

2.3. Mutationsanalyse der proteincodierenden Region des *APM-1*-Gens

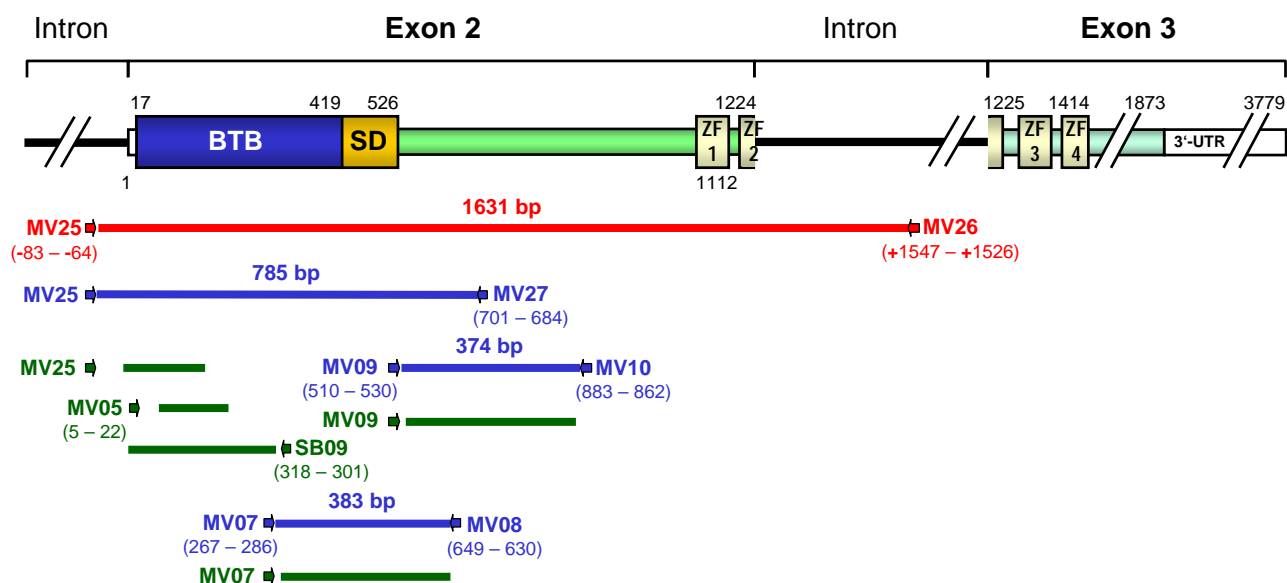
Nach einem Vorschlag von Haber und Harlow (1997) ist ein Tumorsuppressor-Gen – ungeachtet seiner funktionellen Rolle – am eindeutigsten definiert als ein Gen, das im Verlauf der Krebsentstehung Mutationen erleidet, die zum Verlust der Funktion führen. Um die Tumorsuppressor-Hypothese für das *APM-1* Gen in dieser Hinsicht zu überprüfen, wurden Teile der proteincodierenden Region des Gens auf Mutationen in Zellen verschiedener Tumorzelllinien untersucht. Für die vorliegende Arbeit konzentrierte sich die Suche nach Mutationen auf die BTB-Domäne und die darauf folgende saure Domäne, sowie den Abschnitt zwischen saurer und Zinkfinger-Domäne. Die dazu verwendeten Zelllinien stammen aus 13 Zervix-, 3 Prostata-, 7 Lungen-, 17 Pankreas-, 14 Colon- und 5 Harnblasenkarzinomen. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde die Mutationsanalyse der Zinkfinger-Region des *APM-1*-Gens mit Tumorzelllinien aus 6 Pankreas-, 14 Colon-, 5 Harnblasen-, 2 Lungen- und 10 Zervixkarzinomen durchgeführt (Beyer, 1998).

