

2.6. Studien zur möglichen regulatorischen Interaktion zwischen *APM-1* und *p53*

Das Tumorsuppressor-Gen *p53* codiert für einen sequenzspezifisch DNA-bindenden Transkriptionsfaktor, der in Zellen aktiviert wird, die ionisierender Strahlung, UV-Licht oder anderen DNA-schädigenden Agenzien ausgesetzt werden (Reisman und Loging, 1998). Das Wildtyp-p53-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Zellzyklus-Regulation und scheint die genetische Integrität der Zelle zu überwachen. In dieser Funktion registriert es die verschiedenen Stimuli, die DNA-Schäden bewirken, und reagiert mit der Expressionsinduktion von Genen, die ihrerseits für die Inhibierung der DNA-Synthese oder die Stimulierung von Apoptose zuständig sind (Ko and Prives, 1996; Hansen and Oren, 1997; Levine, 1997). Funktionell inaktivierende Mutationen im *p53*-Gen wurden in mehr als 50 % aller menschlichen Tumoren beobachtet (Levine et al., 1994; Ko and Prives, 1996). Diese Mutationen führen fast immer zu einer Störung der sequenzspezifischen Transaktivierung, was die Hypothese unterstützt, dass diese Funktion essentiell für die Tumorsuppressor-Wirkung von p53 ist. In einer daraufhin erfolgten systematischen Identifizierung p53-regulierter Gene wurde gezeigt, dass p53 die Expression zahlreicher Gene aktiviert, die wichtige Komponenten der neoplastischen Veränderung von Zellen beeinflussen (Yu *et al.*, 1999).

2.6.1. Vergleich von *APM-1*-mRNA und p53-Protein in Tumorzelllinien verschiedener Gewebe

Vor dem Hintergrund der zentralen Position von p53 im Prozess der Kanzerogenese wurde untersucht, ob zwischen *APM-1* und *p53* möglicherweise ein Zusammenhang auf genregulatorischer Ebene besteht. Dazu wurde zunächst die p53-Proteinmenge in Tumorzelllinien bestimmt, in denen das *APM-1*-Expressionsprofil durch Northern-Analyse erstellt worden war. Abbildung 1 zeigt eine repräsentative Auswahl von Western-Analysen zur Detektion von p53. Eine Übersicht des Vorkommens von *APM-1*-mRNA im Vergleich zu p53-Protein in 36 Tumorzelllinien aus 5 verschiedenen Geweben und ektozervikalen Keratinozyten gibt Tabelle 1. Das p53-Protein ist nur in denjenigen Zelllinien nachweisbar, in denen auch *APM-1* exprimiert wird. Eine Ausnahme bildet die Colonkarzinom-Zelllinie CoLo-320, die bei fehlender *APM-1*-Expression p53-positiv ist. Allerdings wird in CoLo-320-Zellen kein funktionell aktives p53 exprimiert (Arita *et al.*, 1997). Der auffällige Befund einer Korrelation zwischen *APM-1*-mRNA und p53-Protein führte zu der Vermutung, dass entweder p53 aktivierend auf die *APM-1*-Expression wirken oder umgekehrt *APM-1* an der Induktion von p53 beteiligt sein könnte.

