

3. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden Untersuchungen zu Mutation, Expression und Regulation des Tumorsuppressor-Kandidaten *APM-1* durchgeführt. *APM-1* wird infolge der Integration von DNA des humanen Papillomvirus Typ 68 (HPV68) in den chromosomalen Genlocus 18q21 in der Zervixkarzinom-Zelllinie ME180 aberrant als Bestandteil viral-zellulärer Hybrid-mRNAs transkribiert (Reuter *et al.*, 1998). Die zellulären *APM-1*-Transkripte bestehen aus identischen proteincodierenden Anteilen und unterschiedlichen 5'-untranslatierten Regionen (UTRs) mit der Bezeichnung p2, a31 und 15C, was für eine separate Transkriptionsinitiation an drei verschiedenen Promotoren spricht (Nazari, 2000). Das *APM-1*-Gen codiert für ein Produkt, das mit seiner N-terminalen BTB-Domäne sowie vier Zinkfingern des *Krüppel*-Typs möglicherweise als Transkriptionsfaktor fungiert (Reuter *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurde zunächst unter Verwendung des Tet-On-Genexpressionssystems versucht, HeLa-Zellen mit induzierbarer *APM-1*-Genexpression zu etablieren. Durch Hybridisierungen von cDNA-Makroarrays mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden aus *APM-1*-exprimierenden Tumorzelllinien oder HeLa Tet-On-Klonen wurde nach potenziellen Zielgenen des vermutlichen Transkriptionsfaktors *APM-1* gesucht. Sequenzanalysen ergaben, dass funktionell inaktivierende Mutationen im proteincodierenden Bereich des *APM-1*-Gens nicht vorkommen. Mit Hilfe von RT-PCR-Analysen wurde gezeigt, dass *APM-1* in Tumorzelllinien und Biopsieproben heterogen exprimiert wird, von drei verschiedenen Promotoren aktiv transkribiert wird und wahrscheinlich durch Methylierung transkriptionell stillgelegt werden kann. Mit transienten Transfektionsstudien und anschließenden Reporteranalysen wurde Promotor- und Enhancer-Aktivität in den genomischen Regulationsbereichen vor den UTRs der Klassen p2 und 31 nachgewiesen. Schließlich wurden Hinweise für eine mögliche regulatorische Beziehung zwischen *APM-1* und dem Tumorsuppressor-Gen *p53* aufgezeigt.

Um einen Zugang zu funktionellen Studien des *APM-1*-Gens zu schaffen, wurde der Versuch unternommen, ein Säugerzell-System mit induzierbarer *APM-1*-Expression zu etablieren. Zur Umsetzung dieses Vorhabens wurde das „Tet-On-Genexpressionssystem“ ausgewählt (Gossen und Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995). Bei den meisten anderen induzierbaren Genexpressionssystemen in Säugerzellen, z. B. solcher, die auf Schwermetallionen, Hitzeschock oder Hormone ansprechen, wurden Durchlässigkeiten im inaktiven Zustand (Mayo *et al.*, 1982; Nouer, 1991) und/oder unspezifische sowie pleiotrope Effekte beobachtet (Lee *et al.*, 1988).

Das Tet-System hat sich mit seinen heterologen, bakteriellen Kontrollelementen hingegen als spezifisch und stringent regulierbar bei hohem Expressionsniveau nach Induktion erwiesen (Gossen *et al.*, 1993; Gossen *et al.*, 1994; Resnitzky *et al.*, 1994; Yin und Schimke, 1995; Yin *et al.*, 1996).

HeLa-Zellklone, die zunächst als induzierbar *APM-1*-exprimierend charakterisiert worden waren, wurden in „Colony Formation Assays“ (CFAs) unter Selektionsbedingungen eingesetzt. Als Ergebnis wurden weder beim Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Zellen, noch zwischen induzierbaren Klonen und einem ausgewählten nicht-induzierbaren Klon Unterschiede in der Kolonienbildung beobachtet. In Folgeuntersuchungen stellte sich heraus, dass nur noch bei einem Zellklon überhaupt *APM-1*-Expression vorhanden war, allerdings bei beträchtlicher Durchlässigkeit im nicht-induzierten Zustand. Laut Herstellerangaben handelt es sich dabei um ein bekanntes Phänomen, dass auch eindeutig charakterisierte, stabile Zelllinien ihre Ansprechbarkeit auf das induzierende Agens verlieren können (Clontech, 1998).

