

## 1. Einleitung

Krebs ist eine genetische Erkrankung, bei der somatische Zellen durch Veränderungen der Erbinformation in einem mehrstufigen Prozess zu bösartigen Tumorzellen transformiert werden (Hanahan und Weinberg, 2000). Nach dem sequenziellen Modell der Kanzerogenese müssen sich bis zum Ausbruch der Krankheit vier bis sieben solcher Veränderungen anhäufen, weshalb viele Krebsarten beim Menschen als altersabhängige Erscheinung auftreten (Renan, 1993). Die somatischen Mutationen werden durch chemische, physikalische oder biologische Einflüsse verursacht. Sie können zur Aktivierung von Proto-Onkogenen mit einem dominanten Funktionsgewinn oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen mit einem rezessiven Funktionsverlust führen (Bishop und Weinberg, 1996).

Die Produkte von Proto-Onkogenen sind in der Regel Bestandteile von Signaltransduktionswegen und wirken so als Schlüsselregulatoren des Wachstums und der Differenzierung von Zellen. Während die Signalweiterleitung bei Proto-Onkoproteinen jedoch korrekt reguliert wird, können Mutationen die Erzeugung von Onkoproteinen verursachen, welche Signale konstitutiv übermitteln und damit ein unkontrolliertes Zellwachstum hervorrufen (Chambers und Tuck, 1993).

Tumorsuppressor-Gene dagegen sind negative Regulatoren der Zellteilung. Sie befinden sich an unterschiedlichen Stellen zellulärer Signaltransduktionswege und wirken in einigen Fällen als Repressoren der Onkogen-Expression (Knudson, 1993). Gegenwärtig gibt es mindestens 24 Tumorsuppressor-Gene, die streng aufgrund der Beobachtung definiert wurden, dass vererbte Mutationen in diesen Genen eine Prädisposition für Krebs darstellen (Macleod, 2000). Als Erklärung für die Krebs-Prädisposition gilt in den meisten Fällen nach wie vor die „Zwei-Treffer“-Hypothese: Eine vererbte Mutation bringt den Ausfall eines Allels des Tumorsuppressor-Gens mit sich und prädisponiert für die Tumor-Entstehung; eine somatische Mutation im zweiten Allel resultiert im sogenannten Verlust der Heterozygotie („loss of heterozygosity“, LOH) und führt schließlich zur Initiation oder Progression des Tumors (Knudson, 1971).

Der Prototyp eines Tumorsuppressor-Gens ist das Retinoblastom-Suszeptibilitäts-Gen *RB1*. Eine Mutation, die den Funktionsverlust des Genprodukts pRb verursacht, führt sowohl zu erblichen als auch sporadischen Formen von Krebs (Weinberg, 1992; Goodrich und Lee, 1993). In normalen Zellen besitzt pRb als Vertreter der sogenannten „pocket“-Proteine, zu denen noch die beiden anderen Mitglieder der Retinoblastom-Genfamilie p107 und p130 gehören, die Aktivität eines negativen Regulators im Zellteilungszyklus. Diese Proteine blockieren das Vorrücken im Zellzyklus durch Inhibierung von zellulären Transkriptionsfaktoren der E2F- und DP-Familie (La Thangue, 1994; 1996). Infolge multipler Phosphorylierungen durch Cyclin-abhängige Kinasen werden die Mitglieder der pRb-Familie inaktiviert, was in der Freisetzung transkriptionell aktiver

E2F/DP-Heterodimere resultiert (Beijersbergen und Bernards, 1996). In Zellen mit funktionsuntüchtigem pRb wird dagegen ein unkontrolliertes Vorrücken im Zellzyklus gefördert (Weinberg, 1995). Es wurde gezeigt, dass das Einbringen einer normalen *RB1*-cDNA in Tumorzellen mit mutiertem *RB1* deren tumorigene Eigenschaften wieder rückgängig machen kann (Huang *et al.*, 1988).