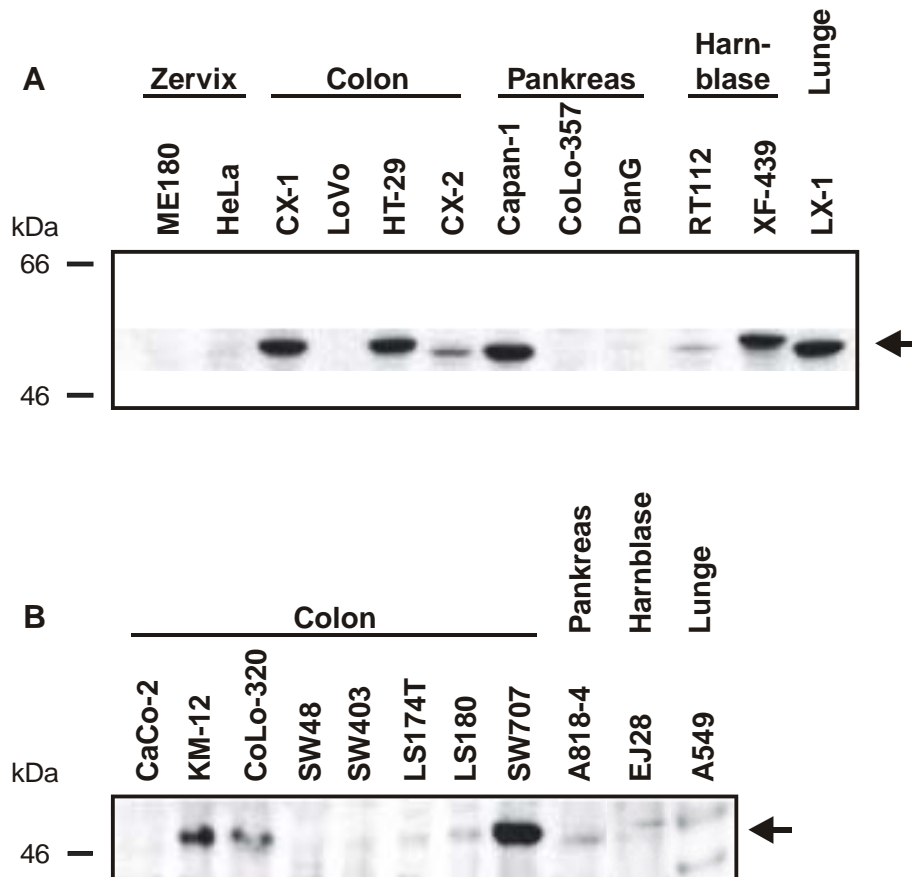


Abbildung 1: Western-Analyse der p53-Proteinmenge in Tumorzelllinien verschiedener Gewebe

Gezeigt ist der Nachweis von p53-Protein in Kernextrakten aus insgesamt zwei Zervix-, zwölf Colon-, vier Pankreas-, drei Harnblasen- und zwei Lungenkarzinomzelllinien. Die Bezeichnungen der Zelllinien und die Gewebebehörigkeit sind angegeben. In zwei unabhängigen Experimenten **A** und **B** wurden je 30 µg Kernprotein in einem 10 %-igen SDS-PAG aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Das p53-Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 53-55 kDa (Pfeil) wurde mit polyklonalem α -p53-Antiserum aus Ratten nachgewiesen. Das Antiserum wurde freundlicherweise von Dr. Hanswalter Zentgraf (DKFZ) zur Verfügung gestellt. Die Größen ausgesuchter Banden des Proteingrößenstandards „Rainbow“ in kDa sind angegeben.

Tabelle 1: Vergleich der Mengen von APM-1-mRNA und p53-Protein in Tumorzelllinien verschiedener Gewebe und in ektozervikalen Keratinozyten

Lfd. Nr.	Zelllinie	Gewebe	APM-1-mRNA ^a (Signalintensität) ^c	p53-Protein ^b (Signalintensität) ^c
1	CX-2	Colon- karzinom	+++	+
2	SW48		++	-
3	HT-29		++	++
4	LoVo		++	-
5	CX-1		++	++
7	SW707		++	++
8	SW403		++	-
9	LS174T		+	-
10	LS180		+	-
11	CXF94		+	-
12	KM-12		+	+
13	HCT116		-	-
14	CaCo-2		-	-
15	SW948		-	-
16	CoLo-320		-	+
17	ME180		Zervix- karzinom	+++ ^d
18	HeLa	-		-
19	C4-II	+		-
20	MRI-H196	+		-
21	Ekto-CxK	Ektozervikale Keratinozyten	+	-
22	A818-4	Pankreas- karzinom	++	+
23	Capan-1		+	++
24	DanG		+	-
25	CoLo-357		+	-
26	LX-1	Lungen- karzinom	++	++
27	LUTCML-54		-	-
28	A549		-	-
29	RPMI 2650		+	+
30	H-Messo-1		-	-
31	H-Messo-1a		-	-
32	H69		+	-
33	XF439	Hamblasen- karzinom	++	++
34	RT112		+	+
35	EJ28		-	-
36	RT4		++	-
37	HBTCPL-1		-	-

^a Northern-Analyse von poly(A)⁺-RNA mit Hybridisierungssonde „G9-POZ“ (0,4 kb, umfasst die für die BTB-Domäne codierende Sequenz des *APM-1*-Gens); Daten zur Verfügung gestellt von E. Schwarz

