RMS zu haben, wurden zwei neue Zelllinien aus primären RMS Geweben etabliert, RUCH-2 und RUCH-3. Mit Hilfe der RUCH-2 Zelllinie, welche sich *in vitro* spontan zu einer metastasierenden Zelllinie entwickelte, konnten potentielle Markergene für Metastasierung gefunden werden. Veränderte Genexpression zwischen frühen und späten RUCH-2 Passagen wurde anhand eines cDNA Mikroarrays, der 588 bekannte Tumorgene beinhaltet, untersucht. Dieser Assay resultierte in 92 unterschiedlich exprimierten Genen. Um daraus mögliche signifikante Marker für Tumorprogression zu identifizieren, müssen diese Gene in einem weiteren Schritt in primären Tumorgeweben untersucht werden.

Deregulierte Expression des Transkriptionsfaktors PAX3 ist in verschiedenen Tumoren, wie RMS und Ewing's Sarkoma bekannt. Es gelang uns einen neuen Tumortyp zu finden, der PAX3 exprimiert, nämlich Melanome. Durch RT-PCR Analysen als auch durch *in situ* Hybridisationen konnten wir zeigen, dass die Mehrzahl der Melanome PAX3 exprimieren. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass gezielte Verminderung der PAX3 Expression durch anti-sense Oligonukleotide nur die PAX3 positiven Melanome zur Apoptose zwingt aber nicht die PAX3 negativen Melanome. Die Expression von PAX3 scheint somit eine wichtige Rolle für das Überleben und die Expansion von Melanome zu spielen, deshalb könnte PAX3 ein ideales Ziel für tumorspezifische Behandlung bieten.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit DRAL als ein neues potentielles Tumorsuppressorgen kloniert, das durch p53 induzierbar ist, weiter wurde eine RMS Zelllinie etabliert, die sich *in vitro* spontan zu einer metastasierenden Zelllinie entwickelte, und zuletzt konnten wir zeigen, dass Melanoma PAX3 exprimieren, dessen Expression die Zellen vor Apoptose schützt.