Das am häufigsten mutierte Tumorsuppressor-Gen ist das *p53*-Gen, welches in über 50 % aller menschlichen Tumoren funktionell inaktiv ist (Levine *et al.*, 1994; Ko und Prives, 1996). Das normale Gen codiert für einen sequenzspezifisch DNA-bindenden transkriptionellen Modulator (Vogelstein und Kinzler, 1992; Prives und Hall, 1999). Die Mutationen führen fast immer zu einer Störung der sequenzspezifischen Transaktivierung, was die Hypothese unterstützt, dass diese Funktion essentiell für die Tumorsuppressor-Wirkung des Gens ist. Eine daraufhin erfolgte systematische Identifizierung p53-regulierter Gene hat gezeigt, dass p53 die Expression zahlreicher Gene aktiviert, die wichtige Komponenten der neoplastischen Veränderung von Zellen beeinflussen (Yu *et al.*, 1999). Setzt man Zellen ionisierender Strahlung, UV-Licht oder anderen DNA-schädigenden Agenzien aus, kommt es zu einer p53-Aktivierung, die in erhöhten Konzentrationen des intrazellulären Proteins resultiert (Hoppe-Seyler und Scheffner, 1997; Reisman und Logging, 1998). Vergleichbar mit pRb kann p53 die Passage durch die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus beeinflussen (Diller *et al.*, 1990). In der Funktion eines „Fürsorgers“ („caretaker“) scheint es die genetische Integrität der Zelle zu überwachen (Lane, 1992). Es registriert die verschiedenen DNA-schädigenden Einflüsse und reagiert mit Induktion der Expression von Genen, deren Aufgabe die Inhibierung der DNA-Synthese oder die Stimulierung von Apoptose ist (Ko und Prives, 1996; Hansen und Oren, 1997; Levine, 1997). Diese Hypothese wird untermauert durch die Beobachtung, dass Zellen, in denen p53 fehlt oder mutiert vorliegt, eine signifikant erhöhte Mutationsrate besitzen (Livingstone *et al.*, 1992). Ähnlich wie bei *RB1* kann auch in Zellen mit mutiertem *p53* durch Einsatz der Wildtyp-Variante die Zellzyklus-Kontrolle wiedererlangt und die DNA-Synthese unterbunden werden (Yin *et al.*, 1992).

Unter den biologischen Faktoren, die zur Krebsentstehung führen können, nehmen Viren eine wichtige Stellung ein. Schätzungen zufolge werden immerhin 15 % aller menschlichen Tumoren weltweit durch Viren verursacht (Butel, 2000). Als mittlerweile akzeptierte menschliche Tumoviren gelten das Hepatitis B-Virus (Robinson, 1999), das Hepatitis C-Virus (Chung und Liang, 1999), das Epstein-Barr-Virus (Raab-Traub, 1999), das humane T-Zell-Leukämie-Virus Typ I (Yoshida, 1999) und bestimmte Typen humaner Papillomviren (zur Hausen, 1999).

Humane Papillomviren (HPVs) infizieren Epithelzellen der Haut oder der Schleimhäute des Anogenital-Trakts und des Hals-Nasen-Ohren (HNO)-Bereichs (zur Hausen, 2000). Sie etablieren eine persistente Infektion, indem sie die Basalzellen des Epithelgewebes befallen, da diese als einzige in der Lage sind, sich zu teilen. Die Vermehrung der Viren ist eng mit dem Differenzierungszustand der Wirtszellen gekoppelt und findet nur in den differenzierten Keratinozyten der obersten Zellschichten statt (Rösl und Schwarz, 1997). Inzwischen sind 85 verschiedene Typen humanpathogener Papillomviren identifiziert und vollständig sequenziert; mehr als 120 potenzielle neue Typen wurden teilweise charakterisiert (zur Hausen, 2000).

Bestimmte Typen pathogener HPVs tragen maßgeblich zur Entstehung von Krebs des Anogenital-Trakts, insbesondere des Gebärmutterhalses bei (zur Hausen, 1996). Genitale HPVs, die Läsionen mit dem Potential zur einer malignen Progression hervorrufen, werden als sogenannte „high risk“-Typen bezeichnet. Sie können unterschieden werden von den „low-risk“-Typen, die in erster Linie auf gutartige Genitalwarzen beschränkt sind (Vousden, 1993). Die Prototypen der Krebs-assoziierten Papillomviren sind HPV16 und 18. Ihre DNA wird in der Mehrheit aller Biopsien von Gebärmutterhalstumoren (Zervixkarzinomen) und der davon abgeleiteten Zelllinien gefunden und exprimiert (Schwarz *et al.*, 1985; Chow *et al.*, 1987).

