

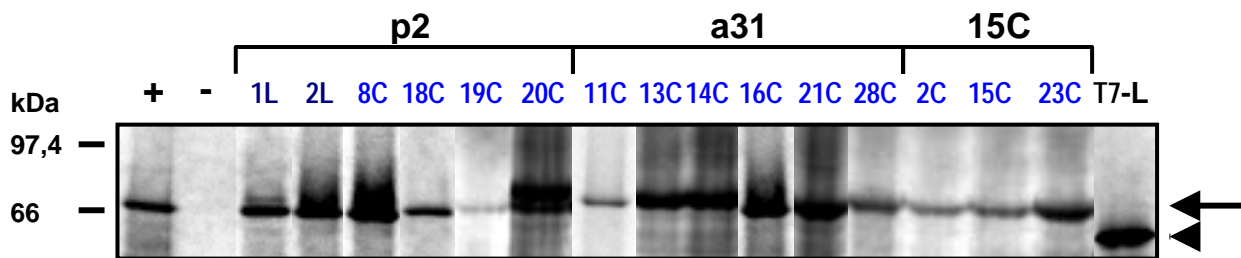
## 2.4. Expressionsprofil des *APM-1* Gens in menschlichen Tumorzellen

### 2.4.1. Gekoppelte *in-vitro*-Transkription/Translation der klonierten *APM-1*-cDNAs

Die in Kap. 2.3. dokumentierte Mutationsanalyse hatte ergeben, dass Punktmutationen in der proteincodierenden Region des *APM-1*-Gens in Tumorzelllinien nur sehr selten auftreten, und dass funktionell inaktivierte Formen des *APM-1*-Proteins scheinbar nicht vorkommen. Bestimmte Abschnitte der codierenden Region waren jedoch bei der Sequenzierung nicht erfasst worden. Daher wurde eine repräsentative Auswahl von in pBluescript klonierten cDNA-Fragmente aus den Tumorzelllinien LX-1 und CX-2 mit den authentischen *APM-1*-Transkripten als Matrize für eine gekoppelte *in-vitro*-Transkriptions-/Translationsreaktion eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Konstrukte die Synthese eines vollständigen *APM-1*-Genprodukts ermöglichen.

Die Reaktionen wurden mit Hilfe des „TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation“-Systems durchgeführt (Hurst *et al.*, 1996). In Abbildung 1 ist das Autoradiogramm nach SDS-PAGE der Proteine gezeigt. Das *APM-1*-Gen kodiert für ein Genprodukt von 619 Aminosäuren (Reuter *et al.*, 1998). Daraus ergibt sich für das Protein ein berechnetes Molekulargewicht von rund 69 kDa. Die Reaktionsansätze aller cDNAs und der Positivkontrolle (pSG5-*APM-1*) resultieren nach Auftrennung im Gel in Banden kurz oberhalb der 66 kDa-Bande des Molekulargewicht-Standards. Das Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass von den aus LX-1 und CX-2 isolierten cDNA-Fragmenten ein vollständiges *APM-1*-Protein produziert wird. Folglich sind zumindest bei diesen cDNAs auch in den zuvor nicht sequenzierten Bereichen keine Punktmutationen vorhanden, die zu einer Verkürzung des Proteins führen.

Die 5'-UTRs der klonierten cDNAs sind sehr lang (p2:167 bp, a31: 460 bp, 15C: 484 bp) und GC-reich. Solche Eigenschaften begünstigen die Bildung von Sekundärstrukturen, welche die Translationsinitiation inhibieren können (Clemens und Bommer, 1999). Es wurde deshalb überprüft, ob in der gekoppelten *in-vitro*-Transkription/Translation der cDNAs ein Einfluss der 5'-UTRs auf die Translationseffizienz des *APM-1*-Gens zu erkennen ist. Als Positivkontrolle wurde die in pSG5 klonierte *APM-1*-cDNA mit einer UTR von nur wenigen Nucleotiden Länge verwendet. Das Translationsprodukt erzeugt ein deutliches Signal auf erwarteter Laufhöhe. Bei den Konstrukten mit den wesentlich längeren UTRs von p2, a31 und 15 C wird das Protein in vergleichbaren Mengen wie bei der Positivkontrolle hergestellt (Abbildung 1). Somit geht aus diesem Experiment keine hemmende Wirkung der 5'-UTRs auf die Effizienz der *APM-1*-Translation hervor.



**Abbildung 1: Gekoppelte *in-vitro*-Transkription/Translation der klonierten cDNAs aus den Tumorzelllinien LX-1 und CX-2**

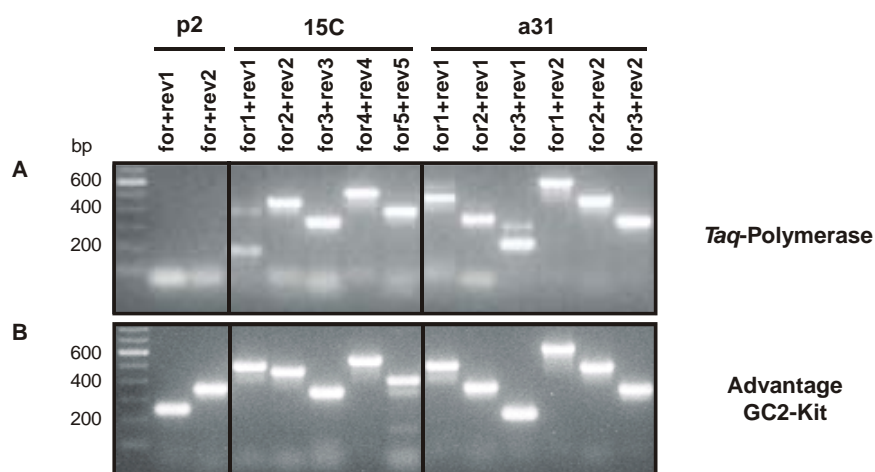
Zur Analyse der Translationsprodukte im 10 %-igen SDS-PAG wurden jeweils 6  $\mu$ l der Reaktionsansätze mit je 1-2  $\mu$ g Matrizen-cDNA zusammen mit je 20  $\mu$ l 1  $\times$  Probenpuffer aufgetragen. Die Bezeichnungen der Konstrukte sind angegeben. „L“ steht für die Herkunft aus LX-1, „C“ für die Herkunft aus CX-2. Die einzelnen Konstrukte sind den drei 5'-UTR-Klassen zugeordnet. In der mit „+“ gekennzeichneten Spur wurde als Positivkontrolle ein Ansatz mit pSG5-APM-1-DNA als Matrize, in der mit „-“ gekennzeichneten Spur als Negativkontrolle ein Ansatz mit pSG5-APM-1-as-DNA als Matrize aufgetragen. Die durch den Pfeil gekennzeichneten Banden repräsentieren das APM-1-Protein. Zur Kontrolle für die Funktionsfähigkeit des Systems wurde in der mit „T7-L“ bezeichneten Spur 1  $\mu$ l eines Ansatzes mit 1  $\mu$ g des vom Hersteller mitgelieferten T7-Luciferase-Plasmids als Matrize aufgetragen. Die Pfeilspitze markiert das monomere Luciferase-Protein mit einem Molekulargewicht von 61 kDa. Als Größenstandard wurden 10  $\mu$ l des Molekulargewicht-Standards „Rainbow“ eingesetzt. Die Autoradiographie entstand nach 3-tägiger Exposition des fixierten und getrockneten Gels auf Röntgenfilm.

#### **2.4.2. RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression in Zelllinien aus Tumoren verschiedener Gewebe**

Aus den Ergebnissen der cDNA-Analysen wurde gefolgert, dass die Transkription des *APM-1*-Gens an mindestens drei verschiedenen Promotoren initiiert wird. In den Zelllinien LX-1 und CX-2 werden offenbar alle drei Promotoren für den Transkriptionsstart benutzt. Um zu bestimmen, welche der Promotoren in anderen Tumorzelllinien aktiv sind, wurden Abschnitte der 5'-UTR-Klassen p2, a31 und 15C durch reverse Transkription (RT) von Gesamt-RNA mit angeschlossener PCR (RT-PCR) analysiert. Der Nachweis eines 5'-UTR-spezifischen RT-PCR-Produkts wird mit einer Initiation der *APM-1*-Transkription am unmittelbar vorgeschalteten Promotor korreliert. Im weiteren Text wird dieser Interpretationsschritt, bei dem die Detektion eines Signals als Aktivität eines Promotors gedeutet wird, gegebenenfalls nicht explizit erwähnt, sondern zusammenfassend mit dem Befund von Promotoraktivität umschrieben. In gleicher Weise wird die Amplifikation eines RT-PCR-Produkts im proteincodierenden Bereich der Exons 2 und 3 als Referenz für die Expression des gesamten *APM-1*-Gens genommen.

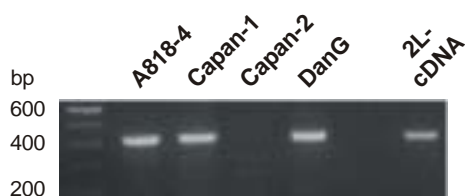
Für die Analyse der 5'-UTR-Regionen wurden zunächst Test-PCRs mit jeweils drei verschiedenen Primer-Kombinationen und zwei verschiedenen Amplifikationssystemen durchgeführt, um Spezifität und Sensitivität überprüfen zu können. Zur Vermeidung möglicher Kontaminationen mit genomischer DNA wurden die Primer so ausgesucht, dass sich die hergestellten Amplifikate über die Exon-Grenzen hinweg erstrecken. Mit klonierter cDNA als Matrize und *Taq*-Polymerase konnten bei 15C und a31 mit allen eingesetzten Primer-Kombinationen Produkte von erwarteter Größe amplifiziert werden (Abbildung 2 A). Für die weiteren RT-PCR-Analysen wurde in beiden Fällen die Kombination „for2+rev2“ verwendet, da jeweils Banden mittlerer Laufhöhe (zwischen 400 und 500 bp) ohne Hintergrund produziert wurden. Bei p2 ergaben sich PCR-Produkte dagegen nur mit Hilfe des GC2-Kits (Abbildung 2 B), dessen Komponenten speziell für GC-reiche Matrizen-DNA mit Tendenz zur Überstruktur-Bildung entwickelt wurden. Für die weiteren Experimente mit p2 wurde zunächst die Kombination „for+rev2“ ausgewählt. Bei den PCRs mit Erststrang-cDNAs aus den RT-Reaktionen resultierten bei p2 jedoch zahlreiche unspezifische Zusatzbanden (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde eine weitere Kombination von längeren Primern mit höherem Schmelzpunkt ausgesucht. Ein Test mit verschiedenen Erststrang-cDNAs als Matrize zeigte mit der Kombination „for2(MV55)+rev3(MV56)“ nur noch ein spezifisches PCR-Produkt von erwarteter Größe (Abbildung 3).

Die Bezeichnungen, Größen und Positionen der amplifizierten PCR-Fragmente, der Primer und der Oligonucleotid-Sonden sind in Tabelle 1 und Abbildung 4 zusammengestellt.