In CFAs nach transienter Transfektion war ein wachstumsinhibierender Effekt des *APM-1*-Gens auf die Zervixkarzinom-Zelllinien HeLa und CaSki gezeigt worden (Vogt, 1997; Reuter *et al.*, 1998). Mit dem induzierbaren System hätte zumindest die Möglichkeit bestehen müssen, einen vergleichbaren Befund zu erzielen. Dies führt zu der Annahme, dass in den HeLa Tet-On Zellklonen keine ausreichend hohe Induktion des *APM-1*-Expressionsniveaus für eine nachweisbare Wirkung auf das klonale Zellwachstum erhalten wurde. Ein weiterer Versuch zur Etablierung eines induzierbaren *APM-1*-Expressionssystems wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht unternommen. Um mehr über die funktionelle Bedeutung des Gens im zellulären Kontext zu erfahren, könnte das Tet-System unter Verwendung alternativer Materialien herangezogen werden. Da HeLa-Zellen keine endogene *APM-1*-Expression aufweisen (siehe Abbildung 17 B), wurden für die Experimente in dieser Arbeit von der Hersteller-Firma vorgefertigte HeLa-Klone als rtTA (reverser Tet-kontrollierter Transaktivator)-exprimierende Zellen eingesetzt. Für weitere Experimente wäre der Einsatz anderer rtTA-exprimierender HeLa-Linien oder das Einführen des rtTA-Gens in andere *APM-1*-negative Zelllinien denkbar. Möglich wäre auch die Verwendung des Tet-Off-Systems, bei dem die Induktion der Genexpression im Gegensatz zum hier verwendeten Tet-On-System durch Entzug des Tetrazyklins bzw. Doxozyklins erfolgt (Gossen und Bujard, 1992).

Das *APM-1*-Genprodukt konnte aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften einer Subfamilie von *Krüppel*-ähnlichen Zinkfinger-Proteinen mit aminoterminaler BTB-Domäne zugeordnet werden (Freemont, 1993; Pengui *et al.*, 1994). BTB (*Broad Complex*, *tramtrack* und *bric-à-brac*) ist eine evolutionär konservierte, hydrophobe Domäne von rund 120 Aminosäuren Länge, die ursprünglich in *Drosophila*-Proteinen identifiziert wurde, welche an der Entwicklungssteuerung beteiligt

sind (Zollman *et al.*, 1994). Außer am N-Terminus von Zinkfinger-Proteinen ist sie auch in Aktin-bindenden und nucleären DNA-bindenden Proteinen zu finden (Albagli *et al.*, 1995). Die BTB-Domäne kann homo- und heterotypische Interaktionen *in vitro* (Bardwell und Treisman, 1994; Cooley und Theurkauf, 1994; Chen *et al.*, 1995) sowie Homomerisierung *in vivo* vermitteln, und Proteine zu gesonderten Substrukturen im Zellkern dirigieren (Dhordain *et al.*, 1995).

Unter den Zinkfinger-Proteinen mit BTB-Domäne befinden sich auch spezifisch DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, wie z. B. der Transkriptionsrepressor BCL-6 oder ZF5, das sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Transkription wirken kann. In beiden Fällen wird die DNA-Bindung durch die Zinkfinger vermittelt, während die BTB-Domäne für die Transkriptionsregulation erforderlich ist (Numoto *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1996; Seyfert *et al.*, 1996; Kaplan und Calame, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von cDNA-Makroarrays untersucht, wie sich eine Überexpression von *APM-1* in Tumorzelllinien auf die Expressionsprofile bestimmter Gene auswirkt. Bei keinem der insgesamt 1176 Gene der Arrays konnte eine signifikante Änderung der mRNA-Mengen gegenüber einer Kontrolle ohne *APM-1*-Expression beobachtet werden. Lediglich eine leichte Verstärkung oder Abschwächung des Expressionsniveaus wurde bei einigen Genen beobachtet (Abbildung 7 und Anhang). Konkrete Schlussfolgerungen im Hinblick auf eine Transkriptionsfaktor-Funktion von *APM-1* oder potenzielle *APM-1*-Zielgene waren aus den Makroarray-Analysen nicht zu ziehen. Dies kann auf verschiedene Weise begründet werden. Am wahrscheinlichsten ist, dass die *APM-1*-Genexpression in keiner der eingesetzten Zelllinien ein ausreichend hohes Niveau erreichte, um genügend Genprodukt für einen sichtbaren Effekt zu liefern. Es besteht auch die Möglichkeit einer negativen Regulation der *APM-1*-Translation durch die langen und GC-reichen 5'-UTRs der *APM-1*-Transkripte (E. Schwarz, unveröffentlichte Daten). Bislang ist jedoch kein geeigneter Anti-*APM-1*-Antikörper vorhanden, um die Proteinmenge in Zellen nachzuweisen. Weiterhin könnte auch die von *APM-1* ausgeübte regulatorische Wirkung so schwache Veränderungen auslösen, dass sie mit dem experimentellen System wie hier verwendet nicht zu registrieren sind. Es ist ebenfalls zu berücksichtigen, dass die ausgesuchten Arrays trotz der großen Zahl aufgetragener cDNAs noch immer ein vergleichsweise kleines Spektrum der Gene abdecken, die unter einem Einfluss von *APM-1* stehen könnten.