Die Analyse erfolgte mit Hilfe der „Cycle Sequencing“-Methode. Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, wurde zur Isolierung des zu lesenden Bereichs in einer ersten PCR aus genomischer DNA der Tumorzelllinien ein Produkt amplifiziert, welches das gesamte Exon 2 von *APM-1* enthält. Um eine spezifische Anreicherung zu erzielen, wurde das erste Amplifikat als Ausgangsprodukt für weitere PCRs verwendet. Diese wurden zum Teil als „nested“-PCR durchgeführt, bei der die Primer innerhalb des ersten PCR-Produkts gelegen sind.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem Ausgangsprodukt der ersten PCR tatsächlich um das gewünschte Fragment handelt, wurde ein aus genomischer DNA der Zervixkarzinom-Zelllinie ME180 mit den Primern MV25 und MV26 amplifiziertes Fragment mit Primer MV25 ansequenziert. Die gelesene Sequenz ist in Abbildung 2 dargestellt. Sie zeigt eine vollkommene Übereinstimmung mit der bekannten *APM-1*-Sequenz.

Zur vereinfachten Ermittlung eventueller Nucleotidaustausche im Sequenzgel wurden die A-, C-, G- und T-Ansätze der einzelnen Proben nicht wie üblich in Vierergruppen, sondern nach Nucleotiden sortiert in Blöcken aufgetragen. Sind keine Veränderungen vorhanden, resultieren aus diesem Auftragsschema in jedem der Blöcke Reihen von auf gleicher Höhe laufenden Banden. Auftretende Mutationen können somit aufgrund ihrer Abweichung gegenüber dem Reihemuster leicht identifiziert werden. Ein Beispiel für ein Sequenzautoradiogramm ist in Abbildung 3 gezeigt. Die Ergebnisse der Sequenzanalysen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

A



B

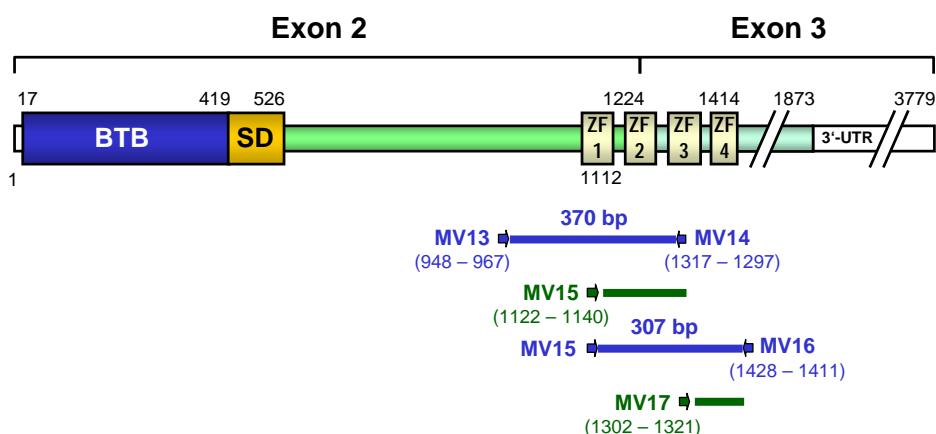


Abbildung 1: Schematische Übersicht der sequenzierten Abschnitte des *APM-1*-Gens