^b Eigene Daten; ausführliche Beschreibung im Text

^c -: negativ, +: schwach, ++: mittel, +++: stark

^d viral-zelluläres Fusionstranskript unter Kontrolle des HPV68-Promotors

2.6.2. Reporteranalyse zur regulatorischen Beziehung zwischen *APM-1* und *p53*

Mit Hilfe von Reporteranalysen wurde untersucht, ob *p53* einen transaktivierenden Effekt auf die Genexpression von *APM-1* ausübt, oder ob umgekehrt *APM-1* die Regulation der *p53*-Expression beeinflusst. Gleichzeitig wurde die autoregulatorische Eigenschaft von *APM-1* analysiert. Als Reporterkonstrukte für die Analyse der *APM-1*-Regulation wurden pGL3-Basic-p2-s, pGL3-Basic-a31-*PvuII*-s, pGUP.PA-p2-s und pGUP.PA-p2-as eingesetzt (siehe Tabelle 4 A und B). Die Wirksamkeit von *p53* wurde mit Hilfe von pFragA-GUP.PA und p53Con-GUP.PA kontrolliert. Das FragA-Plasmid enthält eine 33 Nucleotide lange authentische *p53*-Bindungssequenz aus dem „ribosomal gene cluster“ (RGC), während in p53Con-GUP.PA eine artifizielle *p53*-Bindungsstelle von ca. 50 Nucleotiden vorliegt. Beide Konstrukte wurden freundlicherweise von Dr. Karin Butz (DKFZ) zur Verfügung gestellt.

Um den Einfluss von *APM-1* auf die *p53*-Transkription analysieren zu können, wurde das Konstrukt p53EP-GUP.PA hergestellt, das ein 994 bp großes genomisches PCR-Fragment aus dem Promotorbereich unmittelbar stromaufwärts des 5'-Endes von *p53* enthält. Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung einer endogenen *PstI*- und einer eingefügten *BglII*-Erkennungssequenz im Rückwärts-Primer mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in pGUP.PA inseriert.

Als Effektorplasmide wurden die Expressionsvektoren pSG5-*APM-1* mit der *APM-1*-cDNA unter Kontrolle des SV40-Promotors/Enhancers, bzw. p53wt mit der Wildtyp-*p53*-cDNA unter Kontrolle des hCMV-Promotors/Enhancers co-transfiziert. Das p53wt-Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Karin Butz (DKFZ) zur Verfügung gestellt.

Die Tabelle 2 A und B zeigen die Ergebnisse zweier repräsentativer Messungen. Nach Co-Transfektion mit p53wt schien sich bei pGL3-Basic-p2-s eine deutliche Aktivierung gegenüber dem allein transfizierten Reporterplasmid abzuzeichnen. Dieser Effekt wurde jedoch offenbar nicht durch die Steigerung der absoluten Luciferase-Aktivität (ALA) hervorgerufen. Vielmehr kam es bei den Transfektionen mit p53wt-Beteiligung aufgrund einer bis zu 10-fachen Senkung der β -Galaktosidase-Aktivität (im Vergleich zu den übrigen Co-Transfektionen) zu einer artifiziellen Erhöhung der relativen Luciferase-Aktivität, welche den Quotienten aus ALA und β -Galaktosidase-Aktivität darstellt. Verursacht wurde dieses Phänomen wahrscheinlich durch eine reprimierende Wirkung von *p53* auf den hCMV-Promotor, der die Transkription des β -Galaktosidase-Gens im Normalisierungsplasmid pCMV-Gal kontrolliert. Mit Ausnahme des Kontrollplasmids pFragA-GUP.PA, das die *p53*-Wirksamkeit bestätigt, zeigen alle übrigen Reporterkonstrukte keine nennenswerte Aktivierung in Gegenwart von p53wt.

Nach Co-Transfektion mit pSG5-APM-1 konnte bei keinem der untersuchten Reporterkonstrukte eine klare Änderung der ALA gegenüber den Reportern ohne Effektor festgestellt werden. Es erfolgt offenbar weder eine Autoregulation der APM-1-Expression noch eine Beeinflussung der p53-Transkriptionskontrolle durch APM-1. Eine Übersicht der gemittelten ALA-Werte aus insgesamt vier Messreihen ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

Anhand der vorliegenden Reporteranalysen ist eine Interaktion zwischen *APM-1* und *p53* durch direkte Beeinflussung der transkriptionellen Regulation eher unwahrscheinlich. Eine Autoregulation von APM-1 war mit dem verwendeten experimentellen System ebenfalls nicht nachzuweisen.