Das krebsauslösende Potenzial der „high-risk“-HPV-Typen wird vorrangig den beiden frühen Genen *E6* und *E7* (E für „early“) zugeschrieben. Die Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps erfordert deren kontinuierliche Expression. Ihre Produkte gelten mit ihrer immortalisierenden und wachstumsfördernden Wirkung als Onkoproteine. Schlüsselstellen, an denen sie in die zellulären Regulationsmechanismen eingreifen, stellen die beiden Tumorsuppressor-Proteine pRb und p53 dar (Dyson *et al.*, 1989; Scheffner *et al.*, 1990). Es wurde gezeigt, dass das E7-Onkoprotein von „high-risk“-Viren an pRb bindet und zu einer verstärkten Degradation des Proteins führt, wodurch die zellulären E2F/DP-Transkriptionsfaktoren aktiviert werden (Tommasino und Jansen-Dürr, 1997). Das „high-risk“-E6-Onkoprotein inaktiviert p53, indem es ebenfalls dessen rasche Degradation über den Ubiquitin-abhängigen Proteolyse-Weg fördert. Im Gegensatz dazu bindet beispielsweise das E6-Protein eines „low-risk“-Virus (z. B. HPV6 oder 11) nicht oder nur mit geringer Affinität an p53 (Hoppe-Seyler und Scheffner, 1997).

Zusätzlich zu einer HPV-Infektion mit darauffolgender Expression der viralen Onkogene müssen sich zur vollen Ausprägung des malignen Phänotyps in Zervix-Epithelzellen noch weitere genetische Veränderungen im Genom der Wirtszellen ereignen (zur Hausen, 1997). Die Erfordernis multipler genetischer Veränderungen bei der zervikalen Onkogenese wird auch durch den Nachweis chromosomaler Aberrationen, wie beispielsweise den Verlust der allelen Heterozygotie, widergespiegelt (Mullokanov *et al.*, 1996).

In prämaligen Zellen persistiert das 7,3-8 kb große HPV-Genom als autonom replizierendes Episom von definierter Kopienzahl (Dürst *et al.*, 1985). In der Mehrheit der Zervixkarzinome und der davon abgeleiteten Zelllinien ist die virale DNA jedoch ins Wirtszell-Genom integriert (Schwarz *et al.*, 1985; Choo *et al.*, 1987; Cullen *et al.*, 1991). Für die Entwicklung von Zervixkarzinomen aus prämaligen Läsionen wird die Integration von HPV-DNA als wichtiger Schritt angesehen. Sie kann sich an verschiedenen chromosomalen Loci ereignen, allerdings bevorzugt an fragilen Stellen, in der Nähe von Onkogenen, wie z. B. den *myc*-Genen (Dürst *et al.*, 1987; Popescu und DiPaolo, 1990; Couturier *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1992) und generell in transkribierten Genomregionen. Die Integration hat eine erhöhte Stabilität der für E6 und E7 codierenden mRNAs zur Folge (Jeon und Lambert, 1995). Sie bewirkt weiterhin eine gesteigerte Expression der viralen Onkogene, die mit einem selektiven Wachstumsvorteil der Zellen einher geht (Jeon *et al.*, 1995). Gleichzeitig resultiert die Expression von „high-risk“-*E6*- und *E7*-Onkogenen wiederum in einer erhöhten Frequenz der Integration von Fremd-DNA in das Wirtsgenom (Kessis *et al.*, 1996). Nach der Integration fehlt der frühen Region des HPV-Genoms, in der die *E6*- und *E7*-Onkogene enthalten sind, gewöhnlich das 3'-terminale Polyadenylierungssignal (Schwarz *et al.*, 1985). Als Konsequenz läuft die am frühen viralen Promotor begonnene Transkription in die flankierenden zellulären Sequenzen hinein, und aus der RNA-Prozessierung gehen vielfältig gespleißte Fusionstranskripte aus 5'-terminalen viralen Sequenzen mit *E6* und *E7* sowie 3'-terminalen co-transkribierten zellulären Sequenzen hervor.