Aufgrund seiner Zinkfinger ist es wahrscheinlich, dass *APM-1* sequenzspezifisch an DNA binden kann. Der experimentelle Beweis hierfür wäre durch Identifizierung und Charakterisierung von spezifischen DNA-Bindungssequenzen zu erbringen. Dafür könnte ein „selected and amplified binding site“-Ansatz (Blackwell und Weintraub, 1990) oder eine „random oligonucleotide selection“ (Meyers *et al.*, 1993) verwendet werden. Techniken zum Nachweis spezifischer Protein-DNA-Interaktionen sind z. B. das „DNase I *in vitro* footprinting“ (Galas und Schmitz, 1978), der

„electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) (Garnier und Revzin, 1981) oder Reportergenanalysen mit den klonierten Konsensussequenzen (Alam und Cook, 1990). Die dadurch erhaltenen Informationen würden eine Basis für die Suche nach möglichen *APM-1*-Zielgenen darstellen. Alternativ wäre für diese Fragestellung anstatt Makroarrays auch der Einsatz von DNA-Mikroarrays („DNA chips“) zu erwägen, auf die mittlerweile mehr als 250000 verschiedene Oligonucleotid-Sonden oder 10000 verschiedene cDNAs pro cm² aufgetragen werden können (Bowtell, 1999; Lipshutz *et al.*, 1999). Schließlich könnte auch eine serielle Analyse der Genexpression („serial analysis of gene expression“, SAGE) zur Anwendung kommen. Diese Methode ermöglicht die direkte, quantitative Messung von Genexpression und basiert auf der Isolierung kurzer Sequenzabschnitte („sequence tags“) von einzelnen mRNAs (bzw. ihrer cDNAs) und der seriellen Sequenzierung dieser „tags“ nach Zusammenfügung zu einem langen DNA-Molekül (Velculescu *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 2001).

Genspezifische Transkriptionsfaktoren funktionieren über Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, z. B. Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie (Scheidereit, 1996). Da die BTB-Domäne auch Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann (Albagli *et al.*, 1995; Dhordain *et al.*, 1995), wäre es von besonderem Interesse, Interaktionspartner des APM-1-Proteins zu identifizieren. Als Standard-Ansatz wird zu diesem Zweck häufig ein Verfahren nach dem Prinzip des „two-hybrid“-Systems in Hefe (Fields und Song, 1989) verwendet. Eine weitere Möglichkeit beruht auf der Herstellung von Fusionsproteinen aus APM-1 und einem Affinitäts-Epitop, z. B. Glutathion-*S*-Transferase (Link *et al.*, 1999). Nach Inkubation mit einem Zellkernextrakt kann ein Multiproteinkomplex aus dem Fusionsprotein und unbekanntem Interaktionspartnern durch Affinitätschromatographie aufgereinigt, über ein- oder zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Massenspektrometrie – z. B. mittels MALDI („matrix-assisted laser desorption/ionization, Henzel *et al.*, 1993; Berndt *et al.*, 1999) – analysiert werden. Beide Ansätze werden im Rahmen des Proteom-Projekts zur Funktionsanalyse von Proteinen im Hochdurchsatz-Verfahren durchgeführt (Pandey und Mann, 2000). Für einige BTB-Proteine wurde überdies eine Beteiligung an der Regulation der Chromatin-Organisation gefunden (Albagli *et al.*, 1995). Die BTB-Domäne des sequenzspezifischen Transkriptionsfaktors GAGA aus *Drosophila* wurde beispielsweise mit einer kooperativen DNA-Bindung und der *in-vitro*-Remodellierung von Chromatin assoziiert (Okada und Hirose, 1998; Katsani *et al.*, 1999). Es wäre daher aufschlussreich, zu ermitteln, ob das APM-1-Protein ebenfalls eine Chromatin-verändernde Aktivität besitzt.