**Abbildung 2: Test-PCR mit klonierter cDNA und verschiedenen 5'-UTR-Primerkombinationen**

Gezeigt sind Ergebnisse von PCRs mit *Taq*-Polymerase (A) und bei Verwendung des GC2-Kits (B). Die verwendeten Primer-Kombinationen sind angegeben und den verschiedenen 5'-UTR-Klassen zugeordnet. Als Matrize wurden je 10 ng cDNA der Klone 2L (für p2), 15C (für 15C) und 11C (für a31) eingesetzt. Die Reaktionen wurden mit je 30 pmol Primer bei 65 °C „Annealing“-Temperatur und 35 Zyklen durchgeführt. Die Auftrennung von jeweils 1/5 der Reaktion erfolgte in einem 2 %-igen Agarosegel. Ausgewählte Fragmentgrößen der als Größenstandard verwendeten 100 bp-Leiter sind angegeben (in bp).



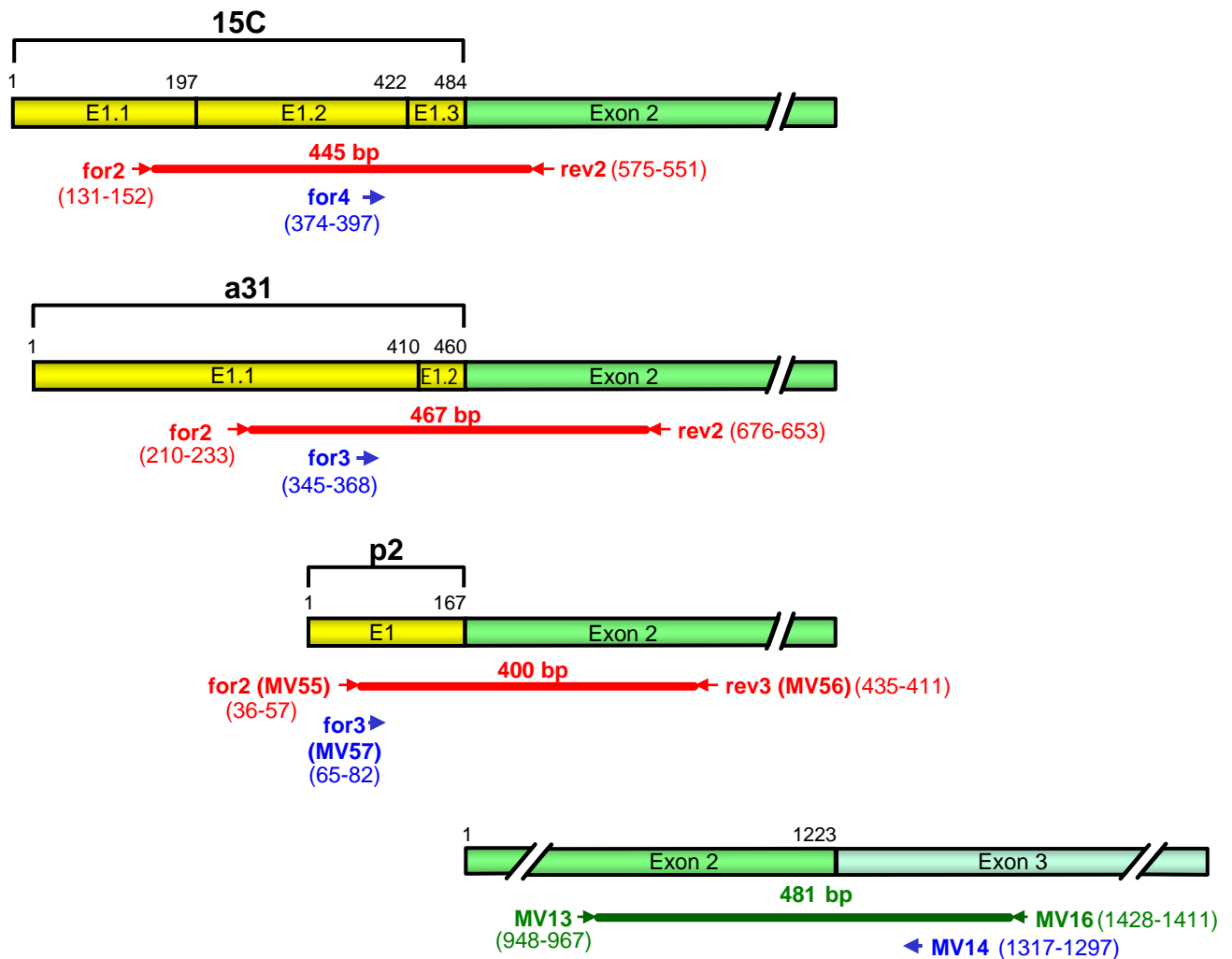
**Abbildung 3: Test-PCR der Primer-Kombination „p2-for2(MV55)+p2rev3(MV56)“ mit Erststrang-cDNAs aus Pankreaskarzinom-Zelllinien und klonierter cDNA**

Die Reaktionen wurden mit je 1/20 der RT-Reaktionen von Gesamt-RNA der angegebenen Zelllinien sowie 10 ng klonierter 2L-cDNA und je 30 pmol Primer bei 70 °C „Annealing“-Temperatur und 35 Zyklen durchgeführt. Je 1/5 der RT-PCRs und 1/25 der 2L-PCR wurde in einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Ausgewählte Fragmentgrößen der als Größenstandard verwendeten 100 bp-Leiter sind angegeben (in bp).

**Tabelle 1: PCR-Fragmente, Primer und Sonden zur RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression**

Gen	Exon	PCR-Fragment	Primer	Sonde
<i>APM-1</i>	1/2 5'-UTR-Klasse 15C	445 bp Pos. 131-575	15C-for2, Pos. 131-152 15C-rev2, Pos. 575-551	15C-for4 Pos. 374-397
	1/2 5'-UTR-Klasse a31	467 bp Pos. 210-676	a31-for2, Pos. 210-233 a31-rev2, Pos. 676-653	a31-for3, Pos. 345-368
	1/2 5'-UTR-Klasse p2	400 bp Pos. 36-435	p2-for2 (MV55), Pos. 36-57 p2-rev3 (MV56), Pos. 435-411	p2-for3 (MV57) Pos. 65-82
	2/3	481 bp Pos. 948-1428	MV13, Pos. 948-967 MV16, Pos. 1428-1411	MV14 Pos. 1317-1297
<i>GAPDH</i> <sup>a</sup>	2-4	226 bp Pos. 81-306	GAPDH-for, Pos. 81-99 GAPDH-rev, Pos. 306-287	GAPDH-Probe Pos. 277-258

Die angegebenen Positionen beziehen sich jeweils auf die Erststrang-cDNAs mit Beginn bei Position 1.  
<sup>a</sup> verwendet zur internen Standardisierung



**Abbildung 4: RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression: cDNA-Strukturen, PCR-Produkte und Oligonucleotid-Positionen**

Die vier Balken repräsentieren die jeweils als PCR-Matrize dienenden cDNAs. Die drei verschiedenen Klassen der 5'-untranslatierten Exons 1 sind gelb gefärbt, die proteincodierenden Exons 2 und 3 sind in grün gehalten. Die roten Linien deuten die PCR-Produkte an den Exon 1/2-Übergängen an, die dunkelgrüne Linie steht für das PCR-Produkt am Exon 2/3-Übergang. Die Oligonucleotide-Sonden sind blau gefärbt. Die cDNAs, PCR-Produkte, Primer und Sonden sind maßstabsgetreu und positionsgenau eingezeichnet. Die Sequenzdaten wurden von E. Schwarz zur Verfügung gestellt.

Untersucht wurden die zytoplasmatischen RNAs aus insgesamt 13 Colon-, 13 Zervix-, 8 Lungen-, 4 Pankreas- und 6 Harnblasenkarzinom-Zelllinien, sowie Proben aus ektozervikalen Keratinozyten und zwei primären Zervixfibroblasten-Kulturen.

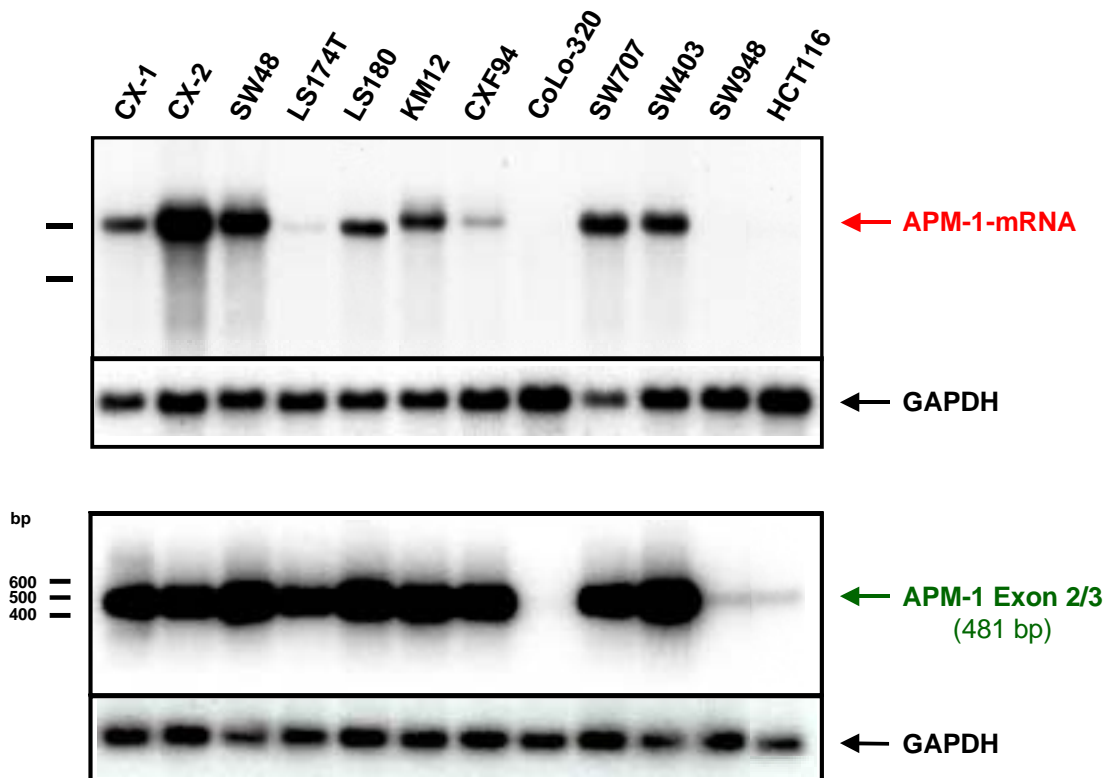
In Abbildung 5 ist zunächst die repräsentative Gegenüberstellung einer Northern-Analyse des *APM-1*-Transkripts und einer RT-PCR-Analyse des Exon 2/3-Übergangs für 12 Colonkarzinom-Zelllinien gezeigt. Die auffälligen Unterschiede in den mRNA-Mengen, die aus der Northern-Analyse klar hervorgehen, sind in der RT-PCR-Analyse nicht zu erkennen. Dies wird besonders deutlich am Beispiel des Vergleichs der stark exprimierenden Linie CX-2 mit der schwach exprimierenden Linie LS174T. Die größere Sensitivität der RT-PCR-Methode zeigt sich im Fall von

SW948 und HCT116. Während beide Zelllinien aufgrund der Northern-Analyse als *APM-1*-negativ einzustufen sind, ist mit der RT-PCR eine *APM-1*-Expression nachweisbar. Die einzige Colonkarzinom-Zelllinie, die sowohl in der Northern- als auch in der RT-PCR-Analyse keine Genexpression aufweist, ist CoLo-320.