Von den Auswirkungen des Integrationsereignisses können außer der Expression der viralen Onkogene auch zelluläre Gene betroffen werden, die im Bereich des Integrationsortes lokalisiert sind. Es ist beispielsweise bekannt, dass eine HPV-Integration in der Nähe der *myc*-Proto-Onkogene zu einer Verstärkung der *myc*-Genexpression geführt hat (Dürst *et al.*, 1987; Couturier *et al.*, 1991). Eine ausführliche Dokumentation der Beeinflussung zellulärer Gene durch diesen Mechanismus steht bislang allerdings noch aus (Sastre-Garau *et al.*, 2000).

Im Genom der Zervixkarzinom-Zelllinie ME180 wurde die DNA eines Subtyps des mit HPV18 verwandten HPV68 integriert vorgefunden (Reuter *et al.*, 1991). Der Befund der Homozygotie des mutierten Allels mit der integrierten HPV-DNA deutete darauf hin, dass sich nach der Integration ein LOH ereignet hatte. Infolgedessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich im HPV68-Integrationsbereich möglicherweise ein inaktiviertes Tumorsuppressor-Gen befindet. Eine Untersuchung der flankierenden zellulären Sequenzen führte zur Identifizierung eines bis dahin unbekanntes menschlichen Gens, das die Bezeichnung *APM-1* („affected by papillomavirus DNA integration in ME180 cells“) erhielt (Reuter, 1995; Reuter *et al.*, 1998). Lokalisiert wurde das Gen auf Chromosom 18q21, einer Genomregion, die häufig Veränderungen in Tumoren

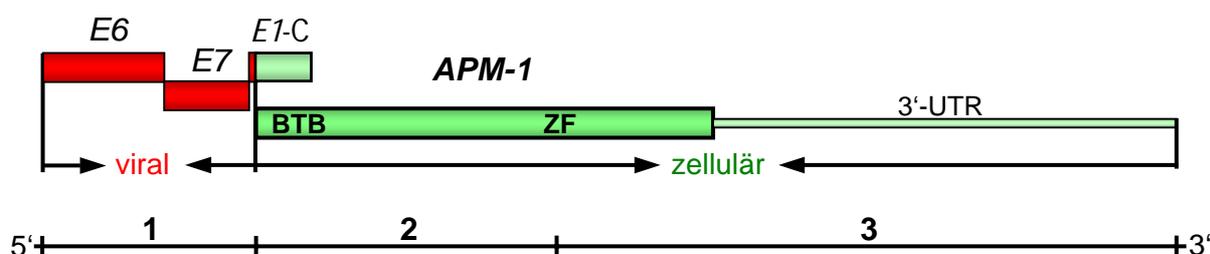
verschiedener Gewebe aufweist (Steenbergen *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 1996). Es wurde daraufhin spekuliert, dass es sich bei *APM-1* um einen Tumorsuppressor-Kandidaten handeln könnte.

Eine erste Bestätigung dieser Vermutung brachten „Colony Formation Assays“ (CFAs) unter Selektionsbedingungen, in denen das *APM-1*-Gen nach transienter Überexpression eine inhibierende Wirkung auf das klonale Wachstum der Zervixkarzinom-Zellen HeLa und CaSki ausübte (Vogt, 1997; Reuter *et al.*, 1998). Weiterhin deuteten Northern-Analysen mit Zervixkarzinom-Zelllinien und HPV-negativen Tumorzelllinien anderer Gewebstypen auf ein ausgeprägt heterogenes Expressionsprofil des Gens hin (Reuter *et al.*, 1998; E. Schwarz, unveröffentlichte Daten). Dabei wurde auch gezeigt, dass *APM-1* in normalen ektozervikalen Keratinozyten exprimiert wird. Diese Befunde führten zu der Annahme, dass eine deregulierte *APM-1*-Genexpression möglicherweise einen Beitrag zur Kanzerogenese leistet.