Die Suche nach einer allgemeingültigen Definition von Tumorsuppressor-Genen hat sich in letzter Zeit als zunehmend kompliziert erwiesen. Ursprünglich wurden sie als Gene angesehen, bei denen eine Keimbahn-Mutation mit einem erblichen Krebs-Syndrom assoziiert ist

(Knudson, 1971). Inzwischen häufen sich jedoch die Beispiele, bei denen somatische Mutationen das Auftreten und die Geschwindigkeit der Tumor-Progression bei sporadischen Neoplasien beeinflussen, ohne dass eine Verbindung zu erblichen Krebs-Syndromen oder -Prädispositionen hergestellt werden konnte (Macleod, 2000). Beispielsweise führen Mutationen der *BUB*- und *BUBR1*-Gene in colorektalen Tumoren zu chromosomaler Instabilität und Aneuploidie durch Verlust mitotischer Kontrollpunkte (Cahill *et al.*, 1998), jedoch steht keins dieser Gene in Zusammenhang mit irgendeinem bekannten Krebs-Syndrom. Ein zweites Beispiel stellt der Typ II TGF- β -Rezeptor dar, welcher in Colonkarzinomzellen mutiert ist als Folge einer erhöhten Mikrosatelliten-Instabilität in Verbindung mit erblichem nicht-polypösem Colorektal-Krebs („hereditary non-polyposis colorectal cancer“, HNPCC) (Markowitz *et al.*, 1995). Auch andere Gene des TGF- β -Signaltransduktionsweges, wie z.B. *DPC4* („deleted in pancreatic carcinoma locus 4“) fungieren eindeutig als *bona fide* Tumorsuppressor-Gene (Hahn *et al.*, 1996).

Beim Versuch, eine allumfassende Definition von Tumorsuppressor-Genen zu finden, schlugen Haber und Harlow (1997) vor, dass funktionelle Zuordnungen vermieden werden sollten, und es sich bei Tumorsuppressor-Genen um Gene handelt, die im Verlauf der Tumorentwicklung Mutationen erleiden, welche zum Verlust der Funktion führen. Selbst der Nachweis einer reduzierten Expression in Tumoren oder der Fähigkeit zur Unterdrückung der Zellproliferation sollten nicht als ausreichend interpretiert werden, ein Gen als Tumorsuppressor zu bezeichnen, wenn nicht gleichzeitig inaktivierende Mutationen vorliegen. Zu den Genen, die dieses Kriterium erfüllen, gehören *p53* (Lane, 1992), *RB1* (Weinberg, 1992), *APC* (Kinzler und Vogelstein, 1996), *DPC4* (Hahn *et al.*, 1996), *p16^{INK4a}* (Serrano *et al.*, 1996) oder *PTEN* (Lynch *et al.*, 1997).

Der Tumorsuppressor-Kandidat *APM-1* wurde auf die Anwesenheit von Punktmutationen untersucht. Bei Punktmutationen unterscheidet man verschiedene Arten: die „missense“ (Fehlsinn)-Mutation, die in einem Protein resultiert, bei der eine Aminosäure durch eine andere ersetzt wird; die „nonsense“ (Unsinn)-Mutation, bei der ein Sinn-Codon durch ein Stop-Codon ausgetauscht wird, und die zum vorzeitigen Abbruch der Translation führt; oder die „frameshift“-Mutation, bei der es durch Addition oder Deletion einer Base zur Verschiebung des Leserahmens kommt, wodurch die Einführung einer falschen Aminosäure oder eines Stop-Codons bewirkt wird. Ein Basenaustausch an der dritten Position eines Codons führt in der Regel zu einer sogenannten „stillen“ oder „neutralen“ Mutation, bei der die Aminosäuresequenz unverändert bleibt, weil der genetische Code ein „3-Buchstaben-Code“ und degeneriert ist.

Die Suche nach Mutationen in *APM-1* wurde auf die Regionen mit vermutlich wichtigen Funktionen konzentriert, das heißt auf die BTB-Domäne, die saure Domäne und die Zinkfinger-Domäne. Zusammen mit den Analysen, die im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt wurden

(Beyer, 1998), ergab sich ein Befund von nur zwei Punktmutationen im APM-1-ORF von insgesamt 59 Tumorzelllinien aus sechs verschiedenen Geweben (siehe auch Tabelle 1). In beiden Fällen handelt es sich um „stille“ Mutationen, die zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz führen. Die Schlussfolgerung aus diesem Resultat lautet, dass im codierenden Bereich des *APM-1*-Gens Punktmutationen offenbar nicht oder nur selten auftreten, und dass funktionell inaktivierende Mutationen nicht vorzukommen scheinen. Anhand der vorliegenden Daten erfüllt *APM-1* damit nicht das von Haber und Harlow (1997) aufgestellte Basiskriterium eines typischen Tumorsuppressor-Gens.

Arbeiten der letzten Jahre haben jedoch deutlich gemacht, dass die um Allgemeingültigkeit bemühte Tumorsuppressor-Gen-Definition von Haber und Harlow zu kurz greift. Der Funktionsverlust eines Gens kann nämlich auch durch eine beeinträchtigte Regulation der Expression verursacht werden. Für einige Tumorsuppressor-Gene wurde bereits gezeigt, dass *cis*-wirksame Mutationen in Kontrollregionen oder eine Hypermethylierung des Promotors die Transkriptionsregulation stören können (Counts und Goodman, 1995; Baylin, 1997). Vor allem dem epigenetischen Ereignis der DNA-Hypermethylierung wird eine zunehmende Bedeutung für die Karzinogenese im allgemeinen, und (alternativ zu Mutationen) für die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen im besonderen beigemessen (Baylin und Herman, 2000; Herman und Baylin, 2000; Momparler und Bovenzi, 2000; Robertson und Jones, 2000; Robertson und Wolffe, 2000; Warncke und Bestor, 2000).

Der Verlust oder die Reduktion der Expression in Tumorzellen ist also ein Charakteristikum von Tumorsuppressor-Genen (Hanahan und Weinberg, 2000). Northern-Analysen zeigten heterogene Expressionsniveaus des *APM-1*-Gens in Tumorzelllinien von Karzinomen der Zervix (Gebärmutterhals), des Colons (Darm), der Pankreas (Bauchspeicheldrüse), der Lunge und der Harnblase (Reuter *et al.*, 1998; E. Schwarz, unveröffentlichte Daten). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine reduzierte Genexpression auch für den Tumorsuppressor-Kandidaten *APM-1* charakteristisch sein könnte. Einen möglichen Mechanismus zur Stilllegung der *APM-1*-Genexpression könnte die *de novo*-Methylierung von Cytosinresten in den Promotorregionen darstellen. Darauf deuten in dieser Doktorarbeit durchgeführte Pilotexperimente hin (Abbildung 23 und 24). Um diese Vermutung zu erhärten, sind jedoch weitere RT-PCR-Analysen mit einer größeren Zahl *APM-1*-negativer Tumorzelllinien nach Behandlung mit dem Methylierungsinhibitor 5-Aza-2'-desoxycytidin durchzuführen. Gleichzeitig sollte das Hypermethylierungsmuster in den *APM-1*-Promotorregionen dieser Zelllinien z. B. durch Methylierungs-spezifische PCR nach Bisulfit-Behandlung (Herman *et al.*, 1996) bestimmt werden.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die *APM-1*-Genexpression in 47 verschiedenen Tumorzelllinien aus Karzinomen des Darms, des Gebärmutterhalses, der Lunge, der Bauchspeicheldrüse, der Harnblase und der Niere, in normalen Keratinozyten und primären Fibroblasten sowie in 106 Biopsieproben aus Leukozyten, Normal- und Tumorgewebe des Hals-Nasen-Ohren (HNO)-Bereichs, Nierenkarzinomen und Gehirntumoren durch Exon 2/3-spezifische RT-PCR-Analyse untersucht. In den Tumorzelllinien ist die *APM-1*-Expression häufig reduziert oder gar nicht vorhanden, während der Nachweis eines starken Signals bei den ektozervikalen Keratinozyten darauf hin deutet, dass in normalen Zellen *APM-1*-mRNA produziert wird (Abbildung 17 A bis F). Damit sind die RT-PCR-Ergebnisse mit denen der Northern-Analysen qualitativ vergleichbar. Am Beispiel von Colonkarzinom-Zelllinien (Abbildung 16) macht der Vergleich jedoch ebenso deutlich, dass die hier durchgeführten RT-PCR-Analysen im Gegensatz zu Northern-Analysen keine quantitativen Aussagen über das Expressionsniveau erlauben.

Für die Analyse von Biopsieproben stand unbehandeltes und mikrodissektiertes Material zur Verfügung. In Leukozyten scheint *APM-1* generell nicht exprimiert zu werden (Abbildung 18). Bei den nicht-mikrodissektierten Proben wurde in allen untersuchten Epithelien, das heißt sowohl in Normal- als auch in Tumorgewebe Exon 2/3-spezifisches RT-PCR-Produkt nachgewiesen (Abbildung 19 bis 21 und 22 A). Die Proben aus mikrodissektiertem Tumormaterial weisen hingegen reduzierte und in fast 60 % der Fälle keine *APM-1*-Expression auf (Abbildung 20). Der auffällige Unterschied lässt vermuten, dass alle unbehandelten Tumorbiopsien mit einem mehr oder weniger großen Anteil Normalgewebe vermischt sind.