Eine Northern-Analyse erlaubt nach Abgleich mit einem internen Standard (z. B. GAPDH) die relative Quantifizierung der produzierten mRNA, da die Signalintensität mit der ursprünglichen Transkriptmenge korreliert. Dies ist bei einer RT-PCR-Analyse unter Standardbedingungen nicht der Fall. Zwar kann ein schwaches oder fehlendes Signal auch hier als Hinweis auf sehr wenig oder gar keine RNA in den Proben gedeutet werden. Ein starkes Signal kann jedoch nicht in jedem Fall mit großen RNA-Mengen gleich gesetzt werden.

Im Verlauf einer PCR akkumulieren die Reaktionsprodukte entsprechend der Amplifikationseffizienz. Diese Effizienz bleibt im linearen Bereich der Reaktion konstant und fällt zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder ab. Dann verlangsamt sich auch die Geschwindigkeit der Produktakkumulation und nähert sich einem „Plateau“. Wenn die PCR-Reaktionen mit Zyklenzahlen ausgeführt werden, die zum Erreichen dieses Plateaus führen, werden Unterschiede in der Menge der Ausgangsprodukte nicht korrekt erfasst. Beispielsweise kann bei einer Probe ein Signal gleicher Stärke erzeugt werden wie bei einer anderen Probe mit 10-fach höherer Ausgangsmenge, weil bei der Probe mit weniger Material weiter Produkt akkumuliert wird, während die andere bereits ihre maximale Amplifikation erreicht hat (Yap *et al.*, 1994).

Mit den RT-PCR-Analysen der vorliegenden Arbeit wurde in erster Linie das Ziel verfolgt, durch ein Höchstmaß an Sensitivität möglichst zuverlässige qualitative Aussagen zu erhalten. Sie wurden deshalb mit Zyklenzahlen vorgenommen, die zu einer Amplifikation jenseits des linearen Bereichs führten. Für quantitative Aussagen sind die RT-PCRs wie hier durchgeführt daher nur sehr eingeschränkt geeignet.



**Abbildung 5: Vergleich von Northern-Analyse und RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression in Colonkarzinom-Zelllinien**

**A** zeigt die Northern-Analyse der 12 Colonkarzinom-Zelllinien nach Auftrennung von je 4  $\mu\text{g}$  poly(A)<sup>+</sup>-RNA in einem 1 %-igen Agarosegel. Die Bezeichnungen der Zelllinien sind angegeben. Die stringente Hybridisierung nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde mit Sonde „1160“ durchgeführt, welche ein 1160 bp-*Sad*-Fragment der 3'-UTR in Exon 3 repräsentiert. Der rote Pfeil markiert das *APM-1*-Transkript mit einer Länge von ca. 4,8 kb. Die Querbalken zeigen die Positionen der 28S- und 18S-rRNA an. Zur internen Standardisierung mit Hilfe des Haushaltsgens für Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (*GAPDH*) wurde die Membran mit der Oligonucleotid-Sonde *GAPDH*-Probe nachhybridisiert. Der schwarze Pfeil markiert das detektierte Produkt. Die Daten dieser Analyse wurden freundlicherweise von E. Schwarz zur Verfügung gestellt.

Die in **B** gezeigte RT-PCR wurde im „Zwei-Schritt-Verfahren“ durchgeführt. Zunächst erfolgte eine reverse Transkription mit je 1  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA und einem Zufallsdekamer-Primer. Für die anschließende PCR wurde je 1/20 der RT-Reaktion eingesetzt. Nach Auftrennung von 1/5 der PCR-Reaktionen in einem 2 %-igen Agarosegel und Southern Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte eine stringente Hybridisierung mit der Oligonucleotid-Sonde MV14. Der grüne Pfeil markiert das PCR-Produkt mit der in Klammern angegebenen erwarteten Länge. Für die interne Standardisierung wurden die Erststrang-cDNAs der RT-Reaktion in einer weiteren PCR zur Amplifikation eines Fragments des *GAPDH*-Gens verwendet. Für die *GAPDH*-PCR wurde 1/6 der Primermenge eingesetzt, die für die PCRs der *APM-1*-Exons verwendet wurde. Die *GAPDH*-Hybridisierung erfolgte mit der Oligonucleotid-Sonde *GAPDH*-Probe. Der schwarze Pfeil markiert das detektierte Produkt. Ausgesuchte Banden der als Größenstandard benutzten 100 bp-Leiter und deren Fragmentlängen (in bp) sind eingezeichnet.

Die Ergebnisse der RT-PCR Analysen für die 5'-UTR-Klassen 15C, a31 und p2, sowie für den Exon 2/3-Bereich sind in Abbildung 6 A bis F zusammengestellt. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die durch Northern- und RT-PCR-Analyse ermittelten Genexpressionsdaten.

Die Colonkarzinom-Zelllinien zeigen in insgesamt 12 von 13 getesteten Linien eine *APM-1*-Genexpression (Abbildung 6 A). Produkte, in denen eine p2-5'-UTR enthalten ist, sind mit Ausnahme von SW948 in allen Zelllinien mit Exon 2/3-Produkt nachweisbar. Bei a31 deutet das Signalmuster nur in 5 Fällen auf eine klare Promotoraktivität hin, außerdem zeigen sich schwache Signale bei LS180 und SW948. Die 15C-spezifischen RT-PCRs weisen ein ähnliches Muster wie bei a31 auf. Zusätzlich ist eine klare Signal bei CXF94, und ein sehr schwaches bei CaCo-2 zu verzeichnen. LS180 und SW948 sind dagegen 15C-negativ.

Von den 13 Zervixkarzinom-Zelllinien weisen anhand der RT-PCR-Analyse insgesamt 10 *APM-1*-Expression auf (Abbildung 6 B). In der Northern-Analyse war das *APM-1*-Transkript hingegen nur in den Linien MRI H-196 und C4-II sowie in ektozervikalen Keratinozyten nachweisbar (Reuter *et al.*, 1998). Allerdings zeigen diese Proben auch die stärksten Exon 2/3-spezifischen Signale in der RT-PCR. Negativ sind HeLa, C4-I und MRI H-186, ebenso beide Fibroblasten-Kulturen. Transkripte mit einer 5'-UTR der p2-Klasse werden in 5 von 13 Zelllinien produziert. Ein a31-spezifisches Signal ist lediglich bei CaSki vorhanden. Sie ist die einzige aller analysierten Zelllinien, bei der ausschließlich von diesem Promotor die *APM-1*-Expression auszugehen scheint. Für 15C zeigt sich nur in den Zelllinien C4-II und MRI H-196 ein schwaches Signal.

Einen Spezialfall stellt die Zelllinie ME180 dar. Das deutliche Signal im Exon 2/3-Bereich stammt von den viral-zellulären Hybridtranskripten, die vom Promotor des integrierten HPV-Genoms gestartet werden (Reuter *et al.*, 1998). Gleichzeitig wird aber offenbar keiner der zellulären, *APM-1*-eigenen Promotoren als Transkriptionsstart benutzt. Damit zeigen die RT-PCR-Daten, dass *APM-1* in ME180-Zellen nur als Bestandteil einer viral-zellulären Hybrid-mRNA aberrant transkribiert wird.

Eine heterogene *APM-1*-Expression ist bei 7 von 8 untersuchten Lungenkarzinom-Zelllinien zu erkennen, bei 3 davon allerdings mit nur sehr schwachen Signalen (Abbildung 6 C). A-549 ist vollständig negativ. In 4 der 7 positiven Zelllinien ist p2-Produkt nachweisbar, ebenso a31. 15C-Produkt ist in nur 3 Zelllinien schwach nachweisbar. Bei RPMI 2650 scheint die insgesamt schwache *APM-1*-Expression (vgl. Exon 2/3-Produkt) vorrangig auf Transkriptionsinitiation am 15C-Promotor zurückzuführen zu sein.



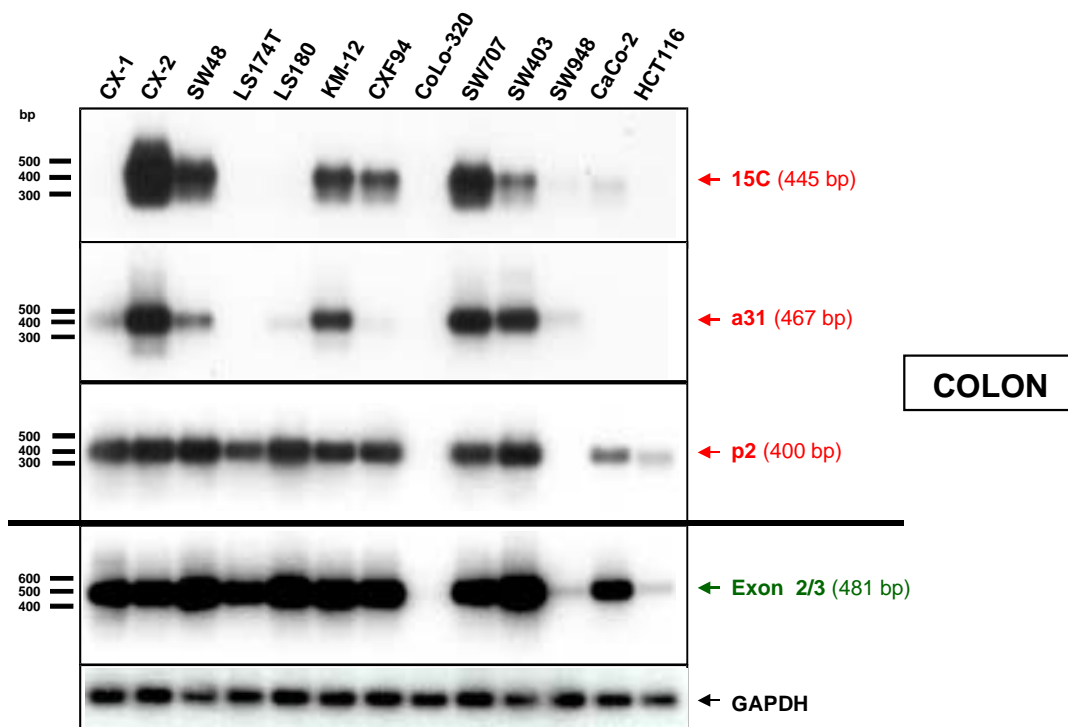
Von 4 untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien zeigen 3 *APM-1*-Expression (Abbildung 6 D). Capan-2 ist negativ. Die Signalmuster der p2- und a31-UTR-spezifischen RT-PCRs stimmen mit dem Profil der Exon 2/3-spezifischen RT-PCRs überein. Ein Transkriptionsstart am 15C-Promotor scheint nur in A818-4 zu erfolgen.

Bei den Harnblasenkarzinom-Zelllinien ist Exon 2/3-Produkt in 3 von 6 Fällen mit starkem Signal (RT112, RT4 und XF439, Abbildung 6 E), bei EJ28 und HBTCPL-1 mit schwachem Signal zu verzeichnen. Die einzige *APM-1*-negative Zelllinie ist 5637. Ein starkes p2-Signal zeigt sich bei RT4 und XF439. Ein a31-Produkt ist nur in XF439, ein 15C-Produkt dagegen in RT112, RT4 und XF439 zu beobachten. RT112 ist die einzige der untersuchten Zelllinien, bei der die RNA-Synthese hauptsächlich vom 15C-Promotor ausgeht.

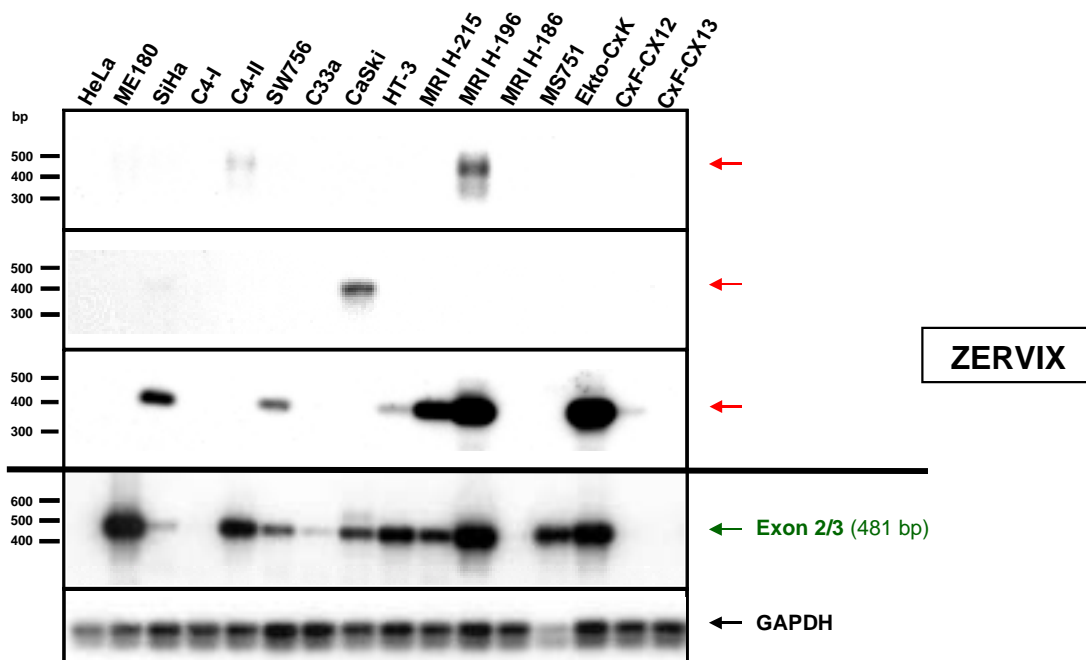
In der Gesamtbetrachtung weisen die insgesamt 47 durch RT-PCR analysierten Tumorzelllinien aus fünf Gewebstypen, sowie die normalen Keratinozyten und primären Fibroblasten eine ausgeprägt heterogene *APM-1*-Genexpression auf. Hervorzuheben ist, dass in normalen Keratinozyten *APM-1* eindeutig exprimiert wird. An den Colonkarzinom-Zelllinien wurde beispielhaft gezeigt, dass das Ergebnis der RT-PCR-Analyse im Exon 2/3-Bereich das Resultat der Northern-Analyse qualitativ bestätigt und als Referenz für die *APM-1*-Gesamtexpression geeignet ist (Abbildung 5). Dies lässt sich auch auf die anderen Gewebe übertragen (siehe Tabelle 2). Der Vergleich macht aber ebenso deutlich, dass quantitative Aussagen anhand der RT-PCR-Resultate nur sehr bedingt möglich sind.

In fast allen Fällen (33 von 37), in denen Exon 2/3-Produkt nachweisbar ist und folglich *APM-1* exprimiert wird, ist auch p2-Produkt nachweisbar. Daraus lässt sich schließen, dass der p2-Promotor in *APM-1*-exprimierenden Tumorzelllinien meist aktiv ist. Das a31-Produkt ließ sich in 16 von 37 *APM-1*-positiven Fällen detektieren. Die einzige Zelllinie, in der ausschließlich ein a31- und kein anderes 5'-UTR-spezifisches Signal nachzuweisen war, ist die Zervixkarzinom-Zelllinie CaSki. In diesem Fall scheint die insgesamt schwache *APM-1*-Expression (Reuter *et al.*, 1998) nur auf a31-Promotoraktivität zurückzugehen. Bei 15C ergeben die RT-PCR-Analysen gewisse Hinweise auf eine gewebsspezifische Promotoraktivität. Bei Colon und Harnblase weisen die Mehrzahl, bzw. alle *APM-1*-positiven Zelllinien Transkripte mit 5'-UTR vom Typ 15C auf, während dies bei den Lungenkarzinom-Zelllinien nicht der Fall ist. Analog zur a31-Promotoraktivität bei CaSki stellen die Karzinom-Zelllinien RT112 (Harnblase) und RPMI 2650 (Lunge) gleichfalls Ausnahmen dar, weil die *APM-1*-Expression in erster Linie am 15C-Promotor gestartet zu werden scheint.

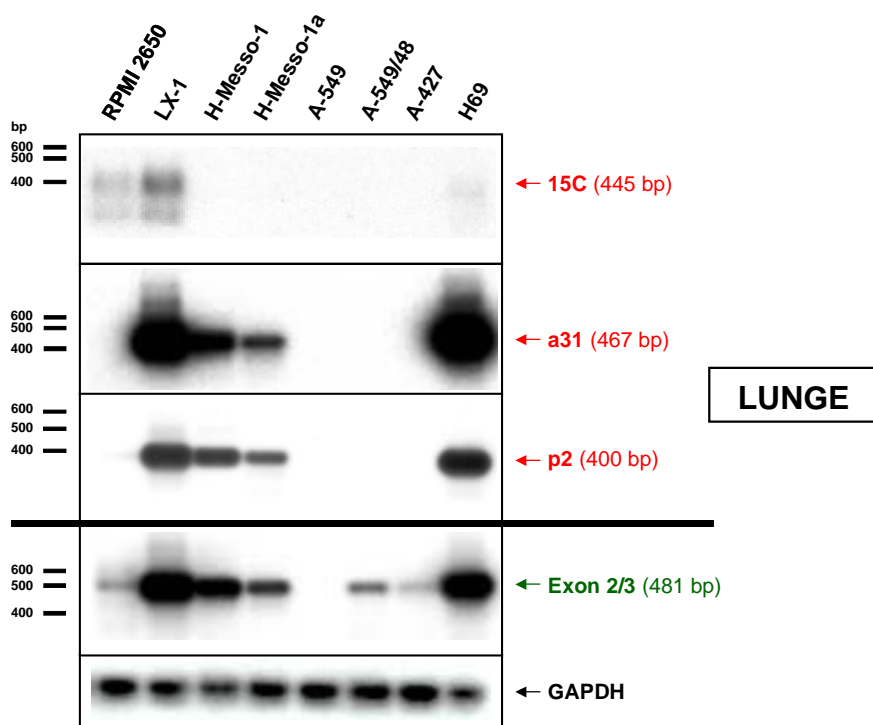
**A**



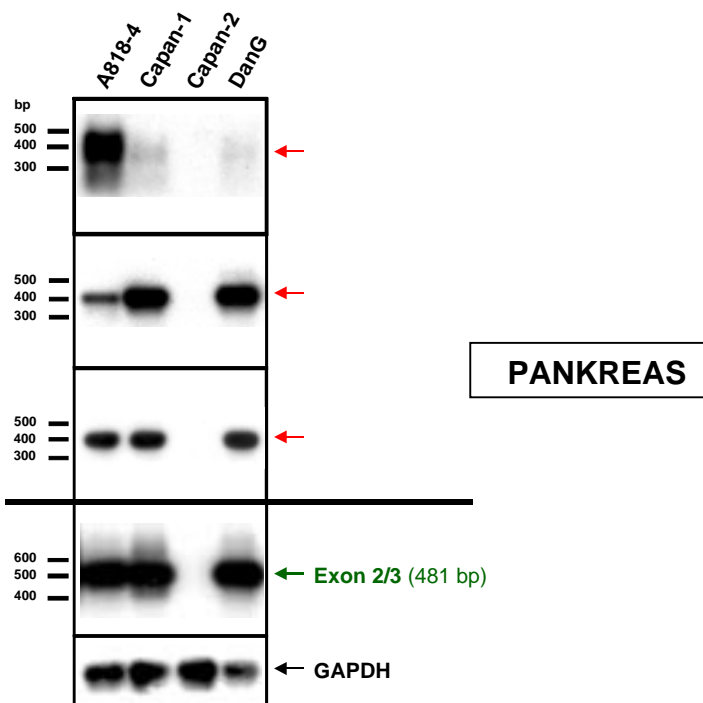
**B**

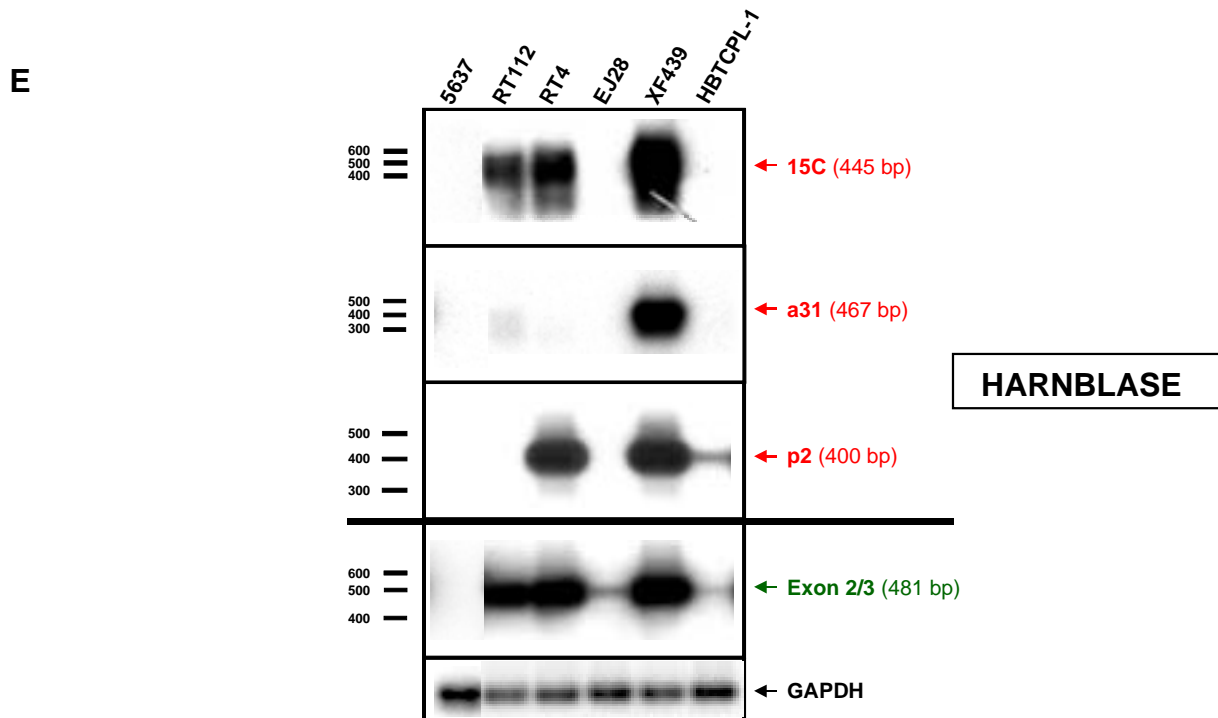


C



D





**Abbildung 6: RT-PCR-Analyse der *APM-1* Genexpression in Tumorzelllinien verschiedener Gewebe, ektozervikalen Keratinozyten und Zervixfibroblasten**

Gezeigt sind die RT-PCR-Analysen mit Zelllinien aus 13 Colon- (A), 13 Zervix- (B), 8 Lungen- (C), 4 Pankreas- (D) und 6 Harnblasenkarzinomen (E). Die Bezeichnungen der Zelllinien sind angegeben. In B sind zusammen mit den Zervixkarzinom-Zelllinien Proben von ektozervikalen Keratinozyten (Ekto-CxK) und zwei primären Zervixfibroblasten-Kulturen (CxF-CX12 und -CX13) dargestellt. Die RT-PCRs wurden im „Zwei-Schritt-Verfahren“ durchgeführt. Zunächst erfolgte eine reverse Transkription (RT) mit je 1 µg Gesamt-RNA und einem Zufallsdekamer-Primer. Für die anschließenden PCRs sowohl im Bereich der 5'-UTRs, als auch der Exons 2 und 3 wurde je 1/20 der selben RT-Reaktion eingesetzt. Nach Auftrennung von 1/5 der PCR-Reaktionen in einem 2 %-igen Agarosegel und Southern Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte eine stringente Hybridisierung mit den Oligonucleotid-Sonden 15C-for4 für 15C, a31-for3 für a31, p2-for3 (MV57) für Exon p2 und MV14 für Exon 2/3. Die Pfeile in rot (Exon 1/2) und grün (Exon 2/3) markieren die jeweiligen PCR-Produkte mit der in Klammern angegebenen erwarteten Länge. Zur internen Standardisierung wurden die Erststrang-cDNAs der RT-Reaktion in einer weiteren PCR zur Amplifikation eines *GAPDH*-Fragments verwendet. Für die *GAPDH*-PCR wurde 1/6 der Primermenge eingesetzt, die für die PCRs der *APM-1*-Exons verwendet wurde. Die *GAPDH*-Hybridisierung erfolgte mit der Oligonucleotid-Sonde *GAPDH*-Probe. Der schwarze Pfeil markiert das detektierte Produkt. Ausgesuchte Banden der als Größenstandard benutzten 100 bp-Leiter und deren Fragmentlängen (in bp) sind eingezeichnet.

**Tabelle 2: Vergleich von Northern- und RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression in Tumorzelllinien verschiedener Gewebe und in ektozervikalen Keratinozyten**

Lfd. Nr.	Zelllinie	Gewebe	Northern-Analyse <sup>a</sup> (Signalintensität) <sup>c</sup>	RT-PCR-Analyse <sup>b</sup> (Signalintensität) <sup>c</sup>			
				Exon 2/3	Exon 1/2		
					15 C	a31	p2
1	<b>CX-2</b>	<b>Colon-karzinom</b>	+++	+++	+++	+++	++
2	<b>SW48</b>		++	+++		+	++
3	<b>HT-29</b>		++	n.b.			
4	<b>LoVo</b>		++	n.b.			
5	<b>CX-1</b>		++	+++	-	+	++
6	<b>SW480</b>		++	n.b.			
7	<b>SW707</b>		++	+++	+++	++	++
8	<b>SW403</b>		++	+++	++	++	+
9	<b>LS174T</b>		+	+++	-	-	++
10	<b>LS180</b>		+	+++	-	+	++
11	<b>CXF94</b>		+	+++	++	-	++
12	<b>KM-12</b>		+	+++	++	++	++
13	<b>HCT116</b>		-	+	-	-	+
14	<b>CaCo-2</b>		-	++	+	-	+
15	<b>SW948</b>		-	+	-	+	-
16	<b>CoLo-320</b>		-	-	-	-	-
17	<b>ME180</b>	<b>Zervix-karzinom</b>	+++ <sup>d</sup>	+++	-	-	-
18	<b>HeLa</b>		-	-	-	-	-
19	<b>C4-II</b>		+	++	+	-	-
20	<b>MRI-H196</b>		+	+++	+	-	+++
21	<b>MRI-H186</b>		-	-	-	-	-
22	<b>MRI-H215</b>		-	+	-	-	++
23	<b>SW756</b>		-	+	-	-	+
24	<b>CaSki</b>		-	+	-	+	-
25	<b>SiHa</b>		-	+	-	-	+
26	<b>C33A</b>		-	+	-	-	-
27	<b>HT-3</b>		-	++	-	-	+
28	<b>MS751</b>		-	++	-	-	-
29	<b>Ekto-CxK</b>	<b>Ektozervikale Keratinozyten</b>	+	+++	-	-	+++

<sup>a</sup> 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

<sup>b</sup> Eigene Daten; ausführliche Beschreibung im Text

<sup>c</sup> -: negativ, +: schwach, ++: mittel, +++: stark

<sup>d</sup> viral-zelluläres Fusionstranskript unter Kontrolle des HPV68-Promotors

n.b.: nicht bestimmt

**Tabelle 2: Vergleich von Northern- und RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression in Tumorzelllinien verschiedener Gewebe und in ektozervikalen Keratinozyten (Fortsetzung)**

Lfd. Nr.	Zelllinie	Gewebe	Northern-Analyse <sup>a</sup> (Signalintensität) <sup>c</sup>	RT-PCR-Analyse <sup>b</sup> (Signalintensität) <sup>c</sup>			
				Exon 2/3	Exon 1/2		
					15 C	a31	p2
30	<b>A818-4</b>	<b>Pankreas- karzinom</b>	++	+++	+++	++	++
31	<b>Capan-1</b>		+	+++	+	++	++
32	<b>DanG</b>		+	+++	+	++	++
33	<b>CoLo-357</b>		+	n.b.			
34	<b>MDH Panc</b>		+	n.b.			
35	<b>Capan-2</b>		-	-	-	-	-
36	<b>AsPc-1</b>		-	n.b.			
37	<b>Panc Tu-1</b>		-	n.b.			
38	<b>Panc Tu-2</b>		-	n.b.			
39	<b>HPAF</b>		-	n.b.			
40	<b>PL45</b>		-	n.b.			
41	<b>PT45</b>		-	n.b.			
42	<b>CFPac</b>		-	n.b.			
43	<b>SW979</b>		-	n.b.			
44	<b>SW850</b>		-	n.b.			
45	<b>LX-1</b>	<b>Lungen- karzinom</b>	++	+++	+	+++	++
46	<b>LUTCML-54</b>		-	n.b.			
47	<b>A549</b>		-	-	-	-	-
48	<b>RPMI 2650</b>		+	+	+	-	-
49	<b>H-Messo-1</b>		-	++	-	++	++
50	<b>H-Messo-1a</b>		-	+	-	+	+
51	<b>H69</b>		+	+++	+	+++	++
52	<b>XF439</b>	<b>Harnblasen- karzinom</b>	++	+++	+++	+++	+++
53	<b>RT112</b>		+	+++	++	-	-
54	<b>EJ28</b>		-	+	-	-	-
55	<b>RT4</b>		++	+++	++	-	+++
56	<b>5637</b>		-	-	-	-	-
57	<b>HBTCPL-1</b>		-	+	-	-	+

<sup>a</sup> 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

<sup>b</sup> Eigene Daten; ausführliche Beschreibung im Text

<sup>c</sup> -: negativ, +: schwach, ++: mittel, +++: stark

n.b.: nicht bestimmt

### 2.4.3. RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression in Biopsiematerial aus Tumoren verschiedener Gewebe

Im Verlauf der Etablierung und Kultivierung von Zelllinien aus primärem Tumorgewebe treten häufig Veränderungen der Erbinformation auf chromosomaler und Nucleotid-Ebene auf. Infolgedessen ist die unmittelbare Übertragung von Ergebnissen aus Zellkultur-Experimenten auf die Situation im Gesamtorganismus nur eingeschränkt möglich.

Um Erkenntnisse über Expressionsprofil und Promotoraktivität des *APM-1*-Gens *in vivo* zu erhalten, wurde Biopsiematerial von Patienten mit Tumoren aus unterschiedlichen Geweben untersucht. Die Analysen wurden in analoger Weise wie bei den Zelllinien mittels RT-PCR durchgeführt. Besonders bei Gewebematerial bietet diese Methode gegenüber der Northern-Analyse den Vorteil, dass auch die oft nur in minderer Quantität und Qualität isolierbaren RNAs verwendet werden können.

Im einzelnen wurden die RT-PCR-Analysen mit folgendem Patientenmaterial vorgenommen:

- Leukozyten-Proben von 6 Gehirntumor-Patienten aus Erlangen und 8 Leukämie-Patienten
- Insgesamt 47 Proben aus Lymphknoten, Schleimhaut, einer Metastase und Tumoren des Hals-Nasen-Ohren (HNO)-Bereichs von 19 Patienten der HNO-Klinik Mannheim
- 19 Proben von Mikrodissektionen aus Plattenepithelkarzinomen des HNO-Bereichs von 17 Patienten der Kopfklinik Heidelberg
- 13 Proben von Gehirntumor-Patienten aus Erlangen mit Gliomen, Gliosarkomen, Glioblastomen und Meningeomen
- 13 Proben aus Nierengewebe und Nierentumoren der Tumorbank des DKFZ Heidelberg; gezeigt im Vergleich mit RT-PCR-Analysen von 8 Nierenkarzinom-Zelllinien

In Abbildung 7 sind die Analysen von insgesamt 14 Leukozyten-Proben dargestellt. Weder bei den Gehirntumor- (A) noch bei Leukämie-Patienten (B) ist ein Signal im Exon 2/3-Bereich zu erkennen. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass in weißen Blutzellen generell keine *APM-1*-Genexpression stattfindet.

Bei den HNO-Proben aus Mannheim lässt sich in allen Schleimhautproben *APM-1*-mRNA nachweisen (Abbildung 8 B und C). Dieser Befund zeigt, dass *APM-1* in HNO-Normalgewebe exprimiert wird. Ebenso sind alle Biopsien aus Tumorgewebe *APM-1*-positiv (Abbildung 8 A bis C).

Bei 10 von 15 analysierten Lymphknoten ist ein Signal von unterschiedlicher Intensität im Exon 2/3-Bereich zu erkennen (Abbildung 8 A bis C). Lymphknoten-Material besteht zu einem Großteil aus Lymphozyten, einer Unterart der Leukozyten. In Leukozyten aus 14 Blutproben wurde keine *APM-1*-Expression gefunden (Abbildung 7). Daher liegt bei den *APM-1*-positiven Lymphknoten möglicherweise ein Befall mit Tumorzellen vor.

Hinsichtlich der 5'-UTR-Aktivität ist p2 in allen Schleimhautproben nachweisbar, aber nur 5 von 12 Proben weisen ein Signal mit meist geringerer Intensität bei a31 auf. Auch in den Tumoren ist p2-RNA überall nachweisbar, im Gegensatz zu der Metastase von Patient 30/9 (Abbildung 8 A). RNAs mit a31-UTR sind in 13 von 19 Tumorproben und in der Metastase nachweisbar, bei einigen Fällen mit deutlichem Signal. In den Lymphknoten zeigen sich jeweils bei 5 von 15 Proben p2- oder a31-Signale von unterschiedlicher Stärke. Eine Gemeinsamkeit aller Biopsien ist, dass nirgendwo ein 15C-spezifisches RT-PCR-Produkt detektiert werden kann. Dies spricht dafür, dass der 15C-Promotor im Gewebe des HNO-Bereichs nicht aktiv ist.

Für die Analysen der Proben von HNO-Patienten der Kopfklinik Heidelberg wurde mikrodissiziertes Material verwendet. Bei einer Mikrodissektion wird nach spezifischer Färbung eines Gewebe-Dünnschnitts das Tumorgewebe unter dem Mikroskop vom umliegenden Bindegewebe frei präpariert und direkt in einen Lysepuffer zur Nucleinsäure-Extraktion überführt. Auf diese Weise wird der Tumoranteil des zu untersuchenden Materials auf mindestens 80 % angereichert.

Das *APM-1*-Expressionsprofil für die untersuchten HNO-Tumoren ist in Abbildung 9 A und B dargestellt. Anders als bei den Mannheimer HNO-Tumoren ist das Profil auffallend heterogen. Die Signalintensitäten unterscheiden sich deutlich, und in insgesamt 11 von 19 Proben (rund 58 %) ist überhaupt keine Genexpression nachweisbar. Dieses Resultat spricht dafür, dass zuverlässige Aussagen über die Expression eines Gens, für das die Funktion eines negativen Wachstumsregulators vermutet wird, nur nach Analyse von mikrodissizierten Tumorbiopsien möglich sind. Weiteres Probenmaterial für die 5'-UTR-spezifischen RT-PCRs stand leider nicht zur Verfügung.

Die in Abbildung 10 gezeigten Analysen wurden mit Proben von Gehirntumoren unterschiedlicher Typen durchgeführt. Die Analyse des Exon 2/3-Abschnitts deutet in allen untersuchten Proben auf *APM-1*-Expression hin. RNAs mit p2-UTR sind in insgesamt 9 von 13 Proben vorhanden, wobei in 3 Fällen ein starkes, und in 6 Fällen ein schwaches Signal erkennbar ist. Starke Signale für a31-Produkt treten bei 2 Proben auf, bei denen nur schwache p2-Signale vorhanden sind. Keine der Proben weist dagegen ein 15C-Produkt auf. Ein Vergleich mit der *APM-1*-Expression in normalen Gliazellen ist hier mangels Biopsiematerial nicht möglich.



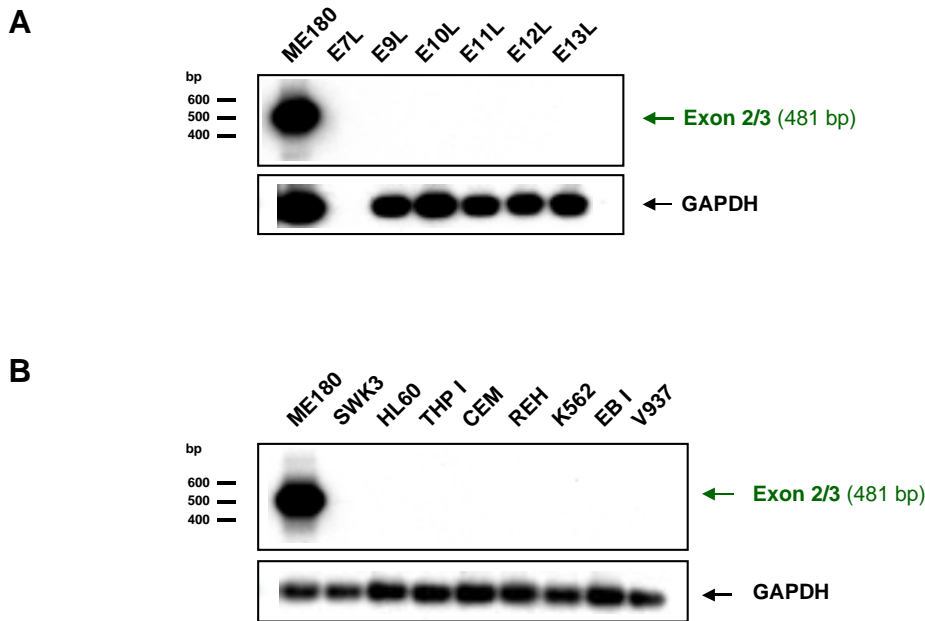
Abbildung 11 zeigt den Vergleich der RT-PCR-Analysen von Nierentumor-Biopsien mit Zelllinien aus Nierenkarzinomen. Mit Ausnahme der beiden Biopsieproben KTCTL 176 und KTCTL 186 sind alle Tumoren im Exon 2/3-Bereich *APM-1*-positiv. Die als Normalgewebe ausgewiesene Probe KCTL 92 zeigt ebenfalls Genexpression. Im Gegensatz dazu sind bei den Zelllinien nur in 2 von 8 Fällen Exon 2/3-Signale mit Intensitäten wenig oberhalb der Nachweisgrenze sichtbar. Bei den 5'-UTR-spezifischen RT-PCRs ist p2-Produkt in allen Fällen nachweisbar, in denen *APM-1* exprimiert wird. Hingegen ist a31-Produkt nur in 5 der insgesamt 13 Proben, und 15C-Produkt nirgendwo zu sehen. In den Nierenkarzinom-Zelllinien sind 5'-UTR-spezifische Produkte nicht nachweisbar.

Die deutlichen Unterschiede zwischen Biopsiematerial und Karzinom-Zelllinien lassen sich auf zweierlei Weise deuten. Eine Möglichkeit wäre, dass die *APM-1*-Expression in Nierentumoren häufig abgeschaltet ist, worauf die Ergebnisse der Zelllinien hinweisen. Die Positivität der Tumorbiopsien wäre in diesem Fall durch Kontamination mit exprimierendem Normalgewebe zu erklären. Eine alternative Erklärung wäre, dass es im Verlauf der Etablierung der Zelllinien aus *APM-1*-positiven Nierenkarzinomen zu einer Stilllegung der *APM-1*-Expression gekommen ist.

Mittels RT-PCR-Analyse wurde die Expression des *APM-1*-Gens in tumorigenen und nicht-tumorigenen Zellen aus insgesamt 106 Biopsieproben von vier verschiedenen Gewebearten untersucht. Insbesondere die Analyse-Resultate der mikrodisektierten Proben von HNO-Tumoren deuten an, dass *APM-1 in vivo* uneinheitlich exprimiert wird (Abbildung 9). Eindeutige Aussagen über das *APM-1*-Expressionsprofil sind für die HNO-Proben aus Mannheim, die Gehirntumor- und Nierentumor-Biopsien nicht möglich, da jeweils von einer Mischung aus Tumor- und Normalgewebe ausgegangen werden muss. In den Normalgewebe-Proben wurde überall *APM-1*-Expression gefunden. Die untersuchten Leukozyten sind dagegen durchweg *APM-1*-negativ.

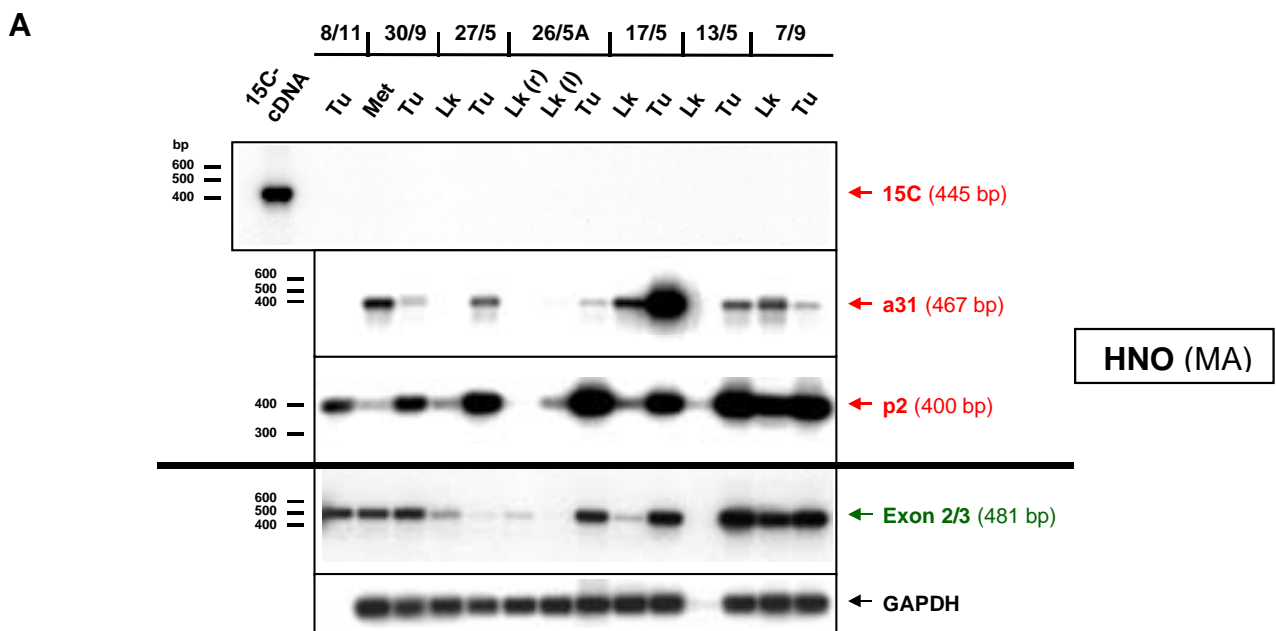
Die Synthese der *APM-1*-mRNAs scheint hauptsächlich vom p2-Promotor, aber auch vom a31-Promotor auszugehen, da p2- und a31-spezifische RT-PCR-Produkte nachweisbar sind. Dagegen war in keiner der Proben ein 15C-Signal zu detektieren.

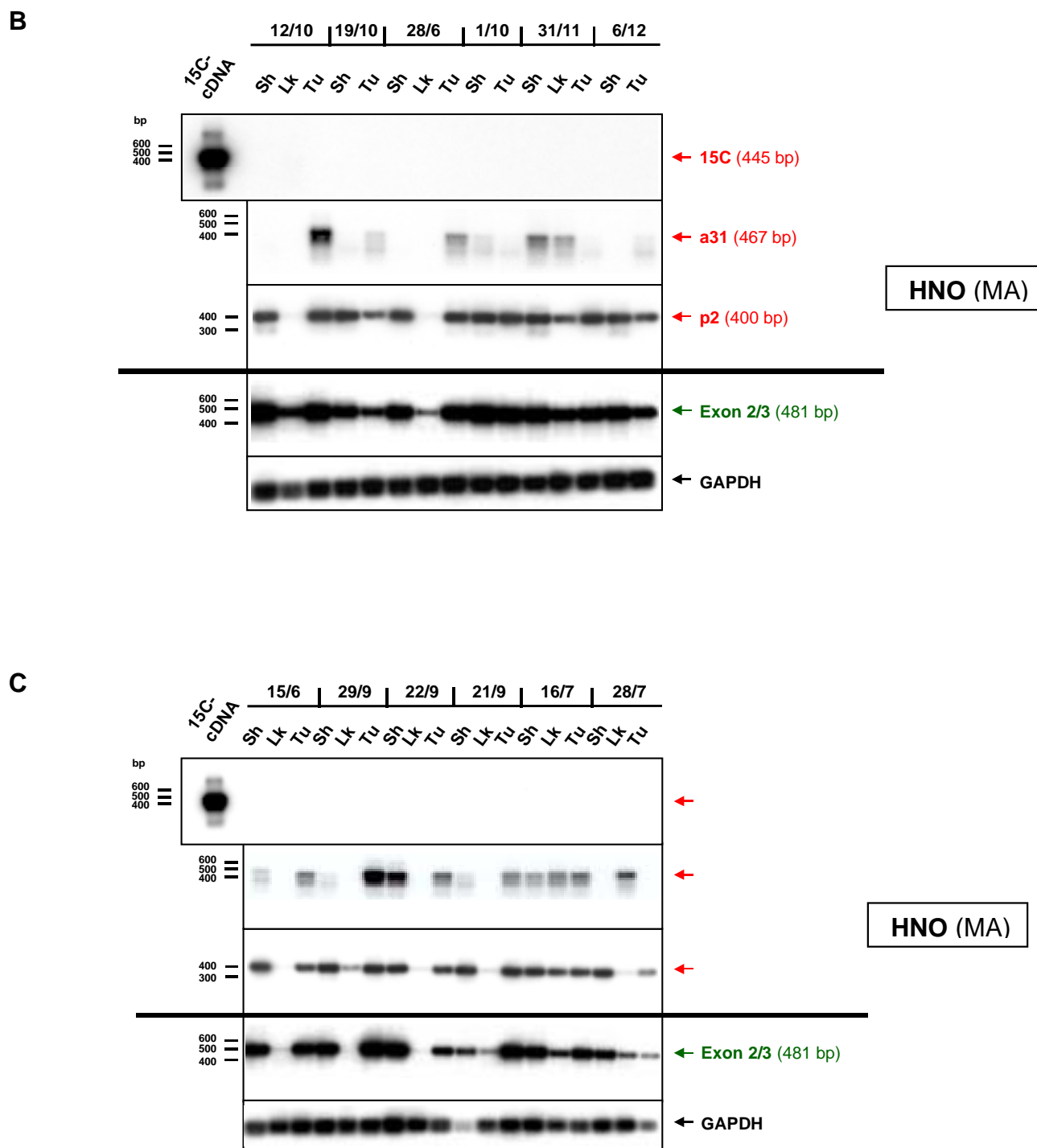
Die Befunde aller RT-PCR-Analysen deuten darauf hin, dass eine Abschaltung oder zumindest Abschwächung der *APM-1*-Genexpression bei der Entstehung menschlicher Tumoren eine Rolle spielen könnte.



**Abbildung 7: RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression in Leukozyten-Proben von Gehirntumor- und Leukämie-Patienten**

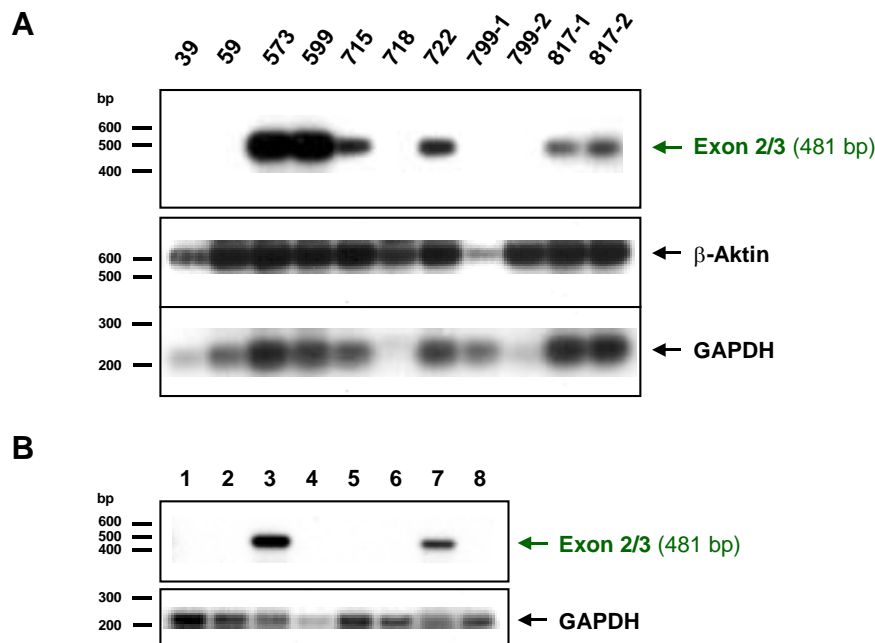
Gezeigt sind die Analysen von Leukozyten aus Blutproben von 6 Gehirntumor-Patienten (**A**) und 8 Leukämie-Patienten (**B**). Die Bezeichnungen der Patienten sind angegeben. Die experimentelle Vorgehensweise und die Abbildungs-Elemente wurden bereits beschrieben (siehe Legende zu Abbildung 5 B). Als Positivkontrolle wurde jeweils eine zusätzliche PCR mit 1/20 einer RT-Reaktion von 1 µg ME180-Gesamt-RNA mitgeführt.





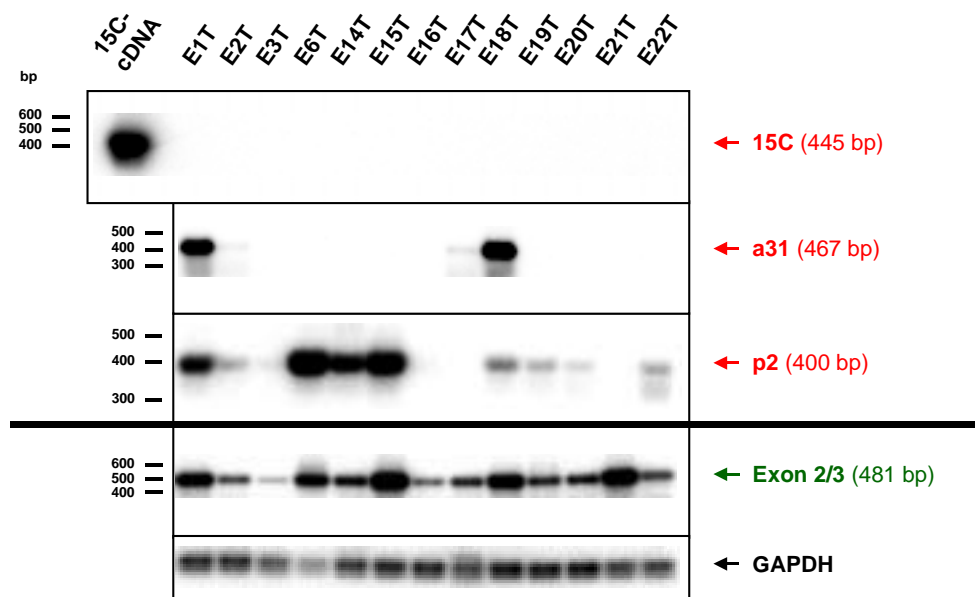
**Abbildung 8: RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression in Proben von HNO-Tumoren, Lymphknoten und Schleimhaut**

Gezeigt sind die Analysen von Biopsiematerial mit 14 Proben von 7 Patienten (A), 15 Proben von 6 Patienten (B) und 18 Proben von 6 Patienten (C). Die Proben wurden entnommen von Tumoren (Tu), Metastasen (Met), Lymphknoten (Lk) und Schleimhautgewebe (Sh) des HNO-Bereichs. Oberhalb der einzelnen Proben sind die Patientennummern angegeben. Die experimentelle Vorgehensweise und die Abbildungs-Elemente wurden bereits beschrieben (siehe Legende zu Abbildung 6). Zusätzlich wurde als Positivkontrolle für 15C eine PCR von 10 ng klonierter 15C-cDNA mitgeführt. (MA, Mannheim)



**Abbildung 9: RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression in Mikrodisektions-Proben von HNO-Tumoren**

Gezeigt sind die Analysen von 11 Proben aus Biopsiematerial von 9 Patienten (**A**) und 8 Proben von 8 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im HNO-Bereich (**B**). Die Patientennummern sind angegeben. Alle Proben wurden von der Arbeitsgruppe Dr. F.X. Bosch an der Kopfkranklinik Heidelberg im Rahmen einer Kooperation bezogen. Die Mikrodisektionen, RNA-Extraktionen und reversen Transkriptionen wurden von Dipl.-Biol. Tina Wiest durchgeführt. Für die PCR des Exon 2/3-Bereichs wurde je 5 µl der RT-Reaktion zur Verfügung gestellt. Nach Auftrennung von 1/5 der PCR-Reaktionen in einem 2 %-igen Agarosegel und Southern-Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte eine stringente Hybridisierung mit dem amplifizierten 481 bp-Fragment als Sonde (**A**), bzw. der Oligonucleotid-Sonde MV14 (**B**). Der grüne Pfeil markiert das PCR-Produkt mit der in Klammern angegebenen erwarteten Länge. Als interner Standard wurden bei **A** die Haushaltsgene *β-Aktin* und *GAPDH*, für **B** *GAPDH* verwendet. Die Amplifikation der Haushaltsgene wurde im Multiplex-Verfahren in einer Reaktion mit der *APM-1*-spezifischen PCR durchgeführt. Bei **A** wurden jeweils die gleichen Primermengen eingesetzt. Als Hybridisierungssonde wurde das jeweils amplifizierte Fragment verwendet. Für die *GAPDH*-PCR in **B** wurde 1/6 der Primermenge eingesetzt, die für die PCR der *APM-1*-Exons verwendet wurde. Die *GAPDH*-Hybridisierung erfolgte mit der Oligonucleotid-Sonde *GAPDH*-Probe. Der schwarze Pfeil markiert das jeweils detektierte Produkt. Ausgesuchte Banden der als Größenstandard benutzten 100 bp-Leiter und deren Fragmentlängen (in bp) sind eingezeichnet.



**Abbildung 10: RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression in Proben von Gehirntumoren**

Gezeigt sind die Analysen von insgesamt 13 Proben aus Biopsiematerial von 13 Patienten mit Gehirntumoren. Die Patientenbezeichnungen sind angegeben. Die Probe des Patienten E1T repräsentiert ein Meningeom<sup>a</sup> der WHO Gr I, weitere Meningeome liegen vor bei E6T, E14T und E21T. Bei E2T wurde ein Gliosarkom<sup>b</sup> der WHO Gr IV diagnostiziert, bei E3T, E16T, E20T und E22T ein Glioblastom<sup>c</sup>. Gliome<sup>d</sup> liegen vor bei E17T, E18T und E19T. Bei E15T konnte nicht eindeutig zwischen Gliom und Meningeom differenziert werden. Die experimentelle Vorgehensweise und die Abbildungs-Elemente wurden bereits beschrieben (siehe Legende zu Abbildung 6). Zusätzlich wurde als Positivkontrolle für 15C eine PCR von 10 ng klonierter 15C-cDNA mitgeführt.

<sup>a</sup> *Meningeom*: meist benigner Hirntumor mit langsamem Wachstum; maligne Entartung möglich

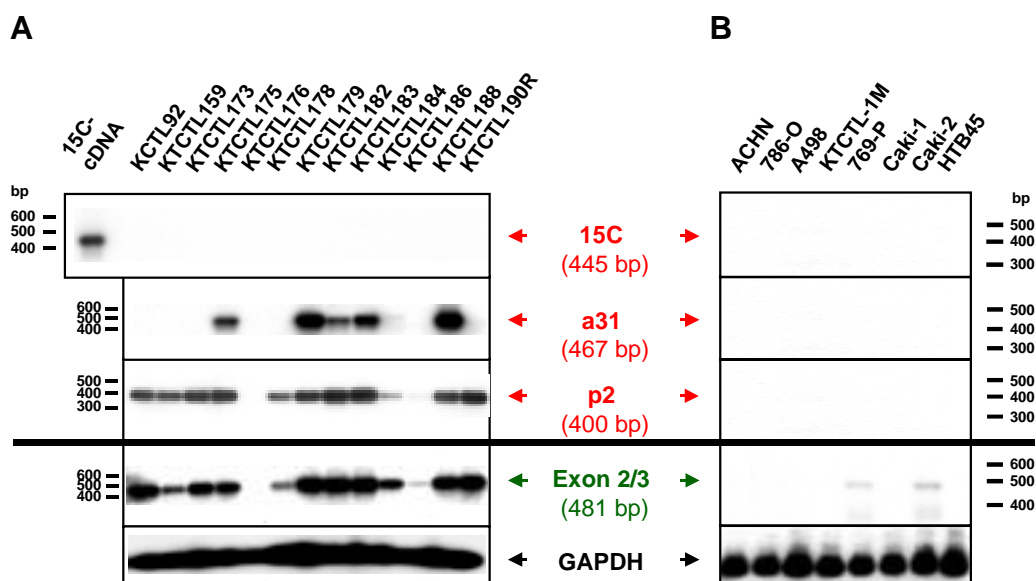
<sup>b</sup> *Gliosarkom*: hoch malignes, entdifferenziertes *Glioblastom* mit schnellem Wachstum

<sup>c</sup> *Glioblastom*: malignes *Gliom* mit schnellem Wachstum

<sup>d</sup> *Gliom*: Sammelbezeichnung für alle von der *Neuroglia* ausgehenden, vor allem im Gehirn lokalisierten echten Tumoren des zentralen Nervensystems unterschiedlicher Differenzierung

*Neuroglia*: vom Ektoderm abgeleitetes Hüll- und Stützgewebe des Nervensystems; im Gegensatz zu den Nervenzellen sind die Gliazellen auch nach der Pränatalperiode noch vermehrungsfähig

(Informationen entnommen aus: Pschyrembel Klinisches Wörterbuch – 256., neu bearbeitete Auflage – Berlin; New York: de Gruyter, 1990.)



**Abbildung 11: Vergleich von RT-PCR Analysen der *APM-1*-Genexpression in Proben von Nierentumoren und Nierenkarzinom-Zelllinien**

Gezeigt sind die Analysen von insgesamt 13 Proben aus Biopsiematerial von 13 Patienten mit Nierentumoren (**A**) und von 8 Zelllinien aus Nierenkarzinomen (**B**). Die Bezeichnungen der Patienten (**A**) und Zelllinien (**B**) sind angegeben. Bei KCTL92 (**A**) handelt es sich um eine von Normalgewebe entnommene Probe. Die experimentelle Vorgehensweise und die Abbildungs-Elemente wurden bereits beschrieben (siehe Legende zu Abbildung 6). Bei den Nierentumor-Proben wurde als Positivkontrolle für 15C eine zusätzliche PCR von 10 ng klonierter 15C-cDNA mitgeführt.

#### **2.4.4. RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression in Tumorzelllinien verschiedener Gewebe nach Behandlung mit 5-Aza-2'-desoxycytidin**

Die bisherigen Analysen zum Expressionsprofil des Tumorsuppressor-Kandidaten *APM-1* haben gezeigt, dass das Gen in mehreren Tumorzelllinien unterschiedlicher Gewebe nicht oder nur schwach exprimiert wird (vgl. RT-PCRs für Exon 2/3). Die fehlende Expression geht einher mit einer Inaktivität der drei untersuchten *APM-1*-Promotoren (vgl. 5'-UTR-spezifische RT-PCRs). Dieser Befund legt die Schlussfolgerung nahe, dass die *APM-1*-Transkription in den betreffenden Zelllinien stillgelegt sein könnte.

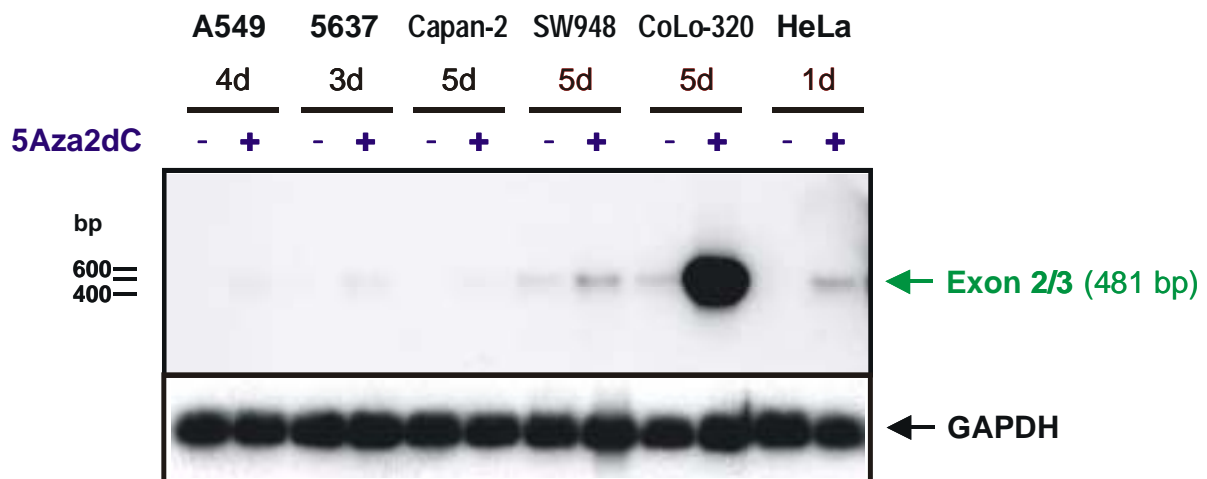
Eine Charakterisierung der genomischen Bereiche mit den 5'-UTRs des *APM-1*-Gens hat ergeben, dass die potenziellen Promotorregionen GC-reich sind, und der 15C-Promotor sich wahrscheinlich inmitten einer CpG-Insel befindet (Nazari, 2000). Eine Möglichkeit der Inaktivierung von Genexpression ist die transkriptionelle Stilllegung durch Methylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen (Bird und Wolffe, 1999). Wie gezeigt wurde, leistet dieser epigenetische Mechanismus einen bedeutenden Beitrag zur Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen (Baylin und Herman, 2000; Robertson und Jones, 2000).

Eine stabile Transkriptionsrepression durch Methylierung kann mit Hilfe des Methylierungsinhibitors 5-Aza-2'-desoxycytidin (5Aza2dC) wieder rückgängig gemacht werden (Bird und Wolffe, 1999). Um zu ermitteln, ob eine Repression der *APM-1*-Genexpression durch Methylierung stattfindet, wurden in einem Pilotexperiment sechs verschiedene *APM-1*-negative Tumorzelllinien aus fünf Gewebstypen für die Dauer von einer bis drei Zellteilungen mit 5Aza2dC behandelt. Anschließend wurde die Expression durch RT-PCR analysiert. Das Resultat ist in Abbildung 12 gezeigt. Durch die Behandlung wurde in der Colonkarzinom-Zelllinie CoLo-320 eine drastische Erhöhung der *APM-1*-mRNA-Mengen im Vergleich zur Kontrolle bewirkt. Eine schwache, aber deutlich erkennbare Steigerung des Expressionsniveaus konnte auch in HeLa und SW948 erzielt werden. Die Andeutung eines Signals ist zudem bei den behandelten Zellen von A549, 5637 und Capan-2 zu beobachten.

Die am besten auf die Behandlung ansprechende Zelllinie CoLo-320 wurde für eine 5'-UTR-spezifische RT-PCR-Analyse verwendet. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass der p2-Promotor durch 5Aza2dC aktiviert werden konnte (Abbildung 13).

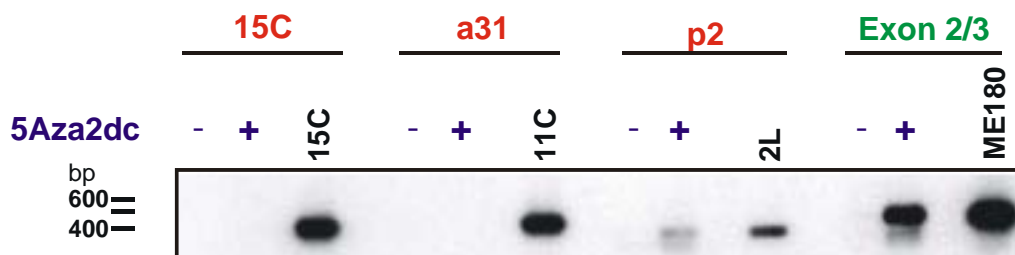
Die Daten zeigen, dass eine Steigerung von mRNA-Menge und Promotoraktivität des *APM-1*-Gens in *APM-1*-negativen Tumorzelllinien durch Behandlung mit dem Methylierungsinhibitor 5Aza2dC möglich ist. Daraus lässt sich folgern, dass die Methylierung der Promotorregion ein Mechanismus zur Repression der *APM-1*-Transkription in Tumorzellen sein könnte.

Zur Bestätigung dieser Vermutung sind allerdings noch weitere Experimente mit einer größeren Anzahl von Zelllinien und optimierten Behandlungsparametern erforderlich. Im Rahmen dieser Doktorarbeit war eine weitere Analyse der DNA-Methylierung in den *APM-1*-Promotorregionen aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich.



**Abbildung 12: RT-PCR-Analyse der *APM-1*-Genexpression in Tumorzelllinien verschiedener Gewebe nach Behandlung mit 5-Aza-2'-desoxycytidin**

Gezeigt sind die Analysen von Tumorzelllinien aus Lunge (A549), Harnblase (5637), Pankreas (Capan-2), Colon (SW948, CoLo-320) und Zervix (HeLa). Die Bezeichnungen der Zelllinien sind angegeben. Die mit „-“ gekennzeichneten Kontrollen wurden mit PBS, die mit „+“ gekennzeichneten Zellen mit 3  $\mu$ M 5-Aza-2'-desoxycytidin (5Aza2dC) behandelt. Die Behandlungsdauer in Tagen (d) ist angegeben. Die Autoradiographie erfolgte für 3 Tage.



**Abbildung 13: RT-PCR-Analyse von Promotoraktivität und Expression des *APM-1*-Gens in der Colonkarzinom-Zelllinie CoLo-320 nach Behandlung mit 5-Aza-2'-desoxycytidin**

Gezeigt ist die 5'-UTR-spezifische und Exon 2/3-spezifische RT-PCR-Analyse von Gesamt-RNA aus CoLo-320 nach 5-tägiger Behandlung mit PBS (-) und mit 3  $\mu$ M 5Aza2dC (+). Als Positivkontrolle wurde je eine PCR von 10 ng DNA der cDNA-Klone 15C (für 15C), 11C (für a31), 2L (für p2) sowie 1/20 einer RT-Reaktion mit ME180-RNA für Exon 2/3 mitgeführt. Von den RT-PCRs der RNA von unbehandelten und behandelten CoLo-320-Zellen wurde je 1/5, von der RT-PCR der RNA von ME180-Zellen 1/50 des Reaktionsvolumens, und von den cDNA-PCRs je 2  $\mu$ l der 1:10-verdünnten Reaktion in einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Autoradiographie erfolgte für 24 Stunden.