

## 2.2. Suche nach *APM-1*-regulierten Zielgenen

Das *APM-1*-Genprodukt gehört zu einer Subfamilie von Zinkfinger-Proteinen mit N-terminaler BTB-Domäne (Reuter *et al.*, 1998). Einige Mitglieder dieser Subfamilie wurden als DNA-bindende Transkriptionsfaktoren identifiziert. Darunter befinden sich sowohl Aktivatoren (Kaplan und Calame, 1997) als auch Repressoren der Transkription (Chang *et al.*, 1996; Seyfert *et al.*, 1996). Um zu überprüfen, ob *APM-1* ebenfalls die Funktion eines Transkriptionsfaktors ausübt, und zur ersten Identifizierung potenzieller Zielgene wurde das „Atlas™ cDNA Expression Array“-System der Firma Clontech verwendet. Da für das *APM-1*-Gen als Tumorsuppressor-Kandidat eine Beteiligung an der Kanzerogenese vermutet wird, wurden die Experimente mit Makroarrays der „Atlas™ Human Cancer 1.2“-Serie durchgeführt. Die Array-Filter enthalten genspezifische cDNA-Fragmente, die insgesamt 1176 bekannte menschliche Gene aus sechs verschiedenen Kategorien repräsentieren. Zur internen Normalisierung sind zusätzlich cDNA-Fragmente von neun verschiedenen Haushaltsgenen aufgetragen.

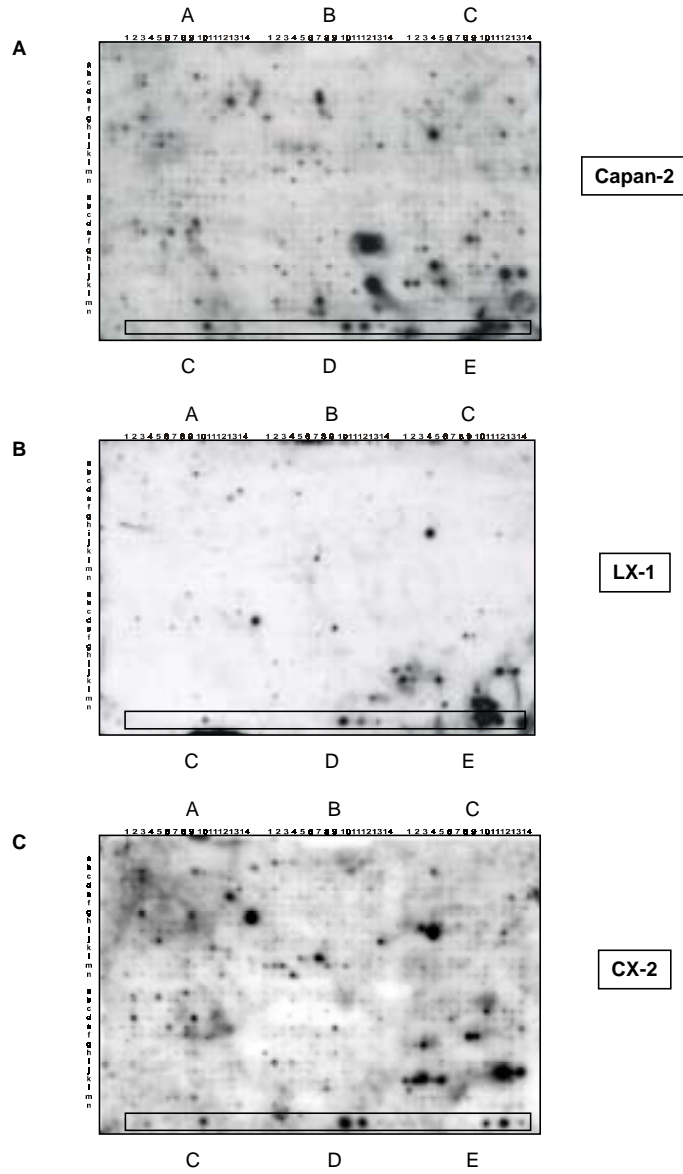
Mit Hilfe des Atlas-Systems sollten die Expressionsprofile der repräsentierten Gene nach Überexpression des *APM-1*-Gens in verschiedenen Tumorzelllinien analysiert werden. Dazu wurden die Filter hybridisiert mit [<sup>32</sup>P]-markierten cDNAs, die aus einer reversen Transkription von Gesamt-RNA aus den Zelllinien unter Einbau radioaktiver Nucleotide resultierten. Für die cDNA-Synthese wurde ein Array-spezifisches Primer-Gemisch eingesetzt, damit vorrangig nur die cDNAs hergestellt werden, die den auf den Filtern immobilisierten Genen entsprechen.

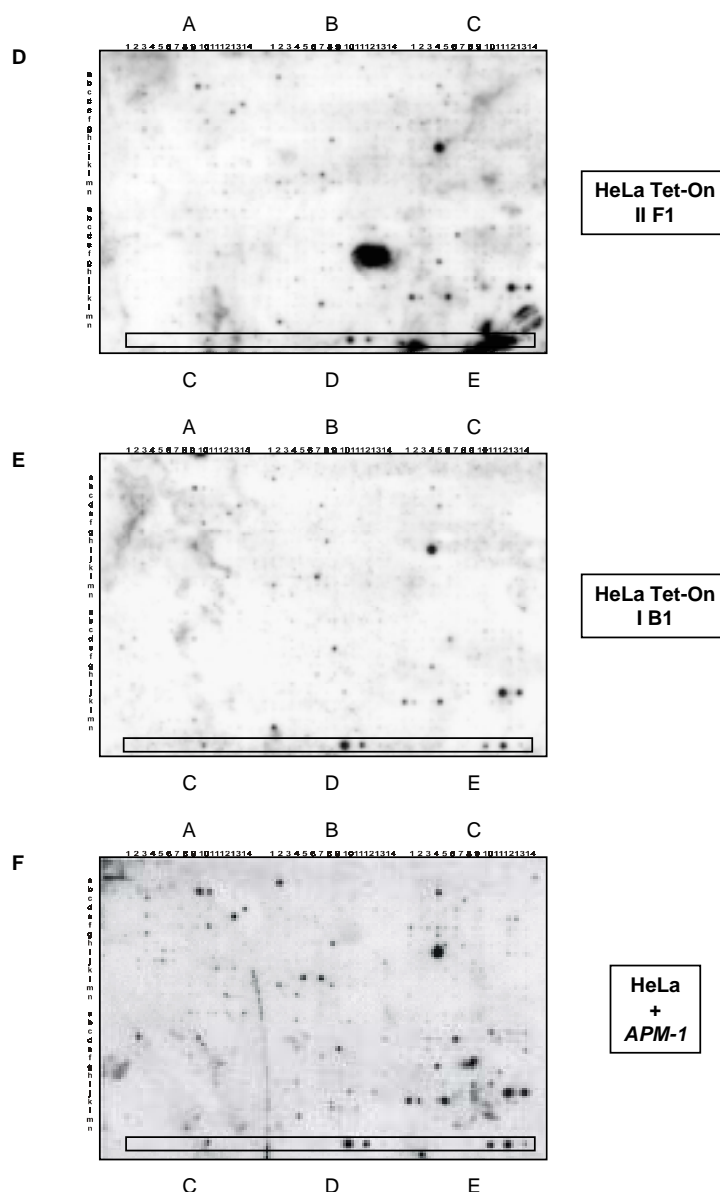
Verglichen wurden die RNAs aus den Tumorzelllinien Capan-2 (Pankreas), CX-2 (Colon) und LX-1 (Lunge). Die Zelllinien wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen *APM-1*-Expression ausgewählt. Dabei repräsentiert Capan-2 die *APM-1*-negative Kontrolle, LX-1 eine Zelllinie mit mittlerer und CX-2 eine mit starker *APM-1*-Expression. Überdies wurden RNAs aus transient mit pSG5-*APM-1* transfizierten HeLa-Zellen sowie den Dox-behandelten HeLa Tet-On Klonen I B1 und II F1 zur Analyse herangezogen. Da bei Klon I B1 nach RT-PCR-Analyse keine Induzierbarkeit mehr festzustellen war (siehe Kap. 2.1.4., Abbildung 5), wurde kein Vergleich mit nicht-induzierten Zellen angesetzt.

Das Ergebnis der Hybridisierungen ist in Abbildung 1 gezeigt. Nach Auswertung der Autoradiogramme durch optische Abschätzung ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede im Expressionsprofil zwischen der *APM-1*-negativen Tumorzelllinie Capan-2 und den beiden *APM-1*-exprimierenden Zelllinien LX-1 und CX-2. Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression konnten zwischen den als Kontrolle definierten Zellen des HeLa Tet-On Klons II F1 und den Zellen des *APM-1*-positiven Klons I B1, oder den transient mit pSG5-*APM-1*

transfizierten HeLa-Zellen gefunden werden. Bei einigen Genen wurde eine leichte Verstärkung bzw. Abschwächung des Expressionsniveaus beobachtet. Bei keinem dieser Gene konnte jedoch ein Zusammenhang mit der für *APM-1* postulierten Funktion eines negativen Regulators des Zellwachstums hergestellt werden. Eine Zusammenstellung aller Gene mit einer als verändert eingestuften Expression ist im Anhang zu finden.

Die Ergebnisse dieses Experiments erlauben keine Aussagen über mögliche, durch *APM-1* regulierte Zielgene. Die wahrscheinlichste Begründung ist, dass in keiner der untersuchten Zelllinien ein ausreichend hohes *APM-1*-Expressionsniveau vorhanden ist, um einen sichtbaren Effekt zu erzielen. Andererseits könnte die von *APM-1* ausgehende Wirkung so geringe Abweichungen hervorrufen, dass sie mit dem verwendeten experimentellen System nicht zu erfassen sind. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls denkbar, dass sich die potenziellen *APM-1*-Zielgene nicht unter denen des ausgesuchten Arrays befinden. Zudem ist experimentell noch nicht bewiesen, dass *APM-1* als Transkriptionsfaktor fungiert.





**Abbildung 1: cDNA-Array-Analyse differenzieller Genexpression in Tumorzelllinien unter *APM-1* Expression**

Gezeigt sind Autoradiogramme von cDNA-Array-Filtern nach Hybridisierung mit komplexen cDNA-Sonden aus reverser Transkription mit einem Array-spezifischen Primer-Gemisch von RNAs der Zelllinien (A) Capan-2, (B) LX-1, (C) CX-2, (D) HeLa Tet-On II F1, (E) HeLa Tet-On I B1 und (F) HeLa transient transfiziert mit pSG5-APM-1. Die RNA der HeLa Tet-On Klone wurde nach 48-stündiger Behandlung mit 1 µg/ml Dox geerntet. Bei den transient transfizierten HeLa-Zellen erfolgte die RNA-Extraktion 48 h nach Transfektion. Bei allen Proben wurde für die cDNA-Synthese poly(A)<sup>+</sup>-selektionierte Gesamt-RNA verwendet. Die Filter A bis D und F wurden für drei Tage, Filter E für 16 Stunden autoradiographiert. An den Seiten der Arrays ist das Koordinatensystem des Herstellers angedeutet. Der Kasten am unteren Rand der Filter markiert jeweils das Areal der Haushaltsgene.

Die komplette Genliste des „Atlas™ Human Cancer 1.2-Arrays“ ist im Internet unter der Adresse „<http://atlasinfo.clontech.com/atlasinfo/AtlasInfo2/dynamicScripts/cDNAList.ssc?listClontechArrayUid=19&listClontechCatNo=7851-1>“ einsehbar.