Verdeutlicht wird dies durch die Unterschiede in den RT-PCR-Ergebnissen von Biopsiematerial und Karzinom-Zelllinien aus Nierengewebe (Abbildung 22 A und B). Während die Resultate der Zelllinien darauf hinweisen, dass die *APM-1*-Expression in Nierentumoren häufig abgeschaltet ist, könnte der Nachweis von *APM-1*-Transkripten in allen Tumorproben durch eine Vermischung von Tumor- mit Normalgewebe verursacht worden sein. Alternativ wäre der Befund auch mit einer Stilllegung der *APM-1*-Expression im Verlauf der Zelllinien-Etablierung aus *APM-1*-positiven Nierenkarzinomen zu erklären. Gegen diese Alternative sprechen jedoch beispielsweise die Resultate einer groß angelegten Studie, bei der die Expressions-Muster von mindestens 45000 verschiedenen Genen mit mehr als 300000 Transkripten in Gastrointestinal-Tumoren untersucht wurden (Zhang *et al.*, 1997). Ein Ergebnis dieser Studie war, dass viele der Genexpressions-Unterschiede zwischen normalen und Tumor-Zellen *in vivo* während der *in-vitro*-Kultivierung von Zelllinien erhalten bleiben. Somit könnte eine *APM-1*-Abschaltung im Verlauf der Tumorentstehung insbesondere bei Nierenkarzinomen ein wichtiges Ereignis darstellen.

Insgesamt liefern die Daten aller Exon 2/3-spezifischen RT-PCR-Analysen weitere Hinweise für eine heterogene Expression des *APM-1*-Gens in Tumorzellen, das heißt für Abschaltung oder Reduktion der *APM-1*-Expression in etwa der Hälfte der untersuchten Zelllinien und Tumoren. Dies spricht generell für eine Reduktion der *APM-1*-Genexpression in der Kanzerogenese und somit für eine mögliche Rolle des *APM-1*-Gens als Tumorsuppressor-Gen. Für weitere Untersuchungen zur *APM-1*-Expression in Tumor- und Normalzellen sollten die RT-PCR-Analysen mit einer größeren Zahl von Biopsieproben aus Primärtumoren und Normalgewebe fortgeführt werden. Zur Analyse von Tumorgewebe wäre allerdings die Verwendung von Mikrodissektions-Material notwendig. Da die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten RT-PCRs keine quantitativen Aussagen zulassen, wäre darüber hinaus ein exakter Vergleich der verschiedenen Expressionsniveaus durch quantitative RT-PCR von Interesse. Als derzeit gängige Methoden kommen dafür kompetitive RT-PCRs (Wang *et al.*, 1989; Vanden Heuvel *et al.*, 1993) oder kinetische RT-PCRs basierend auf der Echtzeit („real time“)- Detektion von Fluoreszenz-Änderungen (Orlando *et al.*, 1998) in Betracht.

Die Analysen von *APM-1*-cDNAs aus den Tumorzelllinien LX-1 (Lunge) und CX-2 (Colon) zeigten, dass die zellulären *APM-1*-Transkripte drei unterschiedliche Klassen von untranslatierten Regionen (UTRs) an ihren 5'-Enden (bezeichnet als p2, a31 und 15C), aber identische proteincodierende Exons an den 3'-Enden besitzen (Abbildung 2; E. Schwarz, unveröffentlichte Daten). Aus diesem Befund wurde gefolgert, dass die *APM-1*-Transkription wahrscheinlich an mindestens drei verschiedenen Promotoren gestartet wird, was auf eine Möglichkeit zur spezifischen Regulation der Genexpression hindeutete (Nazari, 2000).

In denselben Zelllinien und Biopsieproben, in denen die *APM-1*-Genexpression bestimmt worden war, wurde die Aktivität der Promotoren p2, a31 und 15C durch 5'-UTR-spezifische RT-PCRs überprüft. Bei den Tumorzelllinien wurde in fast allen *APM-1*-positiven Proben auch p2-Produkt gefunden, was darauf hindeutet, dass der p2-Promotor in *APM-1*-exprimierenden Tumorzelllinien meist aktiv ist. Die Ergebnisse der a31-spezifischen RT-PCRs lassen auf eine a31-Promotoraktivität in etwa der Hälfte aller *APM-1*-exprimierenden Zelllinien schließen. Eine gewisse Ausnahme stellt hier die Zervixkarzinom-Zelllinie CaSki dar, die als einzige nur das a31-spezifische Signal aufweist. Bei 15C könnte eine gewebsspezifische Promotoraktivität vorliegen. Während beispielsweise in den Lungenkarzinom-Zelllinien kaum 15C-Produkt nachweisbar ist, ist es bei Colon und Harnblase sogar in der Mehrzahl bzw. allen getesteten Zelllinien zu finden. Auch hier gibt es mit RT112 (Harnblase) und RPMI 2650 (Lunge) zwei Zelllinien, in denen der 15C-Promotor der exklusive Transkriptionsstart zu sein scheint.

Von spezieller Bedeutung ist das Ergebnis der Zervixkarzinom-Zelllinie ME180 (Abbildung 17 B), in der das *APM-1*-Gen infolge der Integration von HPV68-DNA als Bestandteil viral-zellulärer Hybridtranskripte exprimiert wird. Das deutliche Exon 2/3-spezifische Signal spricht für eine starke Aktivität des viralen Promotors, was auch schon die Northern-Analysen zeigten (Reuter *et al.*, 1998). Gleichzeitig kann aber keines der 5'-UTR-Produkte nachgewiesen werden. Offenbar wird die *APM-1*-Transkription an keinem der eigenen zellulären Promotoren gestartet. Die RT-PCR-Daten zeigen daher klar, dass *APM-1* in ME180-Zellen ausschließlich aberrant in viral-zellulären Hybrid-mRNAs transkribiert wird.

In den untersuchten Biopsieproben ergaben die RT-PCR-Analysen, dass die Synthese der *APM-1*-Transkripte überwiegend vom p2-Promotor ausgeht. Auch a31-spezifische Produkte sind in rund einem Viertel der Biopsien nachweisbar. Hingegen war ein 15C-Signal in keiner der Proben zu detektieren.

Zusammen genommen weisen die Resultate der 5'-UTR-spezifischen RT-PCR-Analysen darauf hin, dass alle drei *APM-1*-Promotoren in den Tumorzelllinien der untersuchten Gewebe aktiv sind. In den analysierten Biopsieproben ist die Initiation der *APM-1*-Transkription dagegen offenbar auf p2 und a31 beschränkt. Aus der Nachweishäufigkeit der verschiedenen RT-PCR-Produkte kann außerdem auf die Tendenz geschlossen werden, dass die Produktion von *APM-1*-RNAs in der Mehrheit am p2-Promotor, etwas weniger häufig am a31-Promotor und am seltensten am 15C-Promotor gestartet wird. Dies könnte im Zusammenhang mit der genomischen Lokalisation der drei Promotoren stehen. Der 15C-Promotor ist von den dreien der am weitesten 5'-gelegene und mehrere 100 kb vom proteincodierenden Bereich entfernt. Der a31-Promotor liegt mindestens 230 kb näher am Exon 2 als 15C, und p2 hat den kürzesten Abstand zu Exon 2. Die exakte Größe des Introns zwischen p2 und Exon 2 ist noch nicht bekannt. Sie muss jedoch mehr als 40 kb betragen, da keine Cosmide identifiziert werden konnten, die sowohl die p2-UTR als auch Exon 2-Sequenzen enthalten (Nazari, 2000 und E. Schwarz, unveröffentlichte Daten; Abbildung 2).

Darüber hinaus weisen die unmittelbar stromaufwärts gelegenen Transkriptionskontrollregionen Strukturmerkmale auf, die auf eine differenzielle Regulation der Promotoren hindeuten. Beispielsweise scheinen TATA-Boxen generell zu fehlen, die p2-Region besitzt vier potenzielle AP-1-Bindungsstellen, und der 15C-Promotor befindet sich offenbar inmitten einer CpG-Insel (Nazari, 2000). In absehbarer Zukunft sollte auch die bislang noch nicht vollständig verfügbare Sequenz des gesamten Gens durch die ständig hinzukommenden Informationen im Rahmen der Genom-Sequenzierung (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) komplettiert werden. Dabei könnten zusätzliche Signalelemente, transkribierte Einheiten oder sogar komplette Gene identifiziert werden, die möglicherweise zum weiteren Verständnis der

APM-1-Regulation beitragen. Beispiele für Gene, deren Transkription ebenfalls von mehreren Promotorregionen kontrolliert wird, sind der *INK4a/ARF*-Locus (Quelle *et al.*, 1995), das *p53*-Gen, wo der zweite Promotor im ersten Intron liegt und für die Transkription eines weiteren Gens verantwortlich ist (Reisman und Loging, 1998), oder das *c-myc*-Gen (Marcu *et al.*, 1997).

Der direkte Nachweis von Promotor- und Enhancer-Aktivität in genomischen Fragmenten mit den p2- und a31-UTRs wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit mit Hilfe von Luciferase-Reporteranalysen durchgeführt. Dabei wurde mit einem 3,5 kb-Fragment, das die p2-UTR am 3'-Terminus enthält, sowohl in einem Standard-Reportervektor (pGL3-Basic) als auch in einem Vektor mit zusätzlichem SV40-Enhancer (pGL3-Enhancer) eine eindeutige, orientierungsabhängige Aktivierung des nachgeschalteten Reportergens gezeigt (Abbildung 27). Daraus kann auf die Anwesenheit eines Promotors in diesem p2-Fragment geschlossen werden. In einem Vektor mit zusätzlichem Minimalpromotor (pGUP.PA) ließ sich eine klare Aktivierung mit leichter Orientierungsabhängigkeit nachweisen. Das p2-Fragment enthält folglich auch Abschnitte mit Enhancer-Funktion. Der Unterschied zwischen dem in „sense“ und in „antisense“-Richtung zum Luciferase-Gen inserierten Fragment könnte auf eine positionsabhängige Wirkung von Promotorproximalen Sequenzen zurückzuführen sein, die bei „sense“-Orientierung des Inserts näher am Vektor-Promotor liegen als bei „antisense“-Orientierung.

Mit einem 2 kb-Fragment, das die a31-UTR mittständig enthält, wurde in pGL3-Basic keine Aktivierung festgestellt (Abbildung 28). Hingegen wurde in pGL3-Enhancer ein orientierungsabhängiger Effekt gemessen. Daraus lässt sich auf die Anwesenheit eines Promotors auch in der a31-Region schließen. Im pGUP.PA-Vektor wurde ein 2,3 kb großes a31-Fragment getestet, in dem die UTR im 3'-terminalen Bereich positioniert ist. Auch die insgesamt schwache Aktivierung spricht dafür, dass in dem 2,3 kb-a31-Fragment Enhancersequenzen enthalten sind, die den vorhandenen Minimalpromotor aktivieren können. Die Tatsache, dass hier ebenfalls eine leichte Orientierungsabhängigkeit vorliegt, deutet ähnlich wie bei p2 auf die Wirkung Promotorproximaler Elemente hin.

Mit dem Nachweis von Promotor- und Enhanceraktivität wurde ein erster Schritt zur Charakterisierung der p2- und a31-Transkriptionskontrollregion getan. Es sind jedoch noch weitere Experimente zur genauen Lokalisierung der Signalelemente sowie zur Rolle der verschiedenen Promotor bei der Regulation der *APM-1*-Expression, z. B. im Hinblick auf Entwicklungssteuerung, Differenzierung oder Gewebsspezifität erforderlich.

In seiner zentralen Funktion als Bewahrer der genetischen Stabilität der Zelle ist das Tumorsuppressor-Protein p53 Bestandteil mehrerer Signaltransduktionswege, es wirkt regulatorisch auf zahlreiche Zielgene und wurde als Interaktionspartner vieler anderer Proteine identifiziert (Ko und Prives, 1996; Hansen und Oren, 1997; Reisman und Loging, 1998; McMahon und Woods, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden Northern-Analysen von *APM-1*-mRNA und Western-Analysen von p53-Protein in 36 Tumorzelllinien aus 5 verschiedenen Geweben und ektozervikalen Keratinozyten miteinander verglichen. Es ergab sich der auffällige Befund einer fast vollkommenen Korrelation zwischen dem Status von *APM-1*-mRNA und p53-Protein (Abbildung 31 und Tabelle 11). Dies führte zu der Vermutung, dass auf direktem oder indirektem Weg entweder p53 aktivierend auf die *APM-1*-Expression wirken, oder umgekehrt *APM-1* an der Aktivierung von p53 beteiligt sein könnte. Mit Hilfe von Co-Transfektionen und anschließenden Reporteranalysen wurde die mögliche genregulatorische Beziehung zwischen *APM-1* und *p53* untersucht (Tabellen 12 und 13). Die Analyse ergab, dass eine Interaktion zwischen *APM-1* und *p53* durch direkte Beeinflussung der transkriptionellen Regulation allerdings eher unwahrscheinlich ist. Möglicherweise besteht zwischen *APM-1* und p53 auch eine Beziehung auf einer anderen Ebene. Es käme beispielsweise eine Stabilisierung von p53-Protein durch *APM-1* in Betracht. Im Normalzustand ist p53 ein kurzlebiges Protein mit einer Halbwertszeit von etwa 20 Minuten. Vieles spricht dafür, dass die Erhöhung der p53-Menge durch direkte oder indirekte Inhibierung der Degradation einen wichtigen Schritt bei der p53-Aktivierung darstellt (Somasundaram und El-Deiry, 2000).

Als Fazit ergeben sich für die weitere *APM-1*-Charakterisierung verschiedene Aufgabenfelder: die Analyse des Methylierungszustands in den Transkriptionskontrollregionen, das Auffinden von Interaktionspartnern und die Identifizierung von Zielgenen. Allgemeines Ziel ist die Entschlüsselung der *APM-1*-Funktion und seiner Rolle in der Kanzerogenese.