Das *APM-1*-Gen codiert für ein Produkt von 619 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von rund 69 kDa (Reuter *et al.*, 1998). Es besitzt eine BTB-Domäne am Aminotermi-nus, eine unmittelbar daran anschließende saure Domäne und vier C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger vom *Krüppel*-Typ. Aufgrund dieser strukturellen Eigenschaften gehört das APM-1-Protein zu einer Subfamilie von Zinkfinger-Proteinen mit N-terminaler BTB-Domäne. Für andere Mitglieder dieser Subfamilie wurde bereits gezeigt, dass sie als DNA-bindende Transkriptionsfaktoren fungieren. Einige üben die Funktion eines Aktivators, andere die eines Repressors der Transkription aus. Die BTB-Domäne des menschlichen ZF5-Proteins ist beispielsweise für die Aktivierung der LTR („long terminal repeat“) von HIV-1 („human immunodeficiency virus-1“) verantwortlich (Kaplan und Calame, 1997). Dagegen wirkt das Produkt des Proto-Onkogens *BCL6* („B cell lymphoma“) als sequenzspezifischer Transkriptionsrepressor, wobei die DNA-Bindung durch die Zinkfinger und die reprimierende Wirkung durch die BTB-Domäne vermittelt wird (Chang *et al.*, 1996; Seyfert *et al.*, 1996). Aufgrund dieser Daten wurde vermutet, dass *APM-1* ebenfalls für einen spezifisch DNA-bindenden Transkriptionsfaktor codieren könnte. Ein erstes „Promotor-Screening“ durch transiente Transfektionsexperimente mit anschließender Reporteranalyse hat für das *APM-1*-Genprodukt bei einem von fünf getesteten eukaryontischen Promotoren eine dosis-abhängige Wirkung ergeben (Vogt, 1997).

Die *APM-1*-mRNA ist in den ME180-Zellen Bestandteil viral-zellulärer Fusionstranskripte, die als Folge der aberranten Co-Transkription mit den *E6*- und *E7*-Genen der integrierten HPV68-DNA hergestellt werden (Abbildung 1). Wegen der konstitutiv hohen Aktivität des HPV-Promotors werden große Mengen der Fusions-mRNA hergestellt (Reuter *et al.*, 1998). Da die Transkripte nach *E6* und *E7* zusätzlich einen *E1*-Zell-Hybrid-ORF enthalten, ist *APM-1* in

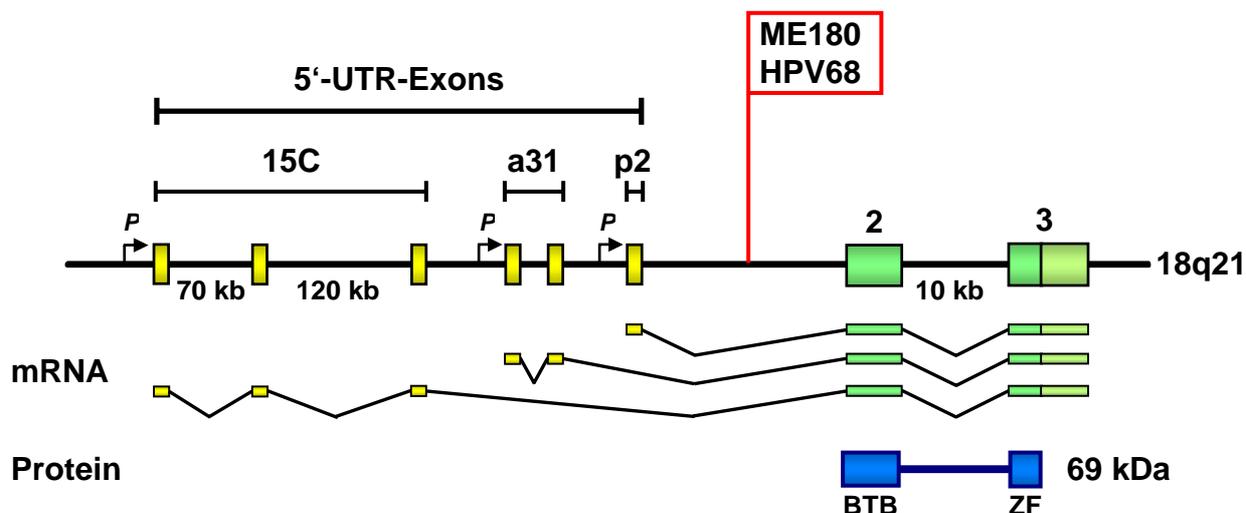
diesen polycistronischen mRNAs vom 5'-Ende aus gesehen erst das vierte Cistron. In eukaryontischen Organismen wird von polycistronischen mRNAs jedoch gewöhnlich nur das 5'-proximale Cistron effizient translatiert (Kozak, 1992; Jackson und Kaminski, 1995). Eine gekoppelte *in-vitro*-Transkription-/Translation der klonierten Hybrid-cDNA ergab, dass als Konsequenz der polycistronischen Struktur des Transkripts kein APM-1-Protein produziert wird (Vogt, 1997).