A zeigt die für die vorliegende Arbeit sequenzierten Bereiche des *APM-1*-Gens mit genomischer DNA als Matrize der „Cycle Sequencing“-Prozedur. Das Ausgangsprodukt ist als rote Linie dargestellt. Die dafür verwendeten Primer MV25 und MV26 liegen in den Introns, die das Exon 2 flankieren. Die relative Position der beiden Intron-Primer, bezogen auf den als Position 1 definierten Beginn von Exon 2, ist durch die Vorzeichen „-“ und „+“ angedeutet. Die Produkte der „nested“-PCRs sind blau gefärbt. Mit den Primern MV25 und MV27 wurde ein Fragment von 785 bp amplifiziert, das sich von Position -83 im angrenzenden Intron bis Position 701 in Exon 2 erstreckt. Zur Sequenzierung der darin enthaltenen BTB-Domäne (Pos. 17 bis 419) wurde beim größten Teil der Zelllinien Primer SB09 eingesetzt. Die Sequenzierung bei 10 der 17 Pankreaskarzinom-Zelllinien wurde mit Primer MV25, und bei einer Pankreaskarzinom-Zelllinie ausschließlich mit Primer MV05 durchgeführt. Ein Fragment von 383 bp (Pos. 267 bis 649), welches die saure Domäne (Pos. 420 bis 526) komplett umfasst, wurde mit den Primern MV07 und MV08 amplifiziert und mit Primer MV07 sequenziert. Ein sich unmittelbar an die saure Domäne anschließendes Fragment von 374 bp (Pos. 510 bis 883) wurde mit den Primern MV09 und MV10 amplifiziert. Als Sequenzierungs-Primer wurde MV09 verwendet. Die grün gefärbten Linien zeigen die tatsächlich gelesenen Bereiche (siehe auch Tabelle 1).

B zeigt die analysierten Regionen der Zinkfinger-Domäne mit drei vollständigen und einem verkrüppelten Zinkfinger der C₂H₂-Gruppe (Beyer, 1998). Die blau gefärbten PCR-Produkte wurden mit einer durch reverse Transkription von Gesamt-RNA gewonnenen Erststrang-cDNA als Matrize hergestellt. Der Bereich der ersten beiden Zinkfinger (Pos. 1112 bis 1259) wurde für insgesamt 37 Tumorzelllinien und für ektozervikale Keratinozyten analysiert. Dazu wurde mit den Primern MV13 und MV14 ein Fragment von 370 bp (Pos. 948 bis 1317) amplifiziert und mit Primer MV15 sequenziert. Die Region der Zinkfinger drei und vier (Pos. 1280 bis 1414) wurde in 17 Tumorzelllinien durch Sequenzierung eines mit den Primern MV15 und MV16 amplifizierten 307 bp-Fragments (Pos. 1122 bis 1428) mit Primer MV17 überprüft. Die tatsächlich gelesenen Bereiche sind durch grüne Linien repräsentiert. Die Bezeichnungen und Positionen der Primer, sowie die Größen der PCR-Produkte sind angegeben. Die waagerechten Linien, welche die Exon- und Intron-Regionen andeuten, sind durch senkrechte Striche voneinander abgegrenzt. (BTB, BTB-Domäne; SD, saure Domäne; ZF, Zinkfinger; UTR, untranslatierte Region)

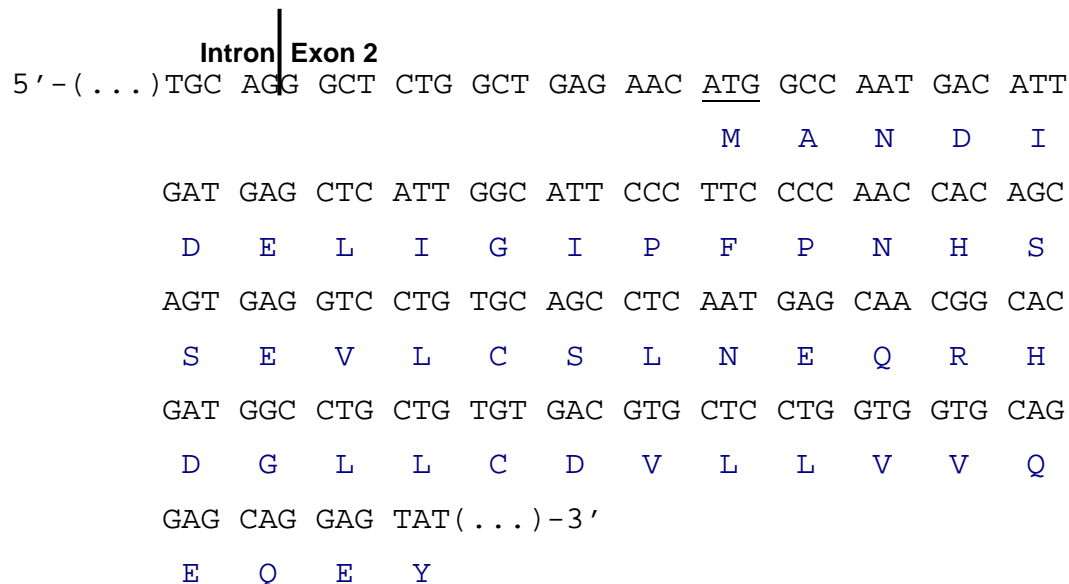


Abbildung 2: Sequenzierung des Anfangs von Exon 2 des *APM-1*-Gens aus der Zervixkarzinom-Zelllinie ME180

Das mit Primer MV25 und MV26 aus genomischer DNA der Zelllinie ME180 amplifizierte 1631 bp-Fragment wurde mit Primer MV25 ansequenziert. Die Sequenz wurde über 156 Nucleotide von Position -5 bis Position 151 im Übergangsbereich Intron-Exon 2 gelesen und mit der bekannten *APM-1*-Sequenz verglichen. Als Position 1 ist das erste Nucleotid von Exon 2 definiert. Die Intron/Exon-Grenze ist durch einen senkrechten Strich markiert. Das unterstrichene ATG-Startcodon kennzeichnet den Beginn des offenen Leserahmens des *APM-1*-Gens. Die Übersetzung in Aminosäuren ist angegeben.

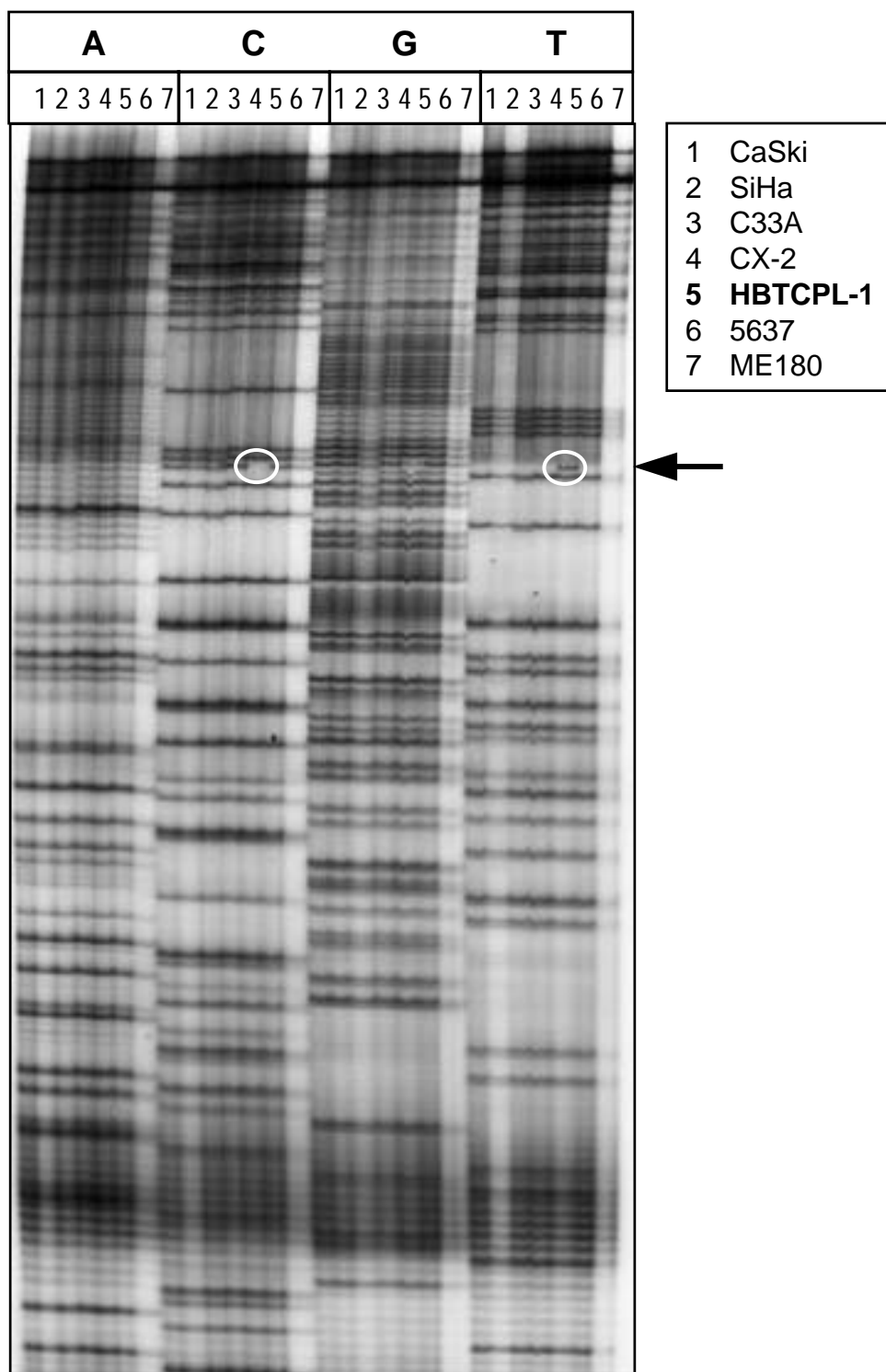


Abbildung 3: Sequenzierung des zweiten Teils der BTB-Domäne und der sauren Domäne mit Primer MV07 von Position 291 bis 623 des *APM-1*-Gens aus Tumorzelllinien verschiedener Gewebe

Die Analyse der Sequenzierungsprodukte wurde in einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel vorgenommen. A, C, G und T bezeichnet den in den jeweiligen Spuren aufgetragenen Nucleotid-Ansatz. Die Namen der untersuchten Zelllinien sind angegeben. Als Referenz für das zu untersuchende Sequenzmuster wurde die sequenzierte ME180-DNA aufgetragen. Auf Höhe des Pfeils ist eine Abweichung gegenüber ME180 im Sequenzierungsprodukt der Harnblasenkarzinom-Zelllinie HBTCPL-1 durch zwei Kreise markiert. Es handelt sich um einen Austausch von C durch T (siehe auch Abbildung 4).

Von den insgesamt 59 Tumorzelllinien wurden 48 durch Sequenzierung von überlappenden PCR-Fragmenten mit den Primern SB09, MV07 und MV09 auf einer zusammenhängenden Strecke von insgesamt 820 bp (Pos. 1 bis 820) überprüft. Dieser Bereich umfasst die 5'-Hälfte des Exons 2 mit der kompletten BTB-Domäne sowie der vollständigen sauren Domäne des *APM-1*-Gens, und reicht noch weitere 324 bp stromabwärts. Die restlichen elf Zelllinien wurden im Übergangsbereich Intron-Exon 2 mit den Primern MV25 und MV05 über insgesamt 200 bp von Position -5 bis 195, sowie mit den Primern MV07 und MV09 von Position 291 bis 820 analysiert (Abbildung 1 A).

Diese Untersuchungen führten zur Detektion eines einzigen Nucleotidaustausches in der Harnblasenkarzinom-Zelllinie HBTCPL-1 im Vergleich zur Referenz-Zelllinie ME180 (Abbildung 3). Um die Reproduzierbarkeit dieses Resultats sicher zu stellen, wurde die Sequenzierung des 383 bp-PCR-Produktes aus HBTCPL-1 mit Primer MV07 wiederholt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Mutation befindet sich in der sauren Domäne des *APM-1*-Gens an Position 445. Es handelt sich um eine C→T-Transition, die sich an der dritten Stelle des Codons befindet. Diese Transition bewirkt eine „stille Mutation“, da sowohl das Triplet GAC, das bei ME180 und den anderen überprüften Zelllinien gefunden wurde, als auch das bei HBTCPL-1 mutierte Triplet GAT für die Aminosäure Asparaginsäure codiert.

Auch die Analyse des Zinkfinger-Bereichs ergab den Nachweis von nur einer Punktmutation (Beyer, 1998). Die Mutation befindet sich im Genom der Colonkarzinom-Zelllinie CoLo-320 an Position 1219 des *APM-1*-Gens inmitten des zweiten Zinkfingers und liegt in Form einer C→T-Transition an der dritten Stelle des Codons vor. Es handelt sich ebenfalls um eine „stille Mutation“, da sowohl das Referenz-Triplet TTC, als auch das durch den Basenaustausch entstandene Triplet TTT für die Aminosäure Phenylalanin codiert.

Zusammenfassend wurden in insgesamt 59 untersuchten Tumorzelllinien aus sechs verschiedenen Geweben lediglich zwei Punktmutationen im offenen Leserahmen des *APM-1*-Gens gefunden. In beiden Fällen handelt es sich um Mutationen, die zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz des *APM-1*-Proteins führen. Dieser Befund erlaubt die Schlussfolgerung, dass Punktmutationen im codierenden Bereich des *APM-1*-Gens in menschlichen Tumoren nur selten auftreten. Funktionell inaktivierte Formen des *APM-1*-Proteins scheinen in Tumoren überhaupt nicht vorzuliegen.

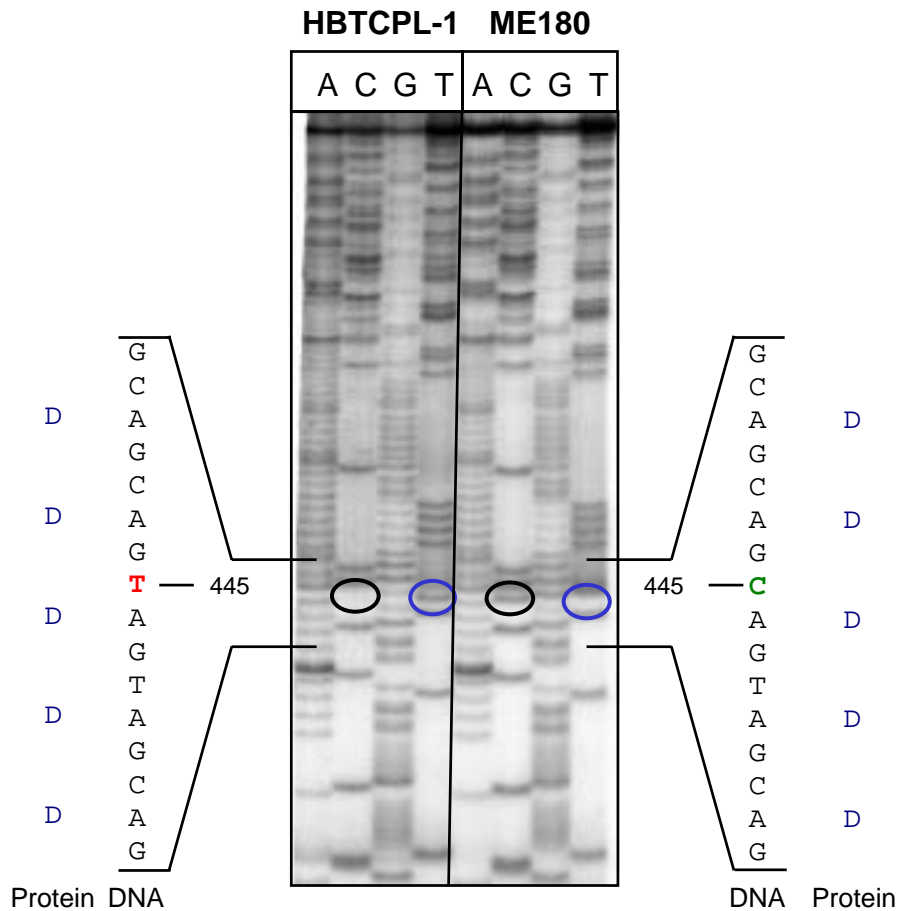


Abbildung 4: Sequenzierung des zweiten Teils der BTB-Domäne und der sauren Domäne mit Primer MV07 von Position 291 bis 623 des *APM-1*-Gens aus der Hamblasenkarzinom-Zelllinie HBTCP-1 (Ausschnitt)

Die Analyse der Sequenzierungsprodukte wurde in einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel vorgenommen. A, C, G und T bezeichnet den in den jeweiligen Spuren aufgetragenen Nucleotid-Ansatz. Der Name der untersuchten Zelllinie ist angegeben. Das Produkt der Zelllinie ME180 wurde als Referenz eingesetzt. Die schwarzen Kreise in den C-Spuren sowie die blauen Kreise in den T-Spuren markieren die Position des Nucleotidaustausches von C nach T im direkten Vergleich mit ME180. Seitlich ist ein Ausschnitt der gelesenen Nucleotidsequenz von Position 437 (unten) bis 452 (oben) mit der darin enthaltenen Mutation an Position 445 gezeigt. Die Übersetzung in Aminosäuren ist angegeben. „D“ ist die Einbuchstaben-Abkürzung für Asparaginsäure. Die Autoradiographie des Gels erfolgte über Nacht.

Tabelle 1: Sequenzanalyse von Abschnitten der proteincodierenden Region des *APM-1*-Gens zur Suche nach Punktmutationen – Zusammenfassung der Ergebnisse

Lfd. Nr.	Zelllinie	Gewebe	Suche nach Mutationen in <i>APM-1</i>					
			PCR-Produkt MV25-MV27 -64 – 684 Gelesene Sequenz: 1 – 290 Exon 2, BTB-Domäne (Teil 1)	M U T A T I O N	PCR-Produkt MV07-MV08: 286 – 630 Gelesene Sequenz: 291 – 623 Exon 2, BTB-Domäne (Teil 2) und saure Domäne	M U T A T I O N	PCR-Produkt MV09-MV10: 530 – 862 Gelesene Sequenz: 541 – 821 Exon 2, Bereich zwischen saurer Domäne und ZF-Domäne	M U T A T I O N
1	HeLa	Zervix- karzinom	*	-	#	-	×	-
2	ME180		*	-	#	-	×	-
3	SiHa		*	-	#	-	×	-
4	C4-I		*	-	#	-	×	-
5	C4-II		*	-	#	-	×	-
6	SW756		*	-	#	-	×	-
7	C33A		*	-	#	-	×	-
8	CaSki		*	-	#	-	×	-
9	HT-3		*	-	#	-	×	-
10	MRI-H215		*	-	#	-	×	-
11	MRI-H196		*	-	#	-	×	-
12	MRI-H186		*	-	#	-	×	-
13	MS751		*	-	#	-	×	-
14	DU145	Prostata- karzinom	*	-	#	-	×	-
15	LNCap		*	-	#	-	×	-
16	PC-3		*	-	#	-	×	-
17	RPMI-2650	Lungen- karzinom	*	-	#	-	×	-
18	LX-1		*	-	#	-	×	-
19	H-Messo-1		*	-	#	-	×	-
20	H-Messo-1a		*	-	#	-	×	-
21	A-427		*	-	#	-	×	-
22	LUTCML-54		*	-	#	-	×	-
23	LXF289		*	-	#	-	×	-

* = sequenziert mit Primer SB09 (Pos. 318 – 301)

= sequenziert mit Primer MV07 (Pos. 267 – 286)

× = sequenziert mit Primer MV09 (Pos. 510 – 530)

Tabelle 1: Sequenzanalyse von Abschnitten der proteincodierenden Region des *APM-1*-Gens zur Suche nach Punktmutationen – Zusammenfassung der Ergebnisse (Fortsetzung)

Lfd. Nr.	Zelllinie	Gewebe	Suche nach Mutationen in <i>APM-1</i>					
			PCR-Produkt MV25-MV27 -64 – 684 Gelesene Sequenz: 1 – 290 Exon 2, BTB-Domäne (Teil 1)	M U T A T I O N	PCR-Produkt MV07-MV08: 286 – 630 Gelesene Sequenz: 291 – 623 Exon 2, BTB-Domäne (Teil 2) und saure Domäne	M U T A T I O N	PCR-Produkt MV09-MV10: 530 – 862 Gelesene Sequenz: 541 – 821 Exon 2, Bereich zwischen saurer Domäne und ZF-Domäne	M U T A T I O N
24	AsPC-1	Pankreas- karzinom	**	-	#	-	×	-
25	A818-4		**	-	#	-	×	-
26	Capan-1		***	-	#	-	×	-
27	Capan-2		*	-	#	-	×	-
28	DanG		*	-	#	-	×	-
29	CFPac		**	-	#	-	×	-
30	CoLo-357		**	-	#	-	×	-
31	HPAF		**	-	#	-	×	-
32	MDH Panc		**	-	#	-	×	-
33	MiaPala2		*	-	#	-	×	-
34	Pala44		**	-	#	-	×	-
35	Panc Tu-1		**	-	#	-	×	-
36	Panc Tu-2		**	-	#	-	×	-
37	Pan T		*	-	#	-	×	-
38	Pan L		*	-	#	-	×	-
39	PL45		*	-	#	-	×	-
40	PT45	**	-	#	-	×	-	

* = sequenziert mit Primer SB09 (Pos. 318 – 301)

** = sequenziert mit Primer MV25 (Pos. -83 – -64)

*** = sequenziert mit Primer MV05 (Pos. 5 – 22)

= sequenziert mit Primer MV07 (Pos. 267 – 286)

× = sequenziert mit Primer MV09 (Pos. 510 – 530)

} gelesene Sequenz: -5 bis 195

Tabelle 1: Sequenzanalyse von Abschnitten der proteincodierenden Region des *APM-1*-Gens zur Suche nach Punktmutationen – Zusammenfassung der Ergebnisse (Fortsetzung)

Lfd. Nr.	Zelllinie	Gewebe	Suche nach Mutationen in <i>APM-1</i>					
			PCR-Produkt MV25-MV27 -64 – 684 Gelesene Sequenz: 1 – 290 Exon 2, BTB-Domäne (Teil 1)	M U T A T I O N	PCR-Produkt MV07-MV08: 286 – 630 Gelesene Sequenz: 291 – 623 Exon 2, BTB-Domäne (Teil 2) und saure Domäne	M U T A T I O N	PCR-Produkt MV09-MV10: 530 – 862 Gelesene Sequenz: 541 – 821 Exon 2, Bereich zwischen saurer Domäne und ZF-Domäne	M U T A T I O N
41	CX-1	Colon- karzinom	*	-	#	-	×	-
42	CX-2		*	-	#	-	×	-
43	SW48		*	-	#	-	×	-
44	LS174T		*	-	#	-	×	-
45	LS180		*	-	#	-	×	-
46	KM12		*	-	#	-	×	-
47	CXF94		*	-	#	-	×	-
48	CoLo-320		*	-	#	-	×	-
49	SW707		*	-	#	-	×	-
50	CaCo-2		*	-	#	-	×	-
51	HCT116		*	-	#	-	×	-
52	LoVo		*	-	#	-	×	-
53	HT-29		*	-	#	-	×	-
54	SW480		*	-	#	-	×	-
55	5637	Harnblasen- karzinom	*	-	#	-	×	-
56	RT112		*	-	#	-	×	-
57	EJ28		*	-	#	-	×	-
58	XF439		*	-	#	-	×	-
59	HBTCPL-1		*	-	#	+ ¹	×	-

* = sequenziert mit Primer SB09 (Pos. 318 – 301)

= sequenziert mit Primer MV07 (Pos. 267 – 286)

× = sequenziert mit Primer MV09 (Pos. 510 – 530)

¹ C→T Transition an Position 445