Tabelle 2 A: Analyse transienter Transfektionen zur Bestimmung der Promotor-/Enhancer-Aktivität des p2-Fragments, des a31-*PvuII*-Fragments, von p53-Bindungsstellen und der p53-Kontrollregion nach Co-Transfektion mit pSG5-APM-1 und/oder p53wt

Effektor ^a	Reporter ^b	ALA ^c		β -Gal ^d	
-	pGL3-Basic	1036	963	786	
		889		557	
pSG5-APM-1		1576	1365	359	
		1153		449	
p53wt		598	615	47	
		632		47	
pSG5-APM-1 + p53wt		327	325	42	
		323		51	
-		pGL3-Basic-p2-s	61953	55541	819
			49129		671
pSG5-APM-1			24158	21251	471
			18344		410
p53wt	49548		45916	67	
	42284			63	
pSG5-APM-1 + p53wt	14739		13116	52	
	11493			55	
-	pGL3-Basic-a31- <i>PvuII</i> -s		2255	2013	745
			1771		667
pSG5-APM-1			4769	4472	570
			4175		563
p53wt		749	795	56	
		840		79	
pSG5-APM-1 + p53wt		436	433	42	
		429		46	

Tabelle 2 A: Analyse transienter Transfektionen zur Bestimmung der Promotor-/Enhancer-Aktivität des p2-Fragments, des a31-PvuII-Fragments, von p53-Bindungsstellen und der p53-Kontrollregion nach Co-Transfektion mit pSG5-APM-1 und/oder p53wt (Fortsetzung)

Effektor ^a	Reporter ^b	ALA ^c		β -Gal ^d	
-	p53Con-GUP.PA	10619	11210	561	
		11800		517	
pSG5-APM-1		24717	25847	435	
		26977		447	
p53wt		16569	16206	80	
		15843		76	
pSG5-APM-1 + p53wt		22772	22237	68	
		21702		73	
-		pFragA-GUP.PA	404	366	776
			328		619
pSG5-APM-1			1241	1290	456
			1338		477
p53wt	11669		13410	48	
	15150			60	
pSG5-APM-1 + p53wt	17472		18627	45	
	19781			49	
-	p53EP-GUP.PA		5865	5657	833
			5448		682
pSG5-APM-1			12463	12673	512
			12883		478
p53wt		1364	1530	44	
		1696		51	
pSG5-APM-1 + p53wt		1066	1270	43	
		1474		43	

^a Verwendet wurden je 2,5 μ g pSG5-APM-1 und 100 ng p53wt

^b Verwendet wurden je 3 μ g der angegebenen Reporterplasmide

^c ALA: Absolute Luciferase-Aktivität in Extrakten der in 60 mm-Schalen kultivierten und transfizierten HeLa-Zellen (Ausgangsdichte: $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Schale); in der rechten Spalte ist das gerundete arithmetische Mittel der beiden Parallelansätze in der linken Spalte gezeigt

^d β -Gal: β -Galaktosidase-Aktivität in den Zellextrakten nach Co-Transfektion mit 0,5 μ g pCMV-Gal

Tabelle 2 B: Analyse transienter Transfektionen zur Bestimmung der Promotor-/Enhancer-Aktivität des p2-Fragments nach Co-Transfektion mit pSG5-APM-1 und/oder p53wt

Effektor ^a	Reporter ^b	ALA ^c		β -Gal ^d
-	pGL3-Basic	2412	1827	1320
		1241		918
pSG5-APM-1		2281	1828	861
		1375		631
p53wt		970	867	110
		763		92
pSG5-APM-1 + p53wt		365	295	85
		225		62
-	pGL3-Basic-p2-s	84967	65775	1189
		46583		1150
pSG5-APM-1		34697	27478	962
		20258		779
p53wt		78018	64834	98
		51650		82
pSG5-APM-1 + p53wt		19110	14975	94
		10840		66

Effektor	Reporter	ALA		β -Gal
-	pGUP.PA	4677	4621	745
		4565		634
pSG5-APM-1		4247	3943	481
		3638		517
p53wt		2744	2883	58
		3022		66
pSG5-APM-1 + p53wt		2346	1914	66
		1482		43
-	pGUP.PA-p2-s	20974	18508	975
		16042		785
pSG5-APM-1		12588	10071	578
		7554		384
p53wt		2268	1942	78
		1615		59
pSG5-APM-1 + p53wt		1456	1054	53
		651		30
-	pGUP.PA-p2-as	2059	1791	1165
		1523		829
pSG5-APM-1		5077	4081	603
		3085		393
p53wt		615	483	107
		351		71
pSG5-APM-1 + p53wt		756	581	71
		406		26

^a Verwendet wurden je 2,5 μ g pSG5-APM-1 und 100 ng p53wt

^b Verwendet wurden je 3 μ g der angegebenen Reporterplasmide

^c ALA: Absolute Luciferase-Aktivität in Extrakten der in 60 mm-Schalen kultivierten und transfizierten HeLa-Zellen (Ausgangsdichte: $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Schale); in der rechten Spalte ist das gerundete arithmetische Mittel der beiden Parallelansätze in der linken Spalte gezeigt

^d β -Gal: β -Galaktosidase-Aktivität in den Zellextrakten nach Co-Transfektion mit 0,5 μ g pCMV-Gal

Tabelle 3: Promotor/Enhancer-Aktivität des p2-Fragments, des a31-*PvII*-Fragments, von p53-Bindungsstellen sowie der p53-Kontrollregion in HeLa-Zellen nach Co-Transfektion mit pSG5-APM-1 und/oder p53wt

Reporter	Effektor		Absolute Luciferase-Aktivität					
	pSG5-APM-1	p53wt	Messreihe				Mittelwert ^a	StAbw ^b
			1	2	3	4		
pGL3-Basic	-	-	2625	963	1827	-	1805	831,2
	+	-	4306	1365	1828	-	2500	1581,4
	-	+	1577	615	867	-	1020	498,8
	+	+	1078	325	295	-	566	443,7
pGL3-Basic-p2-s	-	-	103312	55541	40085	65775	66178	26914,0
	+	-	79771	21251	20316	27478	37204	28555,5
	-	+	101779	45916	30551	64834	60770	30725,0
	+	+	23025	13116	8570	14975	14922	6035,2
pGL3-Basic-a31- <i>PvII</i>	-	-	4714	2013	-	-	3364	1909,9
	+	-	15028	4472	-	-	9750	7464,2
	-	+	1935	795	-	-	1365	806,1
	+	+	1753	433	-	-	1093	933,4
pGUP.PA	-	-	-	-	4621	-	4621	
	+	-	-	-	3943	-	3943	
	-	+	-	-	2883	-	2883	
	+	+	-	-	1914	-	1914	
pGUP.PA-p2-s	-	-	-	-	10239	18508	14374	5847,1
	+	-	-	-	7385	10071	8728	1899,3
	-	+	-	-	1510	1942	1726	305,5
	+	+	-	-	923	1054	989	92,6
pGUP.PA-p2-as	-	-	-	-	1153	1791	1472	451,1
	+	-	-	-	3478	4081	3780	426,4
	-	+	-	-	401	483	442	58,0
	+	+	-	-	589	581	585	5,7
p53Con-GUP.PA	-	-	11210	35331	-	-	23271	17056,1
	+	-	25847	113860	-	-	69854	62234,6
	-	+	16206	57515	-	-	36861	29209,9
	+	+	22237	31467	-	-	26852	6526,6
pFragA-GUP.PA	-	-	366	602	-	-	484	166,9
	+	-	1290	1728	-	-	1509	309,7
	-	+	13410	20363	-	-	16887	4916,5
	+	+	18627	39522	-	-	29075	14775,0
p53EP-GUP.PA	-	-	5657	4624	-	-	5141	730,4
	+	-	12673	11013	-	-	11843	1173,8
	-	+	1530	2645	-	-	2088	788,4
	+	+	1270	2761	-	-	2016	1054,3

^a gerundetes arithmetisches Mittel aller Messreihen

^b StAbw: Standardabweichung um die jeweiligen Mittelwerte