**Abbildung 1: Struktur der viral-zellulären Fusionstranskripte in ME180-Zellen**

Die offenen Leserahmen („open reading frames“, ORFs) in der 4618 bp-Sequenz der cDNA des Fusionstranskripts sind schematisch durch Rechtecke dargestellt (5'-Ende: erstes ATG-Codon, 3'-Ende: Terminations-Codon). Virale Sequenzen sind rot, zelluläre Sequenzen sind grün gefärbt. Die cDNA besteht aus drei Exons. Exon 1 (Pos. 1-839) ist viraler Natur, Exon 2 (Pos. 840-2063) und Exon 3 (2064 bis 4618) sind zellulären Ursprungs. Die proteincodierende Region von *APM-1* (Pos. 856-2715) erstreckt sich über zwei Exons. Das Stop-Codon, welches den *APM-1*-ORF am 5'-Ende definiert, befindet sich im viralen Exon 5 bp stromaufwärts der viral-zellulären Exon-Grenze. Das erste ATG-Codon, das als Translations-Startcodon fungiert, befindet sich im zellulären Teil 17 bp stromabwärts der Exon-Grenze. Die Positionen der BTB- und Zinkfinger (ZF)-Domäne sind angegeben. Das ATG-Codon des HPV68-*E6*-Gens definiert Position 1. (Abbildung entnommen aus: Reuter *et al.*, *APM-1*, a novel human gene, identified by aberrant cotranscription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity. *EMBO J.*, **17**, 215-222, 1998, verändert; *E7*, HPV68-*E7*-Gen; *E1-C*, Fusions-ORF aus HPV68-*E1* und zellulären Sequenzen; UTR, untranslatierte Region)

Die Struktur der authentischen *APM-1*-Transkripte wurde durch Analyse von cDNA-Bibliotheken aus den RNAs der Tumorzelllinien LX-1 (Lunge) sowie CX-2 (Colon) bestimmt. Für die proteincodierenden Exons 2 und 3 des *APM-1*-Gens ist die Transkriptstruktur aus den Untersuchungen der Zervixkarzinom-Zelllinie ME180 bekannt (Reuter *et al.*, 1998). Im Bereich dieser Exons ergab sich bei allen charakterisierten cDNA-Klonen eine mit dem ME180-Transkript übereinstimmende Struktur. Die zellulären 5'-UTR-Sequenzen der einzelnen cDNAs ließen sich dagegen in drei unterschiedliche 5'-UTR-Klassen sortieren, die in Anlehnung an die Namen der cDNA-Klone, in denen sie erstmalig identifiziert wurden, die Bezeichnung 15C, a31 und p2 erhielten (E. Schwarz, unveröffentlichte Daten). Diese Befunde führten zu der Vermutung, dass die Transkription des *APM-1*-Gens an mindestens drei verschiedenen Promotoren initiiert wird. Auch die Exonzusammensetzung der 5'-UTR-Klassen wurde ermittelt: 15C besteht aus drei Exons, a31 aus zwei und p2 aus einem Exon (Nazari, 2000). Im Genom sind die 5'-UTR- und proteincodierenden Exons in der Reihenfolge (5')-15C-a31-p2-Exon 2-Exon 3-(3') angeordnet (Abbildung 2).



**Abbildung 2: *APM-1* Genstruktur, mRNAs und Protein**

Schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung der genomischen Struktur des zellulären *APM-1*-Gens, der verschiedenen *APM-1*-mRNAs und des *APM-1*-Proteins. Die Exons der 5'-untranslatierten Regionen (UTRs) 15C, a31 und p2 werden durch gelbe Rechtecke, die proteincodierenden Exons 2 und 3 durch grün gefärbte Rechtecke repräsentiert. (Die 3'-UTR ist hellgrün dargestellt.) Die bekannten Intron-Größen (in kb) sind angegeben. Abgewinkelte Pfeile deuten die Lage von Promotoren (P) an. Die waagerechte, mit 18q21 beschriftete Linie symbolisiert den chromosomalen Genlocus. Die Position der in das Genom der Zervixkarzinom-Zelllinie ME180 integrierten HPV68-DNA ist durch eine senkrechte rote Linie angedeutet. Im 69 kDa großen Protein (blau gefärbt) sind die Bereiche der BTB- und der Zinkfinger (ZF)-Domäne angegeben. (Die Abbildung wurde freundlicherweise von E. Schwarz zur Verfügung gestellt.)

Ein Tumorsuppressor-Gen wurde nach Weinberg (1991) als ein genetisches Element angesehen, dessen Verlust oder Inaktivierung einer Zelle zu unkontrolliertem, neoplastischem Wachstum verhelfen kann. In einer neueren Arbeit haben Haber und Harlow (1997) vorgeschlagen, ein Tumorsuppressor-Gen losgelöst von seiner funktionellen Bedeutung zu betrachten und es generell als ein Gen zu definieren, das im Verlauf der Krebsentstehung Mutationen erleidet, die zum Verlust der Funktion führen. Solche Mutationen reichen von Umgestaltungen ganzer Chromosomenstrukturen bis hin zu Punktmutationen, bei denen einzelne Nucleotidbasen verändert werden (Kinzler und Vogelstein, 1996). Punktmutationen können eine Störung der normalen Funktion des Genprodukts bewirken, indem sie zu einer vorzeitig abgebrochenen Translation oder der Produktion eines funktionell inaktiven Proteins führen. Als weitere Ursache für einen Funktionsverlust kommen Störungen in der Genregulation in Betracht, die eine verminderte oder völlig abgeschaltete Expression des Tumorsuppressor-Gens bewirken können.

Basierend auf der Annahme, dass es sich bei *APM-1* um einen Tumorsuppressor-Kandidaten handelt, wurden in der vorliegenden Doktorarbeit Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung des Gens durchgeführt.

- Zunächst wurde der Versuch unternommen, ein Säugerzell-System mit dauerhafter, induzierbarer *APM-1*-Expression zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung des Gens im zellulären Kontext zu etablieren. Das System sollte verwendet werden, um in „Colony Formation Assays“ die Wirkung des *APM-1*-Gens auf das klonale Zellwachstum nach synchroner Aktivierung der Expression zu untersuchen.
- Aufgrund der Vermutung, dass *APM-1* die Rolle eines Transkriptionsfaktors ausüben könnte, wurde untersucht, wie sich die Expressionsprofile von fast 1200 verschiedenen Genen eines cDNA-Makroarrays unter Einwirkung der *APM-1*-Expression verändern. Die Resultate dieser Analyse sollten außerdem Rückschlüsse auf potenzielle *APM-1*-Zielgene ermöglichen.
- Um den offenen Leserahmen des *APM-1*-Gens auf die Anwesenheit funktionell inaktivierender Punktmutationen zu überprüfen, wurden große Teile der proteincodierenden Region in Tumorzelllinien verschiedener Gewebe mit Hilfe des „Cycle Sequencing“-Verfahrens analysiert.
- Ergänzend zu den Mutationsanalysen des proteincodierenden Bereichs von *APM-1* durch Sequenzierung wurden die Translationseigenschaften zellulärer *APM-1*-mRNAs aus Tumorzelllinien durch gekoppelte *in-vitro*-Transkription-/Translation klonierter cDNAs untersucht.
- Durch reverse Transkription (RT) von RNAs mit anschließender PCR (RT-PCR) im 5'-UTR-Bereich und im Bereich der proteincodierenden Exons wurde eine Analyse der *APM-1*-Genexpression in Zelllinien und Biopsiematerial verschiedener Tumoren durchgeführt.
- Die regulatorische Aktivität der genomischen Transkriptionskontrollregionen mit den 5'-UTRs der Klassen p2 und a31 wurde mit Hilfe von Reporteranalysen bestimmt.
- Wegen der zentralen Bedeutung des Tumorsuppressor-Gens *p53* im Prozess der Krebsentstehung wurde nach einer möglichen Beziehung zwischen *APM-1* und *p53* auf genregulatorischer Ebene gesucht.