

**Nutzung tumorspezifischer Veränderungen für die
selektive Reexpression des Tumorsuppressorgens p53 in
Harnblasenkarzinomen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christine Steinhoff
aus Düsseldorf

Düsseldorf, 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Auch als elektronische Version im Katalog der Universitäts- und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verfügbar:

<http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2001/steinhoff.html>

Referent: Prof. Dr. rer nat W.A. Schulz

Korreferentin: Prof. Dr. rer nat E. Knust

Tag der mündlichen Prüfung: 11.Mai 2001

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Molekularbiologie des Harnblasenkarzinoms	7
1.2	Zellzyklusregulation am G1-S-Kontrollpunkt	10
1.3	p53: Gen, Protein und Funktion	12
1.4	Apoptose	17
1.5	Rb: Gen, Protein und Funktion	18
1.6	Veränderungen der DNA-Methylierung in Harnblasenkarzinomen	20
1.7	Ziel der Arbeit	24
2.	Material	
2.1	Klinisches Material: Gewebe, Blut, Paraffin-eingebettetes Gewebe	26
2.2	Primer und Oligonukleotide	26
2.3	etablierte Zelllinien	29
2.4	E.coli-Sämme	29
2.5	Plasmide	29
2.6	Kulturmedien	31
2.7	Antikörper, Seren, Enzyme, Kits, Transfektionsreagenzien, Chemikalien, Verbrauchsmaterial	32
2.8	Lösungen und Puffer	35
2.9	Spezielle Geräte	40
2.10	Software und Computerressourcen	41
3.	Methoden	
3.1	Immunhistochemie	42
3.1.1	p53 Färbung	
3.2	Polymerase Kettenreaktion- (PCR) Methoden	43
3.2.1	PCRs zur Mutationsanalyse von p53	
3.2.2	Nachweis transfizierter p53-cDNA in Zellklonen	
3.2.3	Durchführung von PCR-Amplifikationen für Klonierungen	

3.3	Sequenzierungen	47
3.3.1	Cycle Sequencing	
3.3.2	Sequenzierung unter Verwendung des LICOR-Automaten	
3.4	Klonierungen	48
3.4.1	Klonierung von Fragmenten aus Restriktionsverdau-Ansätzen	
3.4.2	Klonierung von PCR-Fragmenten	
3.4.3	Gezielte Mutagenese	
3.5	Kultivierung von humanen Zellen	49
3.5.1	Kultivierung von Urothelkarzinom-Zelllinien	
3.5.2	Kultivierung von Prostatakarzinom-und Nierenzellkarzinom-Zelllinien	
3.5.3	Anlegen von humanen Uroepithel-Primärkulturen aus Ureter	
3.5.4	Giemsafärbung	
3.5.5	Fluoreszenzmikroskopie von GFP-transfizierten Zellen	
3.5.6	Induktion von Apoptose durch CH11/Mitomycin/Camptothecin	
3.6	Analytische Methoden an Zellen in Zellkultur	51
3.6.1	Bestimmung von Transfektionseffizienzen	
3.6.2	Bestimmung der Zellverdopplungszeiten	
3.6.3	Proteinassay (Gesamtproteingehalt-Bestimmung)	
3.6.4	BrdU-Inkorporationstest	
3.6.5	Apoptose-ELISA	
3.6.6	Luziferase-Messung	
3.7	Transfektionsversuche	53
3.7.1	transiente Transfektionen	
3.7.2	Selektion stabiler Klone	
3.8	Kultur von Bakterienzellen	54
3.8.1	Kultur von E.coli-Zellen	
3.8.2	Transformation	
3.9	Untersuchungen von Nukleinsäuren und Proteinen	54
3.9.1	DNA-Extraktion aus Blut, Gewebe, Zelllinien	
3.9.2	DNA-Extraktion aus Polyacrylamidgelen, Paraffinschnitten und Agarosegelen	
3.9.3	Plasmidpräparationen	
3.9.4	Proteinextraktion aus Zelllinien und normalen Uroepithelialzellen	

3.10	Enzymatische Reaktionen	56
3.10.1	Restriktionsverdau	
3.10.2	In-vitro-DNA-Methylierung	
3.11	Gelelektrophoretische Methoden	56
3.11.1	Agarosegele	
3.11.2	Polyacrylamidgele und SSCP	
3.12	Western Blot	57
3.13	Durchflußzytometrie	58
3.13.1	Zellzyklusanalyse	
3.13.2	Annexin-V-Biotin-Apoptose-Assay	
3.13.3	Intrazelluläre Färbung von p53	
4.	Ergebnisse	
4.1	Analyse von p53-Mutationen in Harnblasenkarzinomen	61
4.1.1	Immunhistochemische Untersuchung der P53-Proteinakkumulation in Harnblasenkarzinomen	61
4.1.2	SSCP-Analyse des p53-Gens in Harnblasenkarzinomproben	63
4.1.3	Sequenz-Analyse des p53-Gens in Harnblasenkarzinomproben	65
4.2	Tumorspezifisches Targeting p53-induzierter Apoptose	71
4.2.1	Zellkulturmodelle	71
4.2.1.1	Etablierung der Kultur von normalen Uroepithelialzellen	71
4.2.1.2	Charakterisierung der verwendeten Harnblasenkarzinomzelllinien	75
4.2.1.3	Optimierung der Transfektionsbedingungen	77
4.2.2	Tumorspezifische Deregulation E2F-abhängiger Promotoren und Auswirkung transgener p53-Expression auf den Zellzyklus von Tumor- und normalen Uroepithelialzellen	81
4.2.2.1	Aktivitäten E2F-abhängiger Promotoren in Karzinomzelllinien und normal proliferierenden uroepithelialen Zellen	81
4.2.2.2	Effekt von Serum- und Wachstumsfaktorentzug auf Zellwachstum und auf Promotoraktivitäten	85
4.2.2.3	Auswirkung transgener Wildtyp-p53 Expression in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen Uroepithelialzellen: Langfristige Wirkung	89
4.2.2.4	Auswirkung transgener Wildtyp-p53 Expression in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen Uroepithelialzellen: Kurzfristige Wirkung	93

4.2.2.5	Zellzyklus-Untersuchung und intrazelluläre p53-Färbung mit anschließender FACS-Analyse	102
4.2.3	Charakterisierung des humanen L1.2B-Promotors	105
4.2.3.1	Beschreibung des humanen L1.2B-Promotors	106
4.2.3.2	Aktivität des L1.2B Promotors in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen Uroepithelialzellen	107
4.2.3.3	Promotoraktivitäten von Deletionsfragmenten des humanen L1.2B-Promotors in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen Uroepithelialzellen	109
4.2.3.4	Effekt von in-vitro-DNA-Methylierung auf Promotoraktivitäten	114
4.2.3.5	Effekt von in-vitro-DNA-Methylierung auf Selektivität stabiler Klone	116
5.	Diskussion	
5.1	Analyse von p53-Mutationen in Harnblasenkarzinomen	117
5.2	Tumorspezifisches Targeting p53-induzierter Apoptose	117
5.2.1	Etablierung und Charakterisierung der normalen Uroepithelialzellen und der Harnblasenkarzinomzelllinien	120
5.2.2	Transkriptionelles Targeting in Tumorzellen durch Nutzung der Deregulation des Zellzyklus	123
5.2.3	Charakterisierung des humanen LINE-1 Promotors	129
6.	Ausblick	134
7.	Zusammenfassung	136
8.	Statistischer Anhang	139
9.	Literaturverzeichnis	142
10.	Abkürzungen	154
11.	Danksagung	155

1. Einleitung

1.1 Molekularbiologie des Harnblasenkarzinoms

Harnblasenkarzinome sind die häufigsten malignen Tumoren des Urogenitaltraktes und machen ca. 3% aller malignen Tumoren beim Menschen aus (Uroonkologie, 2000). Die altersunabhängige Inzidenz in Westeuropa beträgt jährlich 20 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner. Hierbei sind Übergangsepithelkarzinome (Transitionalzellkarzinome, TCC) am häufigsten (~95%); ~5% der Urothelkarzinome sind Plattenepithelkarzinome und sehr selten Adenokarzinome. Harnblasentumore werden nach dem UICC (Union International Contre le Cancer) TNM-System klassifiziert (TNM, 1997). Ta-Tumore wachsen papillär ins Lumen und haben eine vergleichsweise gute Prognose. T1-Tumore infiltrieren in das subepitheliale Blasengewebe. Invasive Tumoren werden klassifiziert als: T2 (in Muskulatur infiltrierend), T3 (in Fettgewebe infiltrierend) und T4 (in Prostata, Uterus und Vagina oder Becken-/Bauchwand infiltrierend). Weitere Unterteilungen werden in der histopathologischen Diagnostik verwendet. Beim Tumorgrad wird zwischen G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert), G3 (schlecht differenziert) und G4 (undifferenziert) unterschieden. Zusätzlich wird bei der Klassifizierung der Erkrankung noch der Metastasierungsstatus der Lymphknoten (N) und der Nachweis von Fernmetastasen (M) angegeben. Eine Sonderform bildet das Carcinoma in situ; hierbei handelt es sich um einen nicht infiltrierenden intraepithelialen Blasentumor von hohem Malignitätsgrad. Er zeichnet sich durch hohe Rezidivneigung und frühe Progression aus. Überwiegend treten Harnblasenkarzinome ab dem 60. Lebensjahr auf. Die Inzidenzrate ist in Gebieten mit hoher Industriedichte wesentlich höher als in ländlichen Regionen, wofür u.a. das vermehrte Vorkommen von Karzinogenen verantwortlich gemacht wird. Als verantwortliche Karzinogene sind eine Reihe von Chemikalien, ionisierende und UV-Strahlen bekannt. Beispielsweise ist Rauchen mit einem erhöhten Blasenkrebsrisiko verbunden, wofür verschiedene Inhaltsstoffe einzeln oder kombiniert verantwortlich sein könnten. Wahrscheinlich spielt die polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffverbindung Benzo(a)pyren eine entscheidende Rolle. Benzo(a)pyren wird in vivo zu einem reaktiven Epoxid metabolisiert, das sehr effizient an Guanin bindet und dadurch zu Punktmutationen führt. Schon 1895 hat Ludwig Rehn (Rehn, 1895) seine Beobachtung beschrieben, daß Blasentumore gehäuft bei Anilin-Arbeitern der Farbstoffindustrie auftreten. In den dreißiger Jahren zeigten dann Hueper et al (1935), daß sich nach Applikation von β -Naphthylamin bei Hunden neoplastische und präneoplastische

Läsionen der Harnblase bildeten. Heute gelten u.a. 4-Aminodiphenyl, Benzidin und seine Salze, 4-Chlor-o-toluidin und 2-Naphthylamin als chemische Verbindungen mit gesichertem karzinogenem Potential für den Menschen.

In den letzten 20 Jahren wurden eine ganze Reihe von verschiedenen genetischen und epigenetischen Veränderungen in Tumoren nachgewiesen (Übersicht: Cordon-Carlo, 1998; Orntoft, 1998; Knowles, 1999; Grimm, 2000 in Uroonkologie; Rabbani, 2000). In Harnblasenkarzinomen nehmen molekularbiologisch nachweisbare Aberrationen (p53-Mutation, Verlust von Rb oder p16 u.a.) meist in direkter Korrelation mit Stadium und/oder Grad des Tumors zu. Die Veränderungen lassen sich in vier Klassen zusammenfassen:

(1) Aktivierung von Onkogenen

Als Onkogene bezeichnet man zelluläre Gene, deren Aktivierung infolge von Mutation oder Überexpression das Tumorwachstum bzw. die Tumorentwicklung fördert. Beispiele hierfür sind Ras-Gene, die in einigen Harnblasenkarzinomen durch Punktmutation aktiviert sind oder Myc und ERBB2, die häufig durch Überexpression aktiviert werden.

(2) Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen

Tumorsuppressorgene werden definiert als Gene, deren Inaktivierung zur Tumorentwicklung beiträgt. Die wohl bekanntesten Repräsentanten sind Rb und p53, auf die in Abschnitt 1.3 und 1.5 näher eingegangen wird. Die Inaktivierung des Rb-Regulationssystems (Rb-CyclinD1/CDK4-p16) und des p53-Kontrollsystems (p53 - mdm2 - p21^{WAF1} - p14^{ARF}) sind für die Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms von besonderer Bedeutung. Weitere wichtige Tumorsuppressorgene werden beim Harnblasenkarzinom auf den Chromosomenabschnitten 9q, 11p und 8p vermutet.

(3) Epigenetische Veränderungen

Epigenetische Veränderungen lassen sich in mindestens drei Klassen einteilen: DNA-Hypermethylierung von CpG-reichen Promotoren, genomweite Hypomethylierung und Verlust der elterlichen Prägung ("Loss of Imprinting") (Schulz, 1998). Auf DNA-Methylierungsveränderungen in Harnblasenkarzinomen wird in Kapitel 1.6 eingegangen. Beim Harnblasenkarzinom tritt Hypermethylierung in verschiedenen Tumorsuppressorgenen auf; fast durchgehend findet sich eine genomweite Hypomethylierung.

(4) Chromosomale Veränderungen

In Harnblasentumoren sind Chromosomenveränderungen wie numerische Verluste und Zugewinne, Amplifikationen und Translokationen häufig und nehmen mit Stadium und Grad des Tumors zu (Bender, 1998; Wagner, 1998). Besonders häufig kann der Verlust des langen

und kurzen Arms von Chromosom 9 nachgewiesen werden (Orntoft, 1998, Knowles, 1999). Auf dem kurzen Arm ist offensichtlich die Region 9p21 - wie z.B. auch in Melanomen, Glioblastomen und verschiedenen Formen von Leukämien - besonders häufig betroffen (Ruas, 1998). In dieser Region liegt *CDKN2A* (INK4A/ARF), das für p16^{INK4A}, einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase-4, und p14^{ARF}, einem Aktivator von p53, kodiert. Tatsächlich ist in Harnblasenkarzinomen die Inaktivierung auch des zweiten Allels dieses Gens sehr häufig (vgl. 1.2).

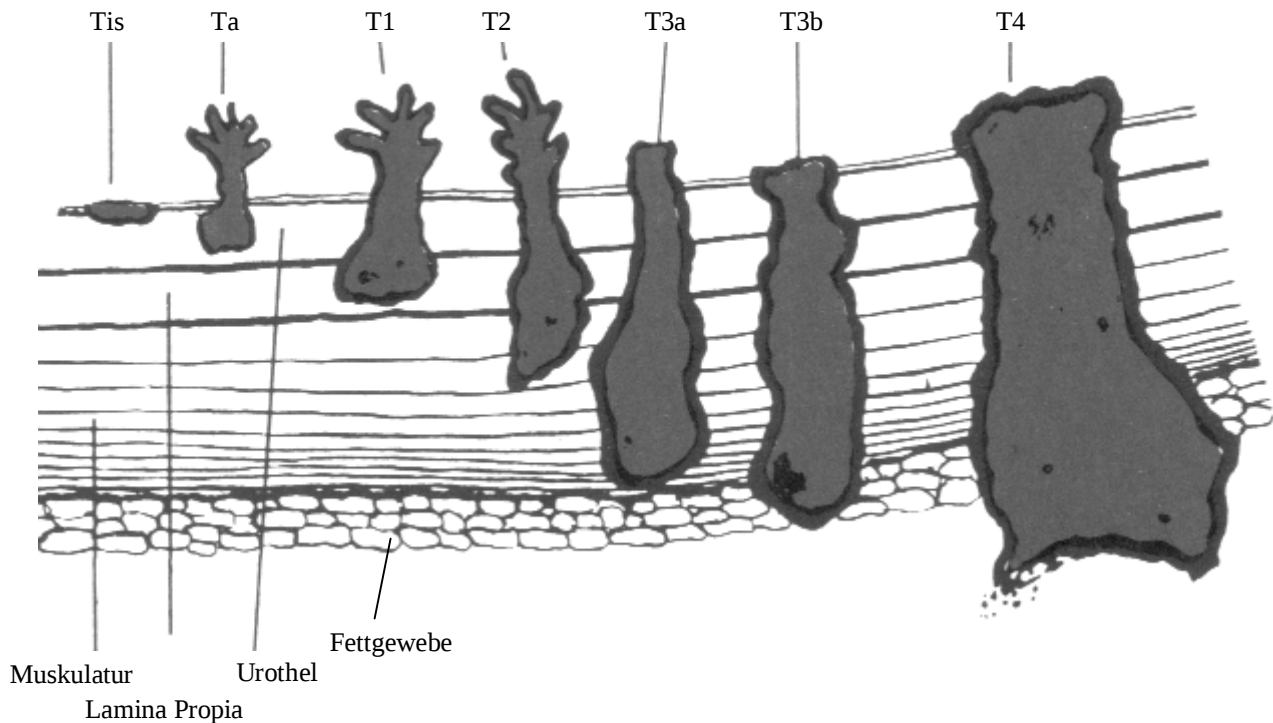
Alle diese Veränderungen tragen dazu bei, daß der geregelte Ablauf des Zellzyklus massiv gestört ist, und insbesondere die Kontrolle am G1-S-Übergang je nach Schwere der Abberation vollständig entfällt.

Um diese molekularen Veränderungen studieren und gezielt nutzen zu können, sind Zellkulturmodelle besonders geeignet. Rieger (1995) und Grimm (1995) haben gezeigt, daß die genetischen Veränderungen in einer Reihe von Harnblasenkarzinomzelllinien denen entsprechen, die auch in primären Harnblasenkarzinomen zu finden sind. Damit kann man in dieser Hinsicht Zelllinien als gutes Modell nutzen.

Tabelle 1.1: Genetische Veränderungen im Harnblasenkarzinom, modifiziert nach Knowles, 1995; *: Sidransky, 1991; Fujimoto, 1993; Habuchi, 1993; Sarkis, 1993; Soini, 1993; Spruck, 1993; Esrig, 1994; Williamson, 1994; Orntoft, 1998; Knowles, 1999

Gen /Region	Veränderung	Frequenz	Korrelation mit klinischem Status	Referenz
Rb	Deletion	30%	Muskelinvasive Tumoren (35-60%)	Cairns, 1991
p53	Deletion/ Punktmutation	18-70%	hoher Grad (50-70%)	Esrig, 1994 u.a.*
9p (insb. CDKN2A) und 9q	LOH	>60%	keine	Knowles 1994/1995/1999
p21^{CIP1}	Mutation	selten	n.d.	Watanabe, 1995
	Überexpression	~30%	auch frühe Stadien	Malkowicz, 1996 Clasen, 1998
c-myc	Überexpression	50-60%	-	Schmitz-Dräger, 1997
	Genamplifikation	~5%	hoher Grad	Sardi, 1998 Christoph, 1999

Abb. 1.1: Histopathologische Klassifikation von Urotheltumoren, nach: Histopathologische Klassifikation, Onkodialog



1.2 Zellzyklusregulation am G1-S-Kontrollpunkt

Um im Verlaufe des Zellzyklus Zellwachstum, DNA-Replikation und Verteilung der Chromosomen fehlerfrei zu garantieren, existieren verschiedene Kontrollpunkte. Zwei wichtige Kontrollpunkte befinden sich am Übergang von der G1 in die S-Phase und zwischen der G2-Phase und der Mitose. Der entscheidende Punkt in der G1-Phase, an dem sich in der Regel das Schicksal von Säugetierzellen entscheidet, wird Restriktionspunkt, R-Punkt, G1-S-Kontrollpunkt oder G1-S-Checkpoint genannt, und ist das Analogon zum "START" in *S. cerevisiae* (Hartwell, 1973; Pardee, 1974). In normal proliferierenden Zellen wird hier überprüft, ob die DNA intakt ist, und ob alle für den Ablauf der S-Phase notwendigen Faktoren in ausreichendem Maße vorhanden sind. Liegt beispielsweise infolge von UV-Strahlung ein DNA-Schaden vor, wird durch p53 vermittelt ein Wachstumsstop ausgelöst, und die S-Phase erst eingeleitet, wenn eine Reparatur erfolgt ist. Ist dies nicht möglich, so wird Apoptose ausgelöst. Einen Überblick über die Vorgänge am G1-S-Kontrollpunkt, die im Zusammenhang dieser Arbeit wichtig sind, gibt Abbildung 1.2. Für die Regulation von Zellproliferation und Differenzierung ist das c-myc-Genprodukt von Bedeutung (Henrikson, 1996). Man findet in Harnblasenkarzinomen sehr häufig Überexpression von c-myc; in

Tumoren von hohem Grad auch Genamplifikation (Sauter, 1995; Schmitz-Dräger, 1997; Christoph, 1999). Das c-myc-Gen ist eines der am meisten untersuchten Protoonkogene und spielt für die Tumorentstehung eine Rolle. Bakteriell exprimiertes c-Myc kann Rb vermittelten Zellzyklusarrest aufheben (Goodrich, 1992) und der p53-Promotor lässt sich durch c-Myc aktivieren (Roy, 1994). In normalen, aber ruhenden Zellen ist in der Regel keine c-myc Expression nachweisbar; diese wird aber sehr rasch induziert, wenn unter Wachstumsfaktorstimulation die Zellen anfangen zu proliferieren (Obaya, 1999). Obwohl c-myc in Zusammenhang mit der Proliferation der Zellen gebracht wird, kann Überexpression von c-myc unter Umständen auch zu einer erhöhten Apoptose führen (Henrikson, 1996).

Von besonderer Bedeutung für den G1-S-Übergang ist die Phosphorylierung des Rb-Proteins. In der späten G1-Phase wird Rb phosphoryliert und dadurch v.a. die Inhibition des Transkriptionsfaktors E2F aufgehoben, von dessen Aktivität viele S-Phase-spezifische Gene abhängen. Auf die Wirkung von Rb wird in Kapitel 1.5 näher eingegangen. Die Phosphorylierung von Rb erfolgt insbesondere durch die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4/CDK6 und CDK2. CDK4/CDK6 werden durch Cyclin D aktiviert, CDK2 durch Cyclin E. Die Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen ("CDK") wird durch spezifische Inhibitoren ("CKI") gesteuert. Diese können in Säugern in zwei Klassen eingeteilt werden.

Die erste Klasse umfaßt Mitglieder, die Komplexe zwischen CDK2- bzw. CDK4 und CDK6 mit den jeweiligen Cyclinen hemmen. Dazu gehört z.B. p21^{CIP1}, das durch Interaktion mit CDK-Cyclin-Komplexen konzentrationsabhängig den Zellzyklus hemmen kann, darüber hinaus auch die DNA-Replikation durch Interaktion mit PCNA. Das CIP1-Gen (auch als WAF1, SDI1, MDA6, p21 bekannt) liegt auf Chromosom 6p21 und ist ein direktes und universelles Zielgen von p53 (El-Deiry, 1993; Harper, 1993). Etwas überraschend findet man in Karzinomen nur selten Mutationen in diesem Gen (Shiohara, 1994; Gao, 1995, Watanabe, 1995); vielmehr konnte eine Dysregulation von p21 in Form einer Überexpression gegenüber Normalgewebe sowohl in Lungenkarzinomen (Marchetti, 1995) als auch in frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms (Clasen, 1998) nachgewiesen werden.

Die zweite Familie von CDK Inhibitoren wird unter dem Namen INK4 (polypeptide inhibitors of CDK4 and CDK6) oder CDKN2 (CDK inhibitor 2) zusammengefaßt. Sie umfaßt die Proteine: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}. Sie hemmen durch Verdrängung von D-Cyclinen CDK4 und CDK6, aber nicht die anderen CDKs. Der INK4a/ARF Locus kodiert für zwei Produkte, die sowohl das Rb- als auch das p53-Kontrollsystem betreffen und somit die beiden Wege miteinander verbinden (Ruas, 1998). Dieser Locus (Chromosom 9p21) ist in Harnblasenkarzinomen häufig deletiert. Wie in anderen Tumoren, Lungentumoren (Merlo,

1994), Hauttumoren (Quinn, 1994), Ovarialtumoren (Schultz, 1995), Nierenkarzinomen (Cairns, 1995), findet man Deletionen in Chromosom 9 sehr häufig in frühen Stadien der Tumorentwicklung. Benachbart zum p16-Gen (INK4A/MTS1/CDKN2A) liegt auch das Gen für p15 (INK4B/MTS2/CDKN2B) auf Chromosom 9. Der Verlust der p16-Funktion, meist verbunden mit einem Verlust von p15, ist eines der häufigsten Ereignisse im Harnblasenkarzinom (Gruis, 1995, Yeager, 1995). Williamson et al (1995) haben homozygote Verluste von p16 in 38% fortgeschrittener Tumoren beobachtet. Eine Studie des hiesigen Labors (Florl, 2000) ergab in 20% der untersuchten Harnblasenkarzinomen homozygote Deletion und in 40% LOH.

1.3 p53: Gen, Protein und Funktion

Das Protein P53 ist ein nukleäres tetrameres Phosphoprotein, das 393 Aminosäuren (AS) enthält, mit einer Transaktivierungsdomäne (AS 1-24), einer spezifischen DNA-Bindungsdomäne (AS 120-292), einer Tetramerisierungsdomäne (AS 324-355) und einer Domäne, die die Bindung an DNA vermittelt (AS 355-395). Das p53-Gen besteht aus 11 Exonen und 10 Intronen; das Primärtranskript hat eine Länge von 20 kb. Die Exone 4-8 korrespondieren zur DNA-Bindungsdomäne; in diesem Bereich finden sich 90% aller in menschlichen Tumoren beschriebenen Missense-Mutationen. Eine Übersicht über die Struktur des p53-Gens und -Proteins wird in Abbildung 1.3 gegeben. Der Tumorsuppressor P53 reguliert eine Anzahl von zellulären Antworten auf DNA-Schäden, insbesondere bei der Kontrolle am G1-S-Kontrollpunkt (Zellzyklusarrest und Auslösen von Apoptose als Antwort auf irreparable DNA-Schäden) ferner am Spindel-Kontrollpunkt im Verlauf der Mitose.

Die Fähigkeit von p53, die Transkription von bestimmten Genen zu aktivieren, läßt vermuten, daß durch p53 induzierte Gene eine biologische Rolle als Tumorsuppressoren haben, z.B. p21^{CIP1}, als direktes Zielgen von Wildtyp-p53; WAF1 wiederum bindet an CDK2 und inhibiert dessen Aktivität, wodurch die Phosphorylierung von kritischen Cyclin-abhängigen Kinase-Substraten verhindert wird und damit die Zellzyklus-Progression aufgehalten wird. In einer ganzen Reihe von Tumorzelllinien findet man neben p53-Funktionsverlust Veränderungen in der Chromosomenzahl (Aneuploidie). Diese Beobachtung könnte damit zu erklären sein, daß p53 maßgeblich am Spindelkontrollpunkt während der Mitose beteiligt ist (Cross, 1995). Dieser Kontrollpunkt befindet sich am Übergang der Metaphase in die Anaphase. Hier wird der Ablauf der Kontraktion der Mikrotubuli kontrolliert. Offensichtlich wird infolge von p53-Verlust die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen im Verlauf der Mitose erheblich gestört.

Das Protein P53 kann aufgrund seiner sehr kurzen Halbwertszeit von nur 20 Minuten nur sehr schlecht in normalen, nicht aktiv proliferierenden Zellen nachgewiesen werden. Dahingegen lässt sich das Protein in aktiv proliferierenden, nichttransformierten Zellen, und noch besser in Zellen mit DNA-Schäden, nachweisen. Als Folge von DNA-Schäden wird P53 phosphoryliert und dadurch stabilisiert. Der Abbau von P53 erfolgt ubiquitinvermittelt, wobei MDM2 als Ubiquitin E3-Ligase wirkt. Mutantes P53 akkumuliert ebenfalls in den Zellen und lässt sich immunhistochemisch leicht nachweisen. Dies liegt darin begründet, daß mutiertes p53 in der Regel eine stark verlängerte Halbwertszeit aufweist, da es MDM2 nicht mehr induzieren kann, und somit der durch MDM2 vermittelte Abbau verhindert wird. Der immunhistochemische Nachweis von p53 liefert in den meisten Tumoren einen sehr sicheren Anhaltspunkt für das Vorliegen von p53-Mutationen (Dalbagni, 1993; Esrig, 1992, 1994; Lipponen; 1993; Soini, 1993). Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen oder Verlust von Chromosom 17p finden sich in über 50% menschlicher Tumore und ihr Auftreten ist oft mit einer hohen Progressionswahrscheinlichkeit korreliert (Hollstein, 1991 und 1998; Levine, 1991).

Wegen seiner herausragenden Rolle bei der Kontrolle von DNA-Schäden wird p53 auch als "Guardian of the Genome" (Lane, 1992) bezeichnet. Als zelluläre Konsequenzen einer p53-Defizienz können genetische Instabilität und eine reduzierte Apoptoserate auftreten. Diese Defekte begünstigen eine Tumorprogression (Habuchi, 1992 und 1993, Bender, 1998). Die Mechanismen der Inaktivierung von p53 sind vielfältig.

Beispiele hierfür sind:

(1) Deletion von einem oder beiden p53 Allelen reduziert die Bildung von Tetrameren. Da P53 als tetramerer Proteinkomplex aktiv ist, führt der Verlust eines Allels bereits zu einer Reduktion der Konzentration funktionsfähiger P53-Tetramere in der Zelle. Es wurde gezeigt, daß Mäuse mit Verlust eines p53-Allels bereits eine erhöhte Rate von Tumoren zeigen (Venkatachalam, 1998).

(2) Verschiedene Mutationen, darunter Nonsense-Mutationen, Spleiß-Mutationen oder Missense Mutationen führen zu einem verkürzten oder nicht funktionsfähigen Protein. Sie erlauben keine Oligomerisierung und führen zu einer verminderten Konzentration funktional aktiver Tetramere. In verschiedenen Tumoren wurden Mutationsanalysen des p53-Gens durchgeführt. Mutationshotspots befinden sich in den Exonen 4-8. Beispielsweise wird die in Codon 249 häufig auftretende Mutation (AGG>AGT; Arg>Ser) mit der Wirkung des

Karzinogens Aflatoxin in Zusammenhang gebracht (Greenblatt, 1994; Hainaut, 1997; Hollstein, 1998). Eine Übersicht über die identifizierten Mutationshotspots wird in Tabelle 1.3 gegeben. In der Datenbank unter <http://www.iarc.fr/P53/index.html> (Verweis und Erläuterung in Hainaut, 1998) sind alle bis dato identifizierten p53-Mutationen verzeichnet.

Für Urothelkarzinome ist die Inaktivierung von p53 durch Missense Mutationen von besonderer Bedeutung. Dabei nimmt die Häufigkeit von p53 Mutationen besonders mit dem Malignitätsgrad des Tumors, weniger mit dem Stadium des Tumors zu. In bis zu 70% von schlecht differenzierten Urothelkarzinomen (G3, G4) wurden Mutationen in p53 berichtet (Übersicht in Bender, 1998).

(3) Die Expression von viralen Genen (SV40, E1B, E6) führt zu einer funktionellen Inaktivierung von p53. Das große T-Antigen des SV40-Virus bindet sowohl das Rb-Protein als auch das P53-Protein und inaktiviert diese. Das Protein P53 wurde auf diese Weise, als zelluläres Bindungsprotein des SV40-Tumovirus, entdeckt (Chang, 1979; Kress, 1979; Lane and Crawford 1979; Linzer, 1979; Melero, 1979). Die DNA des Typ-5-Adenovirus kodiert ein Protein E2B, das nur P53, nicht aber Rb bindet und inaktiviert. E6 (Papilloma Virus Typ 16 und 18) bindet P53 und aktiviert dessen ubiquitin-vermittelte Proteolyse.

(4) Außerdem wird der p53-Weg durch die Wirkung von MDM2 beeinflusst. MDM2 ist für den Ubiquitin-vermittelten Abbau von p53 verantwortlich und ist in spezifischen menschlichen Tumoren überexprimiert.

(5) Die Aktivität von Rb und p53 wird durch die zwei Produkte des INK4a/ARF-Locus, p16^{INK4a} und p19^{ARF}, moduliert. P19^{ARF} kann sowohl p53-abhängig wie p53-unabhängig einen Zellzyklusarrest vermitteln. Auf der einen Seite hemmt p19^{ARF} MDM2 und fördert damit einen p53-vermittelten Zellzyklusarrest. Auf der anderen Seite kann dieser Arrest auch ohne p53-Vermittlung, wohl unter Mitwirkung von MDM2, erfolgen (Lloyd, 2000). In Harnblasentumoren findet man LOH im Genbereich des INK4a/ARF-Locus sehr häufig (vgl. Tab. 1.1). Der Verlust von ARF hat eine erhöhte Zellproliferationsrate zur Folge, da die Zellzyklus-inhibierende Funktion entfällt.

Die Fähigkeit von p53, in Zellen mit DNA-Schäden oder Aneuploidien Apoptose auszulösen, ist Grundlage einer Reihe gentherapeutischer Ansätze (Übersicht in Nielsen, 1998). In Hinblick auf eine gentherapeutische Anwendung wäre ein Ziel, daß die gezielte Reexpression von Wildtyp-p53 in ausreichendem Maße in Tumorzellen Apoptose induziert, aber nicht auch in Normalzellen (Substitution-Gentherapie). Die Spezifität soll dabei über einen selektiv in Tumorzellen aktiven Promotor erreicht werden. Ein weiterer gentherapeutischer Ansatz nutzt

die Fähigkeit des Adenovirus ONYX (E1b55K defizienter Virus) aus, selektiv nur in p53-defizienten Tumorzellen zu replizieren (Nemunaitis, 2000, Dix, 2000). Aufgrund der Tatsache, daß p53-Funktionsverlust sehr häufig auftritt, ist dies ein vielversprechender Ansatz (Phase II-Studie in Nemunaitis, 2000). Die Wirkung von p53 basiert dabei auf der Tatsache, daß die meisten Tumoren kein funktional aktives p53 exprimieren und somit durch die Reexpression von Wildtyp-p53 dessen Funktion wieder hergestellt wird. Damit handelt es sich zunächst um eine Substitutions-Gentherapie. Tatsächlich führt in Harnblasenkarzinomzelllinien mit mutantem p53-Gen eine Reexpression von Wildtyp-p53 von sehr starken Promotoren wie dem viralen CMV-Promotor zu einer schnellen und effizienten Apoptose (Makri, 1997 und 1998), so daß p53 dort als cytotoxisches Gen wirkt. Auf welche Weise p53 im einzelnen Apoptose auslöst, ist nicht ganz geklärt (Übersicht in Mowat, 1998; Pucci, 2000; Rich, 2000). Ein potentiell wichtiges Zielgen ist das Bax-Gen. Bax ist Mitglied der Bcl-2 Genfamilie, die an der Apoptoseregulation beteiligt ist (Reed, 1996). Bax bildet mit Bcl-2 ein Dimer und reguliert den Zelltod (Oltvai, 1993). Überexpression von p53 oder die p53-Induktion durch DNA-schädigende Agenzien führt in vielen Zelltypen zu einer erhöhten Bax-Expression und zu einer verminderten Bcl-2-Expression (Miyashita, 1994; Zhan, 1994). In einigen Geweben ist Bax für die p53-abhängige Apoptose aber nicht notwendig (Brady, 1996). Polyak (1997) haben mittels SAGE eine Reihe von Transkripten vor dem Einsetzen der Apoptose identifiziert, die durch p53 Expression induziert wurden. Sie schlagen ein Modell vor, nach dem zunächst transkriptionell Oxidoreduktasen induziert werden. Dadurch wurden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet, die über Störung der Mitochondrien zu deren Abbau führen. Damit wird Cytochrom c freigesetzt und darüber werden Caspasen aktiviert, die den apoptotischen Prozeß vorantreiben.

Tabelle 1.3: p53-Mutationen in menschlichen Tumoren

(a) p53 Mutationen in Harnblasenkarzinomen und soliden Tumoren im allgemeinen, nach Hollstein, 1998; Del= Deletion, Ins= Insertion, CpG= Mutation innerhalb eines CpG-Dinukleotids, N:N>N':N'= Mutation von Wildtyp N:N nach N':N'

(b) p53-Mutationsanalyse in Harnblasenkarzinomen modifiziert nach Datenbank:

www.iarc.fr/P53/index.html; Anzahl= Anzahl der unabhängig detektierten Mutationen.

Polymorphismen werden dabei nicht beachtet. Hotspots= Codon des Hotspots wird angegeben. Dabei wird ein Codon als Mutationshotspot gewertet, wenn mehr als 5 unabhängig detektierte gleiche Mutationen bekannt sind. #=Anzahl

(c) Auflistung der bekannten Polymorphismen in den Exonen 4 und 6 des humanen p53-Gens. In den Exonen 4-8 sind insgesamt 4 Polymorphismen bekannt, wobei aber nur die beiden in Codon 72 und 213 aufgrund ihrer Frequenz für die Untersuchungen in dieser Arbeit bedeutsam sind.

(a)

Tumortyp	G:C>A:T	G:C>T:A	G:C>C:G	A:T>G:C	A:T>T:A	A:T>C:G	Del/Ins etc	CpG
Harnblase	48%	12%	14%	10%	3%	3%	10%	16%
solide Tumoren allgemein	43%	16%	8%	11%	6%	3%	13%	25%

(b)

Exon	Anzahl (#)	Hotspots	# Missense Mutationen	# Deletionen	# Stille Mutationen	# Stop Mutationen	# keine Angabe
IV	34	-	22 (64,7%)	6 (17,6%)	3 (8,8%)	3 (8,8%)	-
V	153	132, 135, 138, 146, 151, 152, 155, 157, 158, 175, 179	117 (76,5%)	9 (5,9%)	9 (5,9%)	17 (11,1%)	1 (0,7%)
VI	75	192, 196, 213, 214, 220	45 (60,0%)	6 (8,0%)	3 (4,0%)	21 (28,0%)	-
VII	157	234, 241, 245, 246, 248, 249	138 (87,9%)	6 (3,8%)	10 (6,4%)	3 (1,9%)	-
VIII	210	267, 271, 273, 277, 280, 282, 285, 287	180 (85,7%)	10 (4,8%)	12 (5,7%)	8 (3,8%)	-
IX	8	-	5 (62,5%)	1 (12,5%)	1 (12,5%)	1 (12,5%)	-
X	6	-	3 (50,0%)	1 (16,7%)	-	2 (33,3%)	-
XI	1	-	-	1 (100,0%)	-	-	-

(c)

Exon	Codon	Austausch	Häufigkeit	Referenz
4	36	CCG>CCA (Pro>Pro)	96 : 4	Felix, 1994
4	47	CCG>TCG (Pro>Ser)	100 : 0 (Kaukasier); 98,5 : 1,5 (USA-Afrikaner)	Felley-Bosco, 1993
4	72	CGC>CCC (Arg>Pro)	65 : 35	Ara, 1990
6	213	CGA>CGG (Arg>Arg)	97 : 3	Mazar, 1992

1.4 Apoptose

Im Zuge von Wachstum und Differenzierung eines Organismus müssen auf streng geregelte Weise Zellen eliminiert werden. Der geregelte, physiologische Untergang von Zellen wird als Apoptose bezeichnet. Er unterscheidet sich morphologisch von Nekrose dadurch, daß die betroffenen Zellen schrumpfen, ohne daß Organellen beschädigt werden; es entstehen Apoptosekörper, in denen intakte Organellen abgeschnürt werden und das Chromatin fragmentiert wird. Dabei wird im Gegensatz zur Nekrose kein Zellinhalt freigesetzt; es entstehen keine Entzündungen. Dieser Prozeß wird ausgelöst, wenn Zellen ohne Funktion vorliegen, ein Überschuß an Zellen besteht, fehlentwickelte Zellen vorliegen oder Zellen mit schädlichem Potential vorhanden sind (Übersicht in Afford, 2000).

Der molekulare Ablauf der Apoptose in normalen Zellen gliedert sich in 4 Phasen. In der ersten Phase wird die Entscheidung getroffen, welche Zellen durch den programmierten Zelltod eliminiert werden sollen. Apoptose-Signale werden je nach Zelltyp z.B. vom CD95/FAS/APO-1 Rezeptor (TNFR Familie, Tumor-Nekrose-Faktor) empfangen (Lymphozyten, epitheliale Zellen, Hepatozyten). Die Apoptose wird dann von einem entsprechenden Liganden (CD95-Ligand, CD95L, FAS-Ligand, FASL) ausgelöst. Auslöser können auch Glucocorticoide (Chemotherapie), Schädigung der DNA infolge Strahlung oder Chemikalien etc. sein. Einige Wachstumsfaktoren, z.B. EGF oder IGF1, können der Apoptose entgegenwirken. Sehr früh im Ablauf der Apoptose treten Änderungen an der Zelloberfläche und Plasmamembran ein. Eine wichtige Veränderung ist die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Membran zur Außenseite, so daß Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche exponiert wird. Phosphatidylserin kann mittels Annexin-V - einem Phospholipid-bindenden Protein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin - z.B. durchflußzytometrisch nachgewiesen werden. In der zweiten Phase wird der Stoffwechselvorgang, der für die Durchführung der Apoptose wichtig ist, in Gang gesetzt. In der dritten Phase erfolgt die Phagozytose der Zelle. In vielen, aber nicht allen Zellen läßt sich als irreversibler Vorgang innerhalb der Apoptose eine Fragmentierung genomischer DNA nachweisen. Dieser Vorgang wird durch Aktivierung endogener Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängiger nukleärer Endonukleasen ausgelöst, die Linker-DNA selektiv zwischen Nukleosomen schneiden und mono- und oligonukleosomale DNA-Fragmente erzeugen. In der letzten Phase werden durch Proteinasen und Ca^{2+} -abhängige Endonukleasen verbleibende Zellreste degradiert. Morphologische Merkmale und Veränderungen beim Ablauf der Apoptose können licht- oder phasenkontrastmikroskopisch verfolgt werden. Hierzu zählen bläschenförmige

Ausstülpungen der Plasmamembran (Zeiose) und das Auftreten der charakteristischen apoptotischen Körper. Erst spät im Ablauf kommt es zur Freisetzung der bereits zum größten Teil fragmentierten DNA, die durch Propidiumiodid angefärbt und detektiert werden kann. Apoptose kann somit auf verschiedenen Stufen nachgewiesen werden; frühe Stadien z.B. über Annexin V in Kombination mit dem Nachweis später Phasen durch Propidiumiodid -Färbung.

Offensichtlich ist der Regelmechanismus der Apoptose in Tumoren erheblich gestört, so daß Zellen mit schädigendem Potential stark proliferieren können. Dazu tragen mehrere Störungen in Tumorzellen bei, z.B. die Expression viraler Onkogene, Rb-Verlust (Harbour, 2000, Sherr, 2000), Myc-Amplifikation (Amati, 1998, Bouchard, 1998), Bcl-2 Deregulation (Pellegrini, 1999), MDM2-Überexpression (Eid, 1999; Morgan, 1999), Fas-Deregulation (Owen-Schaub, 2000) und sehr bedeutsam: p53-Funktionsverlust (Asker, 1999; Sherr, 2000).

1.5 Rb: Gen, Protein und Funktion

Das Rb1-Gen ist das erste beim Menschen beschriebene Tumorsuppressorgen (Lohmann, 1999; Übersicht in Macleod, 2000). In fast allen Retinoblastomen (RB) - einem bei Kindern auftretenden Tumor aus Vorläuferzellen der Retina - sind beide Allele des Gens inaktiviert (Friend, 1986). Ist ein Allel bereits durch eine Keimbahnmutation inaktiviert und eine zweite Mutation später erworben, treten Tumore bei diesen Patienten auch bilateral auf, hingegen ohne diese Predisposition fast nur unilateral. Diese Beobachtungen führten zur "Two Hit"-Hypothese, die A.G. Knudson 1971 formulierte: Zwei unabhängige Mutationen sind erforderlich, um zu einem malignen Wachstum zu führen. Bei der hereditären Form ist ein Teil der Voraussetzung schon erfüllt: eine Mutation liegt bereits in der Keimbahn vor, eine zweite wird erworben. Dies erklärt das sehr frühe und bilaterale Auftreten der Tumore in hereditären Fällen. Bei sporadischen Tumoren müssen zwei unabhängige Veränderungen in derselben Zelle erworben werden.

Das Rb1-Gen liegt auf Chromosom 13q14 und ist auch in anderen Tumoren mutiert oder deletiert (Osteosarcoma, Friend, 1986; Lungenkrebs, Harbour 1988; Brustkrebs, T'Ang, 1988; Prostatakarzinom, Bookstein, 1990). In Urothelkarzinomen findet man in ca. 30% der Tumore LOH des Genbereichs (Cairns, 1991; Bender, 1998). Veränderungen in Rb korrelieren positiv mit dem Grad und Stadium von Harnblasenkarzinomen (Presti, 1991; Xu, 1993). Cordon-Carlo et al (1992) und Logothetis et al (1992) haben unabhängig voneinander signifikante Veränderungen in der Rb-Protein-Expression in muskelinvasiven Transitionalzellkarzinomen

gezeigt. In prognostischen Studien erweisen sich diejenigen Tumoren mit Rb-Verlust als besonders aggressiv. Zellbiologisch ist das 105 kDa große Protein Rb von herausragender Bedeutung für die Regulation des G1-S-Übergangs im Zellzyklus (Goodrich, 1991; Weinberg, 1995; Dyson, 1998). Spät in der G1-Phase wird Rb durch Phosphorylierung, die zunächst durch den CDK4,6-CyclinD-Komplex vermittelt wird, teilweise inaktiviert. Hierdurch wird E2F, das von aktivem Rb gebunden wird, vorübergehend frei und kann als Transkriptionsfaktor auf eine ganze Reihe von Genen wirken, die spät in der G1-Phase (z.B. c-myc, Cyclin E) oder in der S-Phase (PCNA, DNA-Polymerase α) aktiv werden. Eine weitere Phosphorylierung durch Cyclin E/CDK 2 inaktiviert das Protein dann bis zum Beginn der nächsten G1-Phase.

Für die Rb-vermittelte Tumorsuppression ist eine zentrale Domäne ("Pocket domain") notwendig, die in Tumoren durch Punktmutationen oder Deletionen inaktiviert wird und zudem Zieldomäne mehrerer viraler Onkogene ist (Whyte, 1988; Dyson, 1989; Ludlow, 1989; Horowitz, 1990). Beispielsweise bindet das transformierende Virusprotein E1A an Rb und spaltet damit den Rb-E2F-Komplex. Rb unterdrückt die E2F-abhängige Transkription durch mindestens zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen bindet es direkt an die Transaktivierungsdomäne von E2F und blockiert sie. Zum anderen bindet Rb als Komplex mit E2F an Promotoren und reprimiert die Transkription über die Rekrutierung von HDAC (Histondeacetylase) - Komplexen. Aktives hypophosphoryliertes Rb hält auf diese Weise die Zellen in der G1-Phase.

Die E2F-Familie ist eine Protein-Familie von Transkriptionsfaktoren. Zu ihnen zählen E2F-1, E2F-2 und E2F-3, an die Rb vornehmlich bindet, E2F-4, an das Rb nur in einzelnen Zelltypen bindet, E2F-5 und E2F-6. E2F-6 nimmt eine Sonderstellung ein und zeigt nur in geringem Ausmaß Homologie zu den anderen Familienmitgliedern. Es bindet an DNA, besitzt aber keine Transaktivierungsdomäne. Dies weist daraufhin, daß es sich um einen Transkriptionsrepressor handelt (Kusek, 2000). E2F-4 und E2F-5 werden vornehmlich von den mit Rb verwandten Pocketdomänenproteinen p107 und p130 gebunden, die ebenfalls am G1-S-Kontrollpunkt wirken (Macleod, 1999). E2F spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, z.B. in der Embryonalentwicklung. E2F-1, das v.a. in der vorliegenden Arbeit betrachtet wird, wird durch Cyclin-A-abhängige Kinasen hyperphosphoryliert, was zur Verminderung der DNA-Bindungs-Affinität führt (Kusek, 2000). Dyson et al (1998) vermuten, daß die Phosphorylierung von E2F-1 in der späten S-Phase dazu dient, die E2F-Aktivität zu beenden.

Hsieh et al (1999) konnten zeigen, daß Bindung von Rb an MDM2 die antiapoptotische Funktion von MDM2 und die MDM2-abhängige Degradierung von p53 kontrolliert. Da Rb spezifisch die apoptotische Funktion von p53, nicht aber die transkriptionelle Aktivität von p53 vor der negativen Regulation durch MDM2 bewahrt, ist eine Transaktivierung durch Wildtyp-p53 für die apoptotische Funktion von p53 nicht notwendig. Der Verlust der Rb-Funktion in Tumoren führt zu einem selektiven Druck, das pro-apoptotische Tumorsuppressorprotein p53 ebenfalls zu inaktivieren, da Zellen mit Defekten im Rb-abhängigen Weg sonst eliminiert würden. Die gemeinsame Inaktivierung von p53 und Rb findet man daher nicht nur in Harnblasenkarzinomen, sondern auch in einer ganzen Reihe von soliden Tumoren. Ein Ansatz zum tumorspezifischen Gen-Targeting könnte daher die Deregulation des Zellzyklus (und damit die Überexpression von Transkriptionsfaktoren wie E2F) am G1-S-Kontrollpunkt infolge von Rb-Funktionsverlust ausnutzen und andererseits den Funktionsverlust von p53 zur selektiven Apoptoseinduktion nutzen.

1.6 Veränderungen der DNA-Methylierung in Harnblasenkarzinomen

Im Säuger genom sind etwa 1% aller Basen 5'-Methylcytosine. Methylierung von Cytosin ist in Säugetierzellen die wichtigste kovalente, postreplikative Modifikation der DNA und wird pauschal als DNA-Methylierung bezeichnet. Vermittelt wird sie durch DNA-Methyltransferasen; die am besten charakterisierte davon, DNMT1, ist ein ca. 190 kDa großes Protein (Leonhardt, 1993). Sie verfügt über zwei verschiedene DNA-Methyltransferase-Aktivitäten, zum einen die de-novo-Methylierung, bei der eine Methylgruppe an unmethylierte DNA angebracht wird und die "methyl-directed DNA-Methylation" oder "Erhaltungsmethylierung", bei der hemimethylierte DNA in einen symmetrisch methylierten Zustand gebracht wird (Riggs, 1989; Laird, 1996). Hohe Methylierungsdichte der Promoter-Regionen von Genen verhindert die Transkription des betreffenden Gens über Bindung von Repressorkomplexen (Bird, 1999). Auf diese Weise kann DNA-Methylierung zur Repression der Transkription führen (Siegfried, 1999). MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4 bilden eine Familie von Proteinen, die über eine gemeinsame Methyl-CpG-Bindungs-Domäne (MBD) an Methylcytosin binden, und MeCP2, MBD1 und MBD2 interagieren mit Histon-Deacetylase-abhängigen Transkriptions-Repressionskomplexen (Ballestar, 2001). Außerdem ist die Bindung vieler Transkriptionsfaktoren methylierungssensitiv (Bergman, 1998). Stark methylierte CpG-Inseln sind in Regel komplett inaktiv.

Zunächst wurde angenommen, daß 5-Methylcytosin bei der gewebespezifischen Regulation von Genen während der Entwicklung eine Rolle spielt. Die primäre Rolle von Cytosin-Methylierung liegt jedoch in der transkriptionellen Inaktivierung von Transposon-Elementen, beim genomischen Imprinting und der Inaktivierung des X-Chromosoms. Über 90% der 5-Methylcytosine liegen innerhalb von Transposonsequenzen, die insgesamt ein Drittel des menschlichen Genoms ausmachen, und in einigen CpG reichen Satellitensequenzen (Yoder, 1997). Das menschliche Genom enthält besonders viele LINE-1 Retrotransposons. Diese Elemente machen mehr als 15% des Genoms aus (Kazazian, 1998; Li, 2001). Ein komplettes Element besteht aus den Regionen 5'UTR (untranslatierte Region), die einen internen Promotor enthält, zwei offene Leseraster, die für ein ca. 40 kDa großes RNA bindendes Protein (ORF1), ein Protein mit Endonuklease-Aktivität und ein Protein mit Reverser Transkriptase-Aktivität (ORF2) kodieren, sowie einer 3'nichttranslatierten Region (3'UTR) mit poly-A-Schwanz. Unter den LINE-Kopien im Genom sind weniger als 5% vollständig und weniger als 10% nur intern deletiert (Kazazian, 1998). Auch unter den Elementen mit voller Länge sind wenige fähig zur Retrotransposition; diese sind wahrscheinlich infolge von DNA-Methylierung transkriptionell inaktiv. Von den Vollängenkopien im menschlichen Genom können demnach etwa 50 intakte nach Aktivierung der Transkription ein hohes Insertionspotential entfalten (Sheen, 2000). Tatsächlich sind einige Elemente bekannt, die in aktive Gene gesprungen sind (Kazazian, 1998, Kimberland, 1999), z.B. in das APC-Gen in einem Colonkarzinom (Miki, 1992) oder in den myc Locus in einem Mammakarzinom (Morse, 1988). Die Transkription von LINE-Elementen wird v.a. in Teratokarzinomen aktiviert (Bratthauer, 1992), doch findet eine schwächere Expression auch in anderen Tumoren statt (Alves, 2000; Florl, 1999).

Der humane LINE-1 Promotor, erstmals von Swergold et al 1990 charakterisiert, ist ein interner RNA Polymerase III-Promotor (Kurose, 1995) im Gegensatz zu den von Retroviren abgeleiteten Retroelementen beim Menschen (HERVs). Dies ist insofern überraschend, da die Transkription zu einem großen Transkript (~6 kb) führt und außerdem 3'terminale Polyadenylierung und poly(A)-Schwanz zu finden sind. Der Promotor enthält aber eine funktionale YY1-Bindungsstelle, die Pol-II-abhängig ist (Becker, 1993). In transienten Transfektionsexperimenten modulierten Transkriptionsfaktoren der SOX-Genfamilie (SRY-Box-Proteine) die Promotoraktivität um eine Zehnerpotenz (Tchério, 2000).

Genomweite Hypomethylierung wird in Harnblasenkarzinomen häufig gefunden (Thayer, 1993, Jürgens, 1996; Florl, 1998) und wirkt sich wesentlich auf LINE-1 und andere

Retroelemente wie HERV-K Retroviren aus. Auch Hypomethylierung des in Harnblasenkarzinomen häufig überexprimierten c-myc Protooncogens wurde nachgewiesen (Del Senno, 1989; Sardi, 1997). Auf der anderen Seite gibt es auch bei Harnblasenkarzinomen Hypermethylierung von Promotorregionen, die zur Inaktivierung von Tumorsuppressoren führt (Chaubert, 1997; Jarrad, 1997; Knowles, 1999).

Der Mechanismus, der zur Hypomethylierung in Tumoren führt, ist noch unbekannt; eine Möglichkeit besteht in der Aktivierung einer DNA-Demethylase. Während die Mechanismen der Methylierung durch DNA-Methyltransferasen schon besser erforscht sind, war der Mechanismus der Entfernung von Methylgruppen lange völlig unklar. Neben passiver Demethylierung (Jost, 1997) wurden verschiedene biochemische Wege der aktiven Demethylierung diskutiert (Razin, 1986; Vairapandi, 1993; Jost, 1995; Weiss, 1996; Swisher, 1998). 1999 konnten Bhattacharya et al ein Enzym aus HeLa-Zellen isolieren, das DNA-Demethylierung katalysiert und Methylgruppen an der 5'-Position des Cytosins entfernt. Es erwies sich als identisch mit MBD2; dieser Befund konnte allerdings von anderen Gruppen nicht bestätigt werden (Bird, 1999; Wolffe, 1999). In der Studie von Bhattacharya (1999) führte die transiente Transfektion von Vektoren mit der Kandidaten-Demethylase-cDNA zur DNA-Demethylierung in embryonalen Nierenzellen; bereits früher war gezeigt worden, daß aktive Demethylierung auch ohne Replikation stattfinden kann.

Aufgrund der beschriebenen genomweiten Hypomethylierung in Tumorzellen versus Normalzellen (Florl, 1999) wäre ein möglicher gentherapeutischer Ansatz derjenige, eben diesen Unterschied zu nutzen. Dazu könnte man in vitro methylierte Promotoren wie den humanen LINE-1 Promotor mit nachgeschaltetem therapeutischen Gen sowohl in Normalzellen wie in Tumorzellen transfizieren und die Fähigkeit der Tumorzellen, diese Sequenzen in vivo zu demethylieren, zu einer selektiven Aktivierung eines zytotoxischen Gens nutzen, beobachten.

Abb.1.2: Zellzyklus: Einige molekulare Prozesse am G1-S-Kontrollpunkt

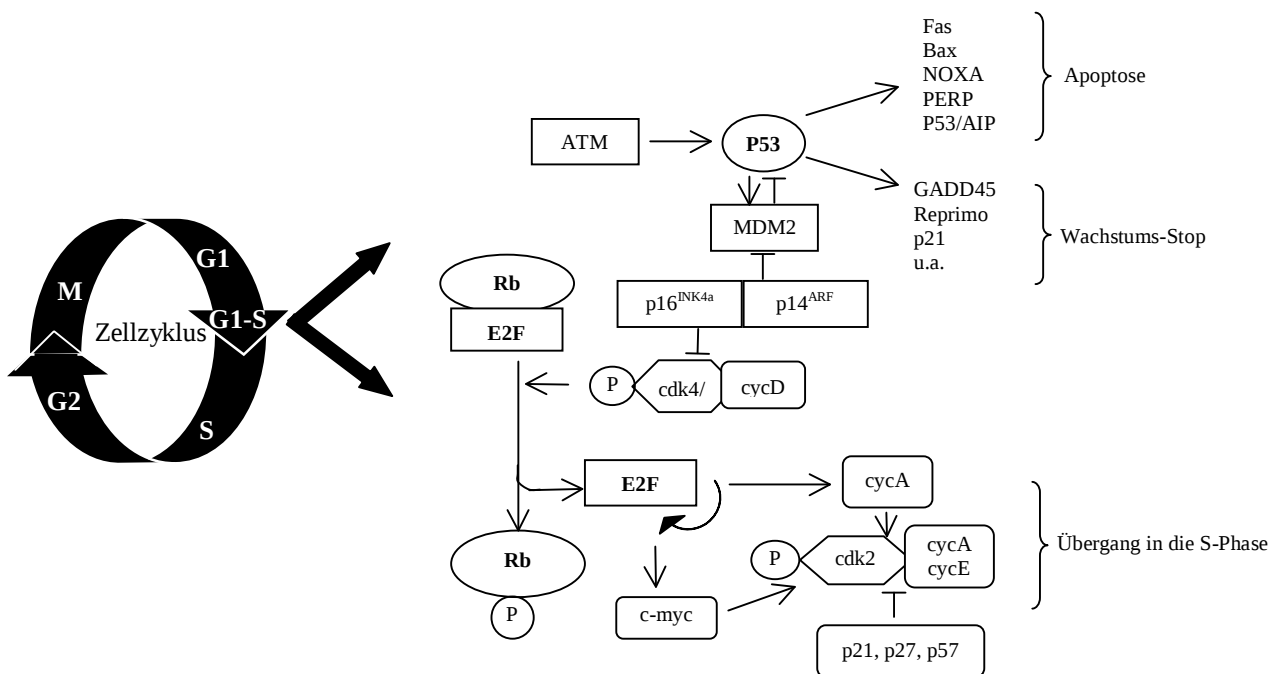
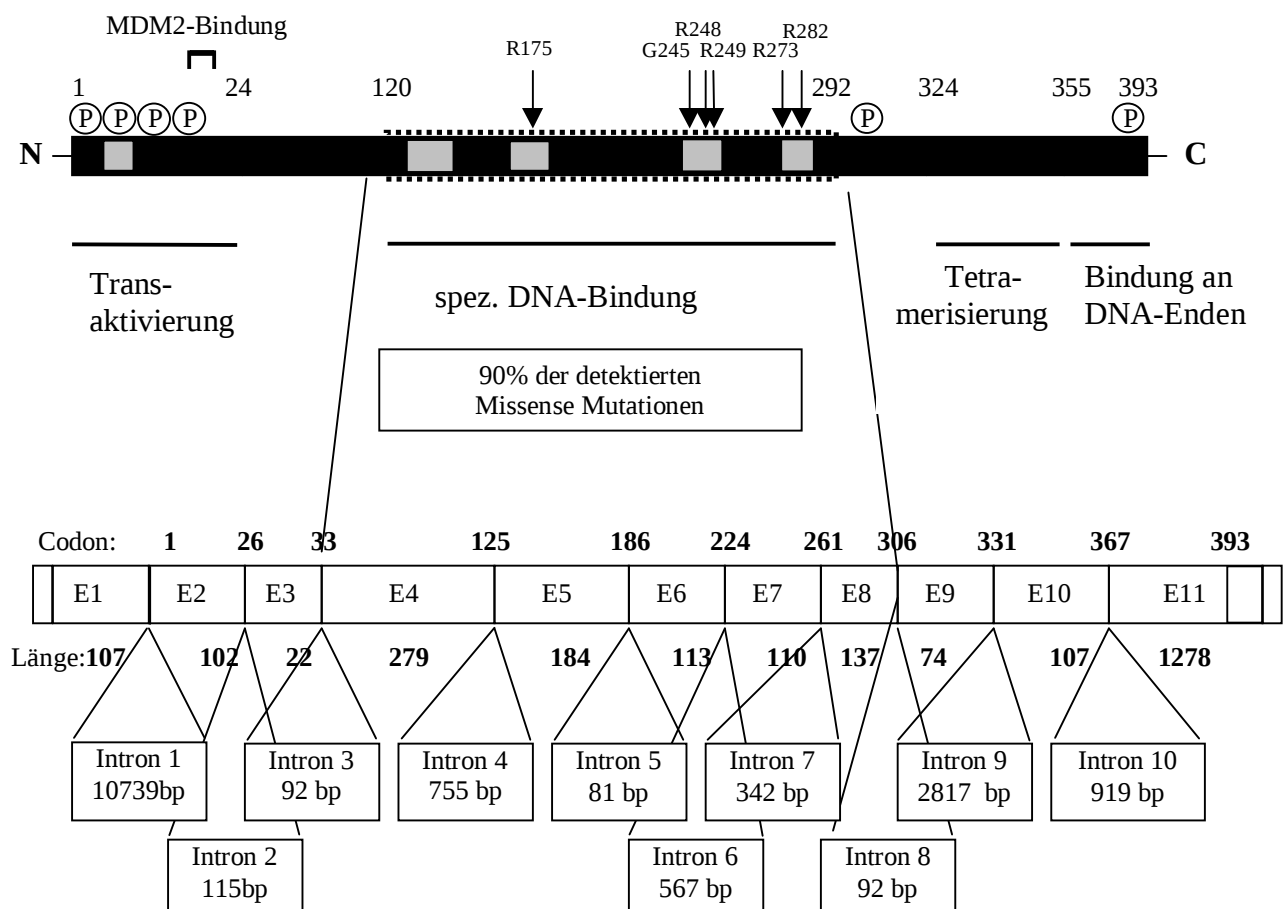


Abb 1.3: Struktur von P53 Protein und Gen, Rn bzw. Gn gibt die Codonnummer eines Mutationshotspots an.



1.7 Ziele der Arbeit

- Gen-Targeting durch Einsatz spezifischer Promotoren

Ein zentrales Problem der Krebstherapie ist die Selektivität, d.h. die möglichst vollständige Zerstörung malignen Gewebes bei minimaler Schädigung normalen Gewebes. Dieses Problem betrifft auch die Gentherapie maligner Tumore, insbesondere bei Benutzung toxischer Gene. Zur Expression toxischer Gene wäre daher ein tumorspezifischer Promotor geeignet, der eine Selektivität durch "transkriptionelles Targeting" gewährleistet. In dieser Arbeit sollte versucht werden, drei wesentliche Veränderungen in Harnblasenkarzinomen dazu zu nutzen, eine tumorspezifische Wirkung eines transfizierten Gens zu erzielen:

- die sehr häufige Inaktivierung der Funktion des p53 Tumorsuppressorproteins durch Punktmutationen im Gen oder dessen Deletion;
- die nahezu obligate Inaktivierung des G1-S-Kontrollpunktes durch Mutation von Rb oder p16;
- die fast immer über das gesamte Genom hinweg verminderte DNA-Methylierung, die u.a. die Promotorsequenzen von Retroelementen wie LINE-1 betrifft.

(1) "Zellzyklus-Ansatz"

Im zentralen Teil der Arbeit ging es darum, im Modell von Harnblasenkarzinomzelllinien und primär kultivierte normale Uroepithelialzellen

(a) die Tumorspezifität unterschiedlicher zellzyklusspezifischer Promotoren zu untersuchen und

(b) den Effekt durch verschiedene Promotoren kontrollierte transgene Wildtyp-p53-Expression auf normale und Karzinomzellen zu bestimmen.

Als Modell wurden eine Reihe von Harnblasenkarzinomzelllinien gewählt, die eingehend bezüglich ihrer molekularen Aberrationen charakterisiert waren und unterschiedliche Veränderungen in p53, Rb, p21, p16 sowie im Methylierungsstatus aufwiesen. Um die Tumorzelllinien mit ihrem normalen Pendant vergleichen zu können, sollte die Kultur von normalen uroepithelialen Zellen etabliert werden.

Alle ausgewählten Promotoren trugen mindestens eine funktionale E2F-Bindungsstelle. Die Wirkung der Promotoren sollte zunächst wie folgt charakterisiert werden:

(a) Die Promotoraktivitäten sollten im Reporterluziferasesystem bestimmt werden.

(b) Es sollten Veränderungen in der Proliferations- und Apoptoserate sowie in den Promotoraktivitäten bei Wachstumsfaktorentzug untersucht werden.

(c) Es sollte die Wirkung transgener p53-Expression auf den Zellzyklus in Tumor- und Normalzellen beobachtet werden. Hierbei wurde ein episomales System gewählt, so daß die Plasmide im Beobachtungszeitraum tatsächlich in den transfizierten Zellen verblieben. p53 war als "therapeutisches" Gen gewählt worden, da es zum einen in der Mehrzahl der Tumoren funktional inaktiv ist und zum anderen seine apoptotische Wirkung auf Tumorzellen durch starke virale Promotoren - allerdings nicht tumorspezifisch - bereits gezeigt wurde (Makri, 1997).

(2) "Methylierungs-Ansatz"

In einem zweiten Ansatz sollte zunächst der humane L1.2.B Promotor durch Deletionsanalyse und nachfolgender Aktivitätsbestimmung im Luziferasereportersystem charakterisiert werden. Um diesen Promotor in tumorspezifischer Weise nutzen zu können, sollte der Unterschied zwischen der (methylierungsabhängigen) Expression in Tumorzelllinien und normalen Zellen weiter untersucht werden. Im weiteren Verlauf wurde darum getestet, ob dieser Promotor im Vergleich von Tumor- und Normalzellen

(a) eine unterschiedliche Aktivität zeigt,

(b) eine Aktivitätsdifferenz in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus besteht,

(c) die Aktivität auf ganz bestimmte Regionen des Promotors beschränkt ist,

und schließlich wurde die Frage angegangen, ob

(d) in vitro methylierte Promotorsequenzen in Tumorzellen aktiv demethyliert werden können und damit ein Apoptose-vermittelndes Gen -wie p53- aktiviert werden könnte.

- Mutationsanalyse

Dem oben beschriebenen Hauptteil der Arbeit war eine Mutationsanalyse des p53-Gens in einer Anzahl von Harnblasentumorproben der Urologischen Klinik der Heinrich- Heine- Universität (HHU) vorausgegangen.

Da in einer Vielzahl von Publikationen die häufig auftretenden Punktmutationen in p53 in Tumoren im allgemeinen bzw. in Harnblasenkarzinomen (Übersicht in: Hollstein, 1998; vollständige Datenbank unter www.iarc.fr/P53/index.html) beschrieben werden und es sich bei der Inaktivierung von p53 offensichtlich um einen ganz wesentlichen Schritt in der Tumorprogression handelt, sollte zunächst durch Immunhistochemie, SSCP-Analyse und anschließender Sequenzierung ein Überblick über die Häufigkeit und Verteilung der Veränderungen im p53-Gen in der hiesigen Patientenpopulation gewonnen und somit ein Vergleich mit den aus der Literatur bekannten Daten möglich werden.

2. Material

2.1 Klinisches Material: Gewebe, Blut, in Paraffin eingebettetes Gewebe

Gewebe für die Isolierung von DNA stand vornehmlich aus Cystektomien, seltener aus TUR-Präparaten (Transurethale Resektion) von Patienten der Urologischen Klinik zur Verfügung. Alle Gewebe wurden unmittelbar nach Begutachtung durch einen Pathologen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. DNA aus Blutproben wurde aus EDTA-Blut gewonnen. Das zur Immunhistochemie verwendete, in Paraffin eingebettete Gewebe stammte aus der routinemäßigen Paraffineinbettung der Pathologie und war somit durch Pathologen begutachtet und histologisch klassifiziert (UICC-Vereinbarung, 1997). Harnleiter zur Kultivierung von normalen uroepithelialen Zellen wurden aus Nephrektomie-Operationen der Urologischen Klinik zur Verfügung gestellt.

Die Einwilligung aller Patienten wurde mittels eines Formblattes routinemäßig eingeholt, und die Ethikkommission der HHU hat über die entsprechenden Projekte positiv entschieden.

2.2 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech, Ebersberg, bezogen. Position, Länge und optimale Amplifikationsbedingungen der Oligonukleotide wurden unter Verwendung des Programms Oligo 4.1, Primer Analysis Software, National Biosciences, Inc., bestimmt. Alle in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide werden in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Oligonukleotide

Bezeichnung	Gen	Sequenz (5'-3') +Modifikation	Länge	Tm
PU4	p53 Exon 4	CACCCATCTACAGTCCCC CTTGC (5'IRD800)	23	64°C
PD4	p53 Exon 4	ATGGAAGCCAGCCCCTCA GGGCA (5'IRD800)	23	64°C
ex4in-up	p53 Exon 4	TGCTCTTTTCACCCATCT AC	20	55,3°C
ex4in-down	p53 Exon 4	ATACGGCCAGGCATTGA AGT	20	57,3°C
PU5	p53 Exon 5	CTCTTCCTACAGTACTCC CCTGC (5'IRD800)	23	64°C
PD5	p53 Exon 5	GCCCCAGCTGCTCACCAT CGCTA (5'IRD800)	23	64°C
ex5LA-up	p53 Exon 5	TGTTCACTTGTGCCCTGA CT	20	57,3°C
ex5RA-down	p53 Exon 5	AGCAATCAGTGAGGAAT CAG	20	55,3°C

ex5LI-up	p53 Exon 5	TTCAACTCTGTCTCCTTCC T	20	55,3°C
ex5RI-down	p53 Exon 5	CAGCCCTGTCGTCTCTCC AG	20	63,5°C
PU6	p53 Exon 6	GATTGATCTTAGGTCTGG CCCCTC (5'IRD800)	24	64°C
PD6	p53 Exon 6	GGCCACTGACAACCACCC TTAACC (5'IRD800)	24	64°C
ex6aus-up	p53 Exon 6	TGGTTGCCAGGGTCCCC AG	20	65,5°C
ex6aus-down	p53 Exon 6	ACCGGAGGGCCACTGAC AACCA	22	65,8°C
ex6in-up	p53 Exon 6	GCCTCTGATTCCTCACTG AT	20	57,3°C
ex6in-down	p53 Exon 6	TTAACCCCTCCTCCCAGA GA	20	59,4°C
PU7	p53 Exon 7	GTGTTGTCTCCTAGGTTG GCTCTG (5'IRD800)	24	64°C
PD7	p53 Exon 7	CAAGTGGCTCCTGACCTG GAGTC (5'IRD800)	23	64°C
ex7aus-up	p53 Exon 7	CTTGCCACAGGTCTCCCC AA	20	61,4°C
ex7aus-down	p53 Exon 7	AGGGGTCAGCGGCAAGC A	18	60,5°C
ex7in-up	p53 Exon 7	AGGCGCACTGGCCTCATC TT	20	61,4°C
ex7in-down	p53 Exon 7	TGTGCAGGGTGGCAAGT GGC	20	63,5°C
PU8	p53 Exon 8	ACCTGATTCCTTACTGC CTCTGGC (5'IRD800)	25	64°C
PD8	p53 Exon 8	GTCCTGCTTGCTTACCTC GCTTAGT (5'IRD800)	25	64°C
ex8aus-up	p53 Exon 8	TTGGGAGTAGATGGAGC CT	19	56,7°C
ex8aus-down	p53 Exon 8	AGTGTTAGACTGGAAACT TT	20	57°C
ex8in-up	p53 Exon 8	TTCCTTACTGCCTCTTGCT T	20	55,3°C
ex8in-down	p53 Exon 8	AGGCATAACTGCACCCTT GG	20	59,4°C
p53cDNAup	p53 cDNA-Primer	CAGATAGCGATGGTCTGG CC	20	61,4°C
p53cDNAdown	p53 cDNA Primer	TGGGCAGTGCTCGCTTAG TG	20	61,4°C
inEx4up	p53 (in Exon4)	GATGATTTGATGCTGTCC CCG	21	59,8°C
inEx4down	p53 (in Exon4)	ACTTGGCTGTCCCAGAAT GCA	21	59,8°C
p53cDNA-up	p53-cDNA (Plasmid)	CAGATAGCGATGGTCTGG CC	20	61,4°C

p53cDNA-down	p53-cDNA (Plasmid)	TGGGCAGTGTCTCGCTTAG TG	20	61,4°C
inEx4-up	Exon4 p53	GATGATTTGATGCTGTCC CCG	21	59,8°C
inEx4-down	Exon4 p53	ACTTGGCTGTCCCAGAAT GCA	21	59,8°C
p53cDNA-AS	p53cDNA- Sequenzierprimer	CCTCTGTGCGCCGGTCTC (5'IRD800)	18	-
p53cDNA-S	p53cDNA- Sequenzierprimer	AGATAGCGATGGTCTGGC C (5'IRD800)	19	-
T3	universal-Primer	ATTAACCTCACTAAAGG GAAC (5'IRD800)	22	56,5°C
T7	universal-Primer	TAATACGACTCACTATAG G (5'IRD800)	19	50,2°C
5'Xba1	LINE-Primer mit 5'Xba1-Überhang	AGTTCTAGATGGTACCGA GCTCTTACG	27	58°C
5'NheI	LINE-Primer mit 5'NheI-Überhang	CTAGCCCATTCACCAGTT CTC	21	58°C
L1.2-BamHI	LINE-Primer mit 5'BamHI-Überhang	CGCGGATCCGTGGGCGTA GG	21	58°C
LINE 5'up	LINE-Primer 5'flankierend	CTTACGCGTGCTAGCCCA TTC	21	58°C
L1.2- 5'up	LINE-Primer 5'flankierend	CTAGCTAGCTAGTGGTGA AAGTGGGC	26	58°C
L1.2- 5'Seq	LINE-Primer 5'flankierend, zur Seq.	ATACGCTCTCCATCAAAA C (5'IRD 800)	19	-
LINE 3'down	LINE-Primer 3'flankierend	TGCCAAGCTTACTTAGAT CGCA	22	58°C
L1.2-3'Seq	LINE-Primer 5'flankierend, zur Seq	TATGTTTTTGGCGTCTTCC (5'IRD 800)	19	-
SRY mut up	LINE (Mutagenese)	GAGAATTCTCTCCTAAGC AAGCCTGGG	27	56°C
SRY mut down	LINE (Mutagenese)	GAGAATTCTCGCCGGGA AGCTCGAACT	27	58°C
HpaII-1	LINE (Mutagenese)	TAGGAACAGCTCTAGTCT ACAGCTC 5'-Phosphat	25	-
HpaII-2	LINE (Mutagenese)	CATCTGAGGTACTAGGTT CATCTCAC 5'-Phosphat	26	-
HpaII-3	LINE (Mutagenese)	CGCTTTTCAGACTAGCTT AAGAAACG 5'-Phosphat	26	-
HpaII-4	LINE (Mutagenese)	AAACAAAGCAGCTAGGA AGCTCGAAC 5'-Phosphat	26	-
pKSneu5'	-	GGAACGCGTGCTAGCAG GCCTGTGACAGAGCT	33	>75°C
pKSneu3'	-	CTGTCGACAGGCCTGCTA GCACGCGTTCCGC	31	>75°C

2.3 Etablierte Zelllinien

Die Harnblasenkarzinomzelllinien VMCub1, VMCub2, 5637, HT1376, SW1710 und SD stammten ursprünglich von Dr. J. Fogh, Sloan-Kettering Institute, Rye, NY, USA. Ihre Identität wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) überprüft. Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Kontaminationen durch Mykoplasmen hin getestet. Die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP (Horoszewics et al, 1981) und die Nierenzellkarzinomzelllinie SKRC47 wurden von Prof. Schmitz-Dräger, Urologische Klinik HHU, zur Verfügung gestellt. Die Maustatokarzinomzelllinie F9 stammte ursprünglich von Prof. Kemler, MPI für Immunologie, Freiburg.

2.4 E.coli-Stämme

Für die Plasmidpräparation aller Luziferase-Konstrukte wurden die E.coli-Stämme JM109 (Invitrogen) und XL-1blue (Stratagene) eingesetzt. Die von pRSV abgeleiteten episomalen Konstrukte wurden in einen TOP10F'-Stamm (Invitrogen) transformiert und kultiviert. Dauerkulturen wurden aus 425 µl Übernachtskulturen der Bakterienklone und 75 µl 99%-igem Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

Alle Experimente mit veränderten Organismen wurden unter Beachtung der Vorschriften des Gentechnikgesetzes vom 16.12.1993 (BGBI.1, S. 2066), sowie der Gentechnik-Sicherheitsverordnung vom 14.03.1995 (BGBI.1, S.297) durchgeführt.

2.5 Plasmide

Folgende Plasmide wurden kloniert, zur Verfügung gestellt oder käuflich erworben:

(A) käuflich erworben oder zur Verfügung gestellt:

1. -3565/+263 (cycE max luc): (Botz, 1996) enthält den Maus-cyclinE Promotor, der die Expression des Leuchtkäfer-Luziferasegens kontrolliert, P. Jansen-Dürr, Innsbruck, Österreich
2. -94/+263 (cycE min luc) (Botz, 1996) enthält das Fragment -94/+263 des Maus-cyclinE Promotors, der die Expression des Leuchtkäfer-Luziferasegens kontrolliert, P. Jansen-Dürr, Innsbruck, Österreich
3. CMV273H: enthält p53-cDNA mit einer 273 Arg>His Mutation (Stürzbecher, Lübeck)
4. CMVhup53: enthält humanes Wildtyp p53 (Stürzbecher, Lübeck; Sequenz publiziert in Wagner, 1991)

5. CMVluc: enthält den viralen CMV-Promotor, kloniert in den Luciferase-Vektor pxp1 (SmaI/HindIII); Schulz, 1993
6. c-mycP2luc: (Mautner, 1995) enthält den vollständigen c-myc P2-Promotor, der die Expression des Leuchtkäfer Luziferasegen kontrolliert; A. Polack, München
7. pEGFP C1: Clontech, Palo Alto, CA, USA
8. pE2Fluc: (Magnaghi-Jaulin, 1998) enthält einen artifiziellen Promotor mit 3 E2F-Bindungsstellen, der das Leuchtkäfer-Luziferasegen kontrolliert; A. Harel-Bellan, Villejuif, Frankreich
9. pGl3: Promega Europe
10. pKS+: pBluescript II KS (+), Promega
11. pRbluc: enthält ein 1.8 kb-Fragment des humanen Rb-Gen-Promotors (Greeger, 1989), das in pGl3 kloniert wurde
12. pT109luc: (Nordeen, 1988) S.K. Nordeen, Denver, USA
13. RSV (Rep7): Invitrogen, Groningen, Niederlande
14. TKRL: Promega Europe

(B) im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert:

15. pKS_n: enthält die komplementären Oligonukleotide "pKS_{neu}5'" und " pKS_{neu}3'", kloniert in die SacII/SacI-Schnittstellen von pKS+
16. -193/+661luc (=LINE): enthält das Fragment -193/+661 bp des humanen L1.2B Promotors (L1.2B erhalten von: H.H. Kazazian, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA), dieses wurde SmaI/BglII(BamH1) in pGl3 kloniert.
17. -193/+373luc: enthält das Fragment -193/+373 bp des humanen L1.2B Promotors, mittels PCR in die SmaI/BglII-Schnittstellen von pGl3 kloniert.
18. +1/+373luc: enthält das Fragment 0/+373 bp des humanen L1.2B Promotors, mittels PCR in die NheI/BglII-Schnittstellen von pGl3kloniert.
19. +1/+661luc: enthält das Fragment 0/+661 bp des humanen L1.2B Promotors, mittels PCR in die NheI/BglII-Schnittstellen von pGl3 kloniert.
20. LINE SRY del: im Konstrukt -193/+661 bp wurde die SRY-Bindungsstelle (471-477) AAACAAA mutiert zu GGAATTC (EcoRI-Schnittstelle).
21. LINE-HpaII-1: ausgehend vom Konstrukt -163/+661luc wurde die erste HpaII-Restriktionsschnittstelle (+37-+40) von CCGG zu CATG mutiert.
22. LINE-HpaII-2: ausgehend vom Konstrukt -163/+661luc wurde die zweite HpaII-Restriktionsschnittstelle (+101-+104) von CCGG zu CATG mutiert.

23. LINE-HpaII-3: ausgehend vom Konstrukt -163/+661luc wurde die dritte HpaII-Restriktionsschnittstelle (+305-+308) von CCGG zu CATG mutiert.
24. LINE-HpaII-4: ausgehend vom Konstrukt -163/+661luc wurde die vierte HpaII-Restriktionsschnittstelle (+482-+485) von CCGG zu CATG mutiert.
25. RSV-p53 (Rep7 p53): p53 cDNA aus CMVhup53 wurde HindIII/BamHI in Rep7 kloniert.
26. RSV-p53 mut: enthält den RSV-Promotor und mutierte p53 cDNA aus CMV273H (273 Arg>His Mutation) und wurde HindIII-BamHI in Rep7 kloniert.
27. E2F Rep7: enthält den Promotor aus pE2Fluc, kloniert in die XbaI/HindIII-Schnittstellen von Rep7, wobei der RSV Promotor ersetzt wurde.
28. E2F-Pst1: E2F-Pst1-Fragment wurde in pKSn in 3'5'-Orientierung Pst1-zwischenkloniert.
29. E2F-p53 (E2F p53 Rep7): enthält den artifiziellen E2F Promotor und p53 cDNA wurde mit Xba1-HindIII/HindIII-BamHI in Rep7 kloniert.
30. -193/+661 Rep7 (LINE Rep7): enthält das Fragment -193/+661 bp des humanen L1.2B Promotors, in die XbaI/HindIII-Schnittstellen von Rep7 kloniert, wobei der RSV Promotor ersetzt wurde.
31. -193/+661-p53 (LINE p53 Rep7): enthält p53cDNA, HindIII-BamHI in -193/+661 Rep 7 kloniert.
32. -193/+661-p53 mut: enthält mutierte p53 cDNA aus CMV273H (273 Arg>His Mutation), HindIII/BamHI in -193/+661 Rep7 kloniert.

Alle mittels PCR klonierten Plasmide wurden durch direkte Sequenzierung überprüft.

2.6 Kulturmedien

Die Harnblasenkarzinomzelllinien VMCub1, VMCub2, HT1376, 5637, SW1710 und SD wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies) mit 15% bzw. 0.5% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (Life Technologies) und 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat und 100 U/ml Penicillin kultiviert. Die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP wurden in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat sowie 100 U/ml Penicillin auf Gelatine-beschichteten Gefäßen kultiviert. Die Zelllinie F9 wurde in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat sowie 100 U/ml Penicillin kultiviert. Die

Nierenzellkarzinomzelllinie SKRC47 wurde in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, nicht-essentielle Aminosäuren und 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat sowie 100 U/ml Penicillin kultiviert. Das Kälberserum wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Normale humane Uroepithelialzellen wurden in KSFM (Keratinocyten Serum Freies Medium) unter Zusatz von 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat, 100 U/ml Penicillin, 4 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor), 30 ng/ml Choleratoxin und einem Aliquot BPE/500 ml Medium (Supplementbeifügung zu KFSM-Medium, Gibco 17005) kultiviert.

2.7 Antikörper, Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmittel

Antikörper und Seren:

- | | |
|--|--|
| • anti- α -Tubulin 3-5-1-2 | Sigma Aldrich Chemie GmbH,
Deisenhofen |
| • anti-mouse IgG (H+L) biotinyliert | Vector Lab. Inc., USA, über:
Camon, Wiesbaden |
| • anti-FAS CH11 IgM mouse | Immunotech, Hialeah, USA |
| • E2F-1 KH95 sc-251 | Santa Cruz |
| • FITC-konjugierter Mouse Anti.human p53, DO-7 | PharMingen, San Diego, USA |
| • FITC konjugierter IgG _{2b} Isotypen Kontrolle, 27-35) | PharMingen, San Diego, USA |
| • HRP-conjugated anti-mouse antibody ECL-Kit | Amersham-Pharmacia, Freiburg |
| • Normal Horse Serum | Vector Lab. Inc. |
| • p21 WAF1 Ab-1 | Oncogene Science, Cambridge,
USA |
| • p27 F-8, sc-1641 | Santa Cruz |
| • p53 Ab-2 | Oncogene Science |
| • p53 Ab-6 | Oncogene Science |
| • Rb C-15, sc-50 | Santa Cruz |
| • Rb IF-8, sc-102 | Santa Cruz |

Enzyme, soweit nicht in Kits enthalten:

- | | |
|--|--|
| • DyNAzyme TM II DNA Polymerase ("Taq") | Finnzyme OY, Espoo, Finnland |
| • DNA Polymerase I large fragment (Klenow-Enzym) | Roche |
| • Restriktionsendonukleasen | Roche, New England Biolabs,
Frankfurt a. Main und MBI,
Fermentas, St. Leon Rot |
| • RNaseA (für FACS Analyse) | Roche |

• T4-DNA Ligase	Roche
<u>Kits:</u>	
• ABC Kit (Peroxidase Standard)	Vector Lab. Inc.
• Annexin-V-Biotin Assay	Roche
• Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Roche
• Dual Luciferase Reporter Assay	Promega
• ECL Western blotting System (RPN2108)	Amersham Pharmacia
• Gene Editor TM in vitro site directed mutagenesis system	Promega
• In situ cell proliferation ELISA	Roche
• Proteinassay DC	BioRad, Hercules, USA
• QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
• Qiagen Genomic DNA Kit	Qiagen GmbH
• Qiafilter Plasmid Midi- und Maxi-Kit	Qiagen GmbH
• QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH
• QIAspin Mini Kit	Qiagen GmbH
• SequiTherm EXCEL TM II DNA Sequencing Kit	Epicentre Technologies, über Biozym
• TaKaRa DEXPAT TM	TaKaRa, Japan, über Boehringer Ingelheim, Heidelberg
• Thermo Sequenase, DYEnamic Direct cycle sequencing kit	Amersham-Pharmacia
<u>Transfektionsreagenzien:</u>	
• Dosper	Roche
• Dotap Liposomal Transfection Reagent	Roche
• FuGene	Roche
• SuperFect	Qiagen GmbH
<u>Chemikalien</u>	
• AccuGel 29:1, 40% (SSCP)	National Diagnostics, USA, über Biozym, Hameln
• Acrylamid 37,5:1, 30% (Westernblot)	AppliChem, Darmstadt
• Agar	Difco Labs, Detroit, USA
• Agarose	Biozym

• Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie
• Aprotinin	Sigma Aldrich Chemie
• APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma Aldrich Chemie
• BSA (Bovine Serum Albumin)	Serva, Heidelberg
• Camptothecin	Sigma
• Chloroform	Roth, Karlsruhe
• Cholera toxin	Sigma Aldrich Chemie
• DAB (Diaminobenzidine)	Sigma Aldrich Chemie
• DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich Chemie
• DNA-Längenstandards	PeqLab, Erlangen
• dNTPs (Desoxyribonucleosidtriphosphat)	PeqLab, Erlangen
• ECL-Filme	Amersham-Pharmacia
• fötales Kälberserum	Seromed Biochrom, Deisenhofen
• Giemsa	Merck, Darmstadt
• Glycerol	Merck
• Hämalaun Färbelösung nach Mayer	Merck
• Harnstoff	Sigma Aldrich Chemie
• HBSS Medium	Life Technologies, Karlsruhe
• Hefeextrakt	Difco Labs
• Hepes	Sigma
• Hygromycin B	Roche
• Hyperfilm (ECL)	Amersham-Pharmacia
• Immobilon TM -P	Millipore, Bedford, USA
• IPTG	Roche
• Kanamycin	Sigma Aldrich Chemie
• Keratinocyte-SFM mit Supplementen	Life Technologies
• Kollagen IV	Sigma
• Kollagenase	Sigma
• Kulturmedien (Zellkultur)	Gibco BRL
• Längenstandard (Protein Ladder)	Gibco BRL
• Loading dye fluorescent sample (zur Sequenzierung)	Amersham-Pharmacia
• Magermilchpulver	neufom, Lüneburg
• Mineralöl	Sigma Aldrich Chemie

• Mitomycin	Sigma Aldrich Chemie
• Nonidet P-40	Sigma
• Paraformaldehyd-Puffer	PharMingen
• PBS	Biochrom KG, Berlin
• Penicillin/Streptomycin	Biochrom KG
• PMSF	Serva
• Polyester-Folie (SSCP), GelBond PAG	Biozym
• Saponin	Sigma Aldrich Chemie
• SequaGel ultra pure (Sequenzierung)	National Diagnostics, USA über Biozym
• SDS (Natriumdodecylsulphat)	Sigma Aldrich Chemie
• Temed	Sigma Aldrich Chemie
• Triton-X 100	Merck, Darmstadt
• Trypsin	Seromed Biochrom
• Trypsininhibitor	Sigma
• Trypton	Difco Labs
• Tween 20	Serva
• Versene	Seromed Biochrom
• Whatman Chromatographiepapier	Whatman, Maidstone, UK
• X-Gal	Roche
• Zellkulturmedien	Gibco BRL, Eggenstein

Alle weiteren Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von Merck (Darmstadt) oder Sigma Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen.

Verbrauchsmaterial:

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von Greiner (Frickenhäusen), Falcon/Becton Dickinson (Meylen Cedex, Frankreich) und Nunc (Roskilde, Dänemark) bezogen.

2.8 Lösungen und Puffer:

10x PCR-Puffer (Taq-Polymerase-Puffer):

20 mM	Tris-HCl
16 mM	Ammoniumsulfat
1 mM	Magnesiumchlorid
pH 8,55	

6x Ladepuffer für Agarosegele:

30%	Glyzerin
0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylencyanol FF in H ₂ O
0,2%	EDTA
pH 8,0	

Blotpuffer (Western):

0,025 M	Tris
0,15 M	Glyzin
10%	Methanol
pH 8,3	

Coomassie-Lösung:

0,1%	Coomassie
25%	Isopropanol
10%	Essigsäure

Entfärber für Westerngele

10%	Essigsäure
12%	Isopropanol

Ethidiumbromid (Stammlösung):

50 µg/ml	Ethidiumbromid
----------	----------------

FACS Puffer:

0,1%	BSA
4 mM	Natriumazid
in PBS	

FACS-Puffer-2:

1 g	Glukose
1 l	PBS ohne Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺
sterilfiltrieren: Filter mit 0,22 µm Porendurchmesser	

Fixierungslösung (für intrazelluläre Färbung)

4%	Paraformaldehyd
in PBS	

Gel-Fixierer für Polyacryamidgele:

10%	Ethanol
0,5%	Essigsäure

HBS (HEPES Buffered Saline):

20 mM	HEPES
150 mM	NaCl
pH 7,4	

Inkubationspuffer (FACS Analyse)

10 mM	Hepes/NaOH pH 7,4
140 mM	NaCl
5 mM	CaCl ₂

Lämmli-Puffer:

120 mM	Tris, pH 6,8
10%	SDS
10%	Glyzerol
25%	β-Mercaptoethanol
0,01%	Bromphenolblau

Ladepuffer für Polyacrylamidgele:

95%	Formamid
20 mM	EDTA
0,05%	Bromphenolblau
0,05%	Xylen-Cyanol

Laufpuffer für Westerngele (5x; 1l):

15,14 g	Glyzin
30,285 g	Tris
25 ml	SDS (20%ige Lösung)

LB-Medium (1l):

10 g	Bacto-tryptone
5 g	Bacto-yeast extract
5 g	NaCl
pH 7,5	

PBS:

137,0 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,2	

PBSA-Lösung:

2,0% Bovines Serum Albumin
in PBS, Lagerung bei -20°C

Permeabilisierungspuffer

0,1% Saponin
in FACS Puffer

PFA (Paraformaldehyd) Puffer:

4% Paraformaldehyd
in PBS

Propidiumiodid Färbelösung

0,5 ml Propidiumiodid Vorratslösung
1000 U Kunitz RNase A (Roche)
10 ml FACS Puffer-2

Propidiumiodid Vorratslösung:

1 mg/ml Propidiumiodid in H₂O

Puffer für die Zellyse:

1% Nonidet P-40
1% Natriumdodecylsulfat (SDS)
0,5% Na-Desoxycholat
100 µg/ml Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid

Saponin-Puffer:

0,1% Saponin
in FACS-Puffer

Sequenziergel:

11,2 ml 25% Sequa Gel ultra pure (Acrylamid)
20,3 ml 8 M Harnstoff
3,5 ml 10xTBE
204 µl 10% APS
24 µl Temed

Silbernitratlösung zur Detektion von DNA in Polyacrylamidgelen

1 g AgNO₃
ad 1 l A.dest lösen (in dunkler Flasche aufbewahrt)

SOC Medium:

2,0 g	Bacto-trypton
0,5 g	Bacto-Hefeextrakt
1,0 ml	1 M NaCl
autoklaviert, vor Gebrauch zugesetzt:	
0,25 ml	1 M KCl
1 ml	2 M Mg ²⁺ Vorrat (1 M MgCl ₂ *6 H ₂ O, 1 M MgSO ₄ *7 H ₂ O)
1 ml	2 M Glukose
pH 7,5	

SSCP-Ladepuffer:

95%	Formamid
20 mM	EDTA
0,05%	Bromphenolblau
0,05%	Xylencyanol

SSCP-Polyacrylamidgel:

10%	Acrylamid
2 M	Harnstoff
ad 30 ml	H ₂ O
150 µl	10% APS
15 µl	Temed

TAE:

40 mM	Tris-Acetat
1 mM	EDTA
pH 8,0	

TBE:

90 mM	Tris-Borat
1 mM	EDTA
pH 8,0	

TE-Puffer:

10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
1 mM	EDTA
pH 8,0	

Acrylamidegel für Westernblotting:

(a) Trenngel (Ansatz für 2 Gele à 6,2 cm x 8,7 cm)

5,9 ml	H ₂ O
5,0 ml	Acrylamid
3,8 ml	1,5 M Tris, pH 8,8
150 µl	10% SDS
150 µl	10% APS
6 µl	Temed

(b) Sammelgel (Ansatz für 2 Gele à 6,2 cm x 8,7 cm)

0,75 g	Saccharose
3,2 ml	H ₂ O
0,833 ml	Acrylamid
0,333 ml	1 M Tris, pH 6,8
50 µl	10% SDS
33 µl	10% APS
3,3 µl	Temed

Zitratpuffer (Immunhistochemie)

1,8%	0,1 M Zitronensäure
8,2%	0,1 M Natriumcitrat
pH 6,0	

2.9 Spezielle Geräte

Easy Reader EAR 400 AT	SLT Labinstrumente, Österreich
FACS Analyser:	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikroskop: - Lichtmikroskop DIALUX 22EB	Leitz, Wetzlar
- Photomikroskop II	(Phasenkontrast und Fluoreszenz) Zeiss, Jena
LICOR-Sequencer 4200	LICOR Inc., USA, in Deutschland über: MWG Biotech GmbH, Ebersberg
MiniLumat LB 9506	Berthold, Wildbad
PCR-Geräte: T3 ThermoCycler	Biometra
Trio Thermoblock	Biometra
Spektralphotometer, Uvikon	Kontron, Neufahrn

2.10 Software und Computerressourcen

- Statistik:

Sämtliche statistischen Rechnungen wurden unter Verwendung von SAS, 6.12, Landeslizenz NRW und SPSS, 10.0, Landeslizenz NRW durchgeführt. Betriebssystem: WindowsNT

- Datenbanken:

PubMed, Nucleotide, Protein, OMIM [www.ncbi.nlm.nih.gov]; Blast (Blast 2.1, PSI-Blast) [www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST]; Datenbanken der GBF, Braunschweig: TRANSFAC, Transcription Factor Classification, TRANSPATH, [transfac.gbf.de]; TFSEARCH [pdap1.trc.rwcp.or.jp/research/db/TFSEARCH.html]; ATCC [www.atcc.org]; p53 Databases [perso.curie.fr]; IARC TP53 Mutation Databases [www.iarc.fr/p53/index.html]

- weitere Programme:

Oligodesign: Oligo 4.1, Primer Analysis Software, National Biosciences, Inc., 1992

Restriktionskartierungen: Clone, Scientific & Educational Software, 4.0, SerialNo. 35014, 1995

3. Methoden

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Immunhistochemie zum Nachweis von p53

Je 10 µm dicke Schnitte paraffineingebettetes Tumorgewebe wurden 12 min in Xylol entparaffiniert und dann kurz in 99% Ethanol gespült. Nach 30 Minuten Inkubation in 1% H₂O₂/Methanol bei 4°C wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert. Für eine bessere Antigendarstellung wurden die Schnitte in 0,1 M Zitratpuffer (pH 6,0) für 10 Minuten in der Mikrowelle vorbehandelt. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Schnitte wurden langsam auf 37°C abgekühlt und, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden, in einer Lösung aus Normal Horse Serum (1:1000 in PBSA) inkubiert (60min). Nach zweimaligem Waschen mit PBS für jeweils 2 Minuten wurde der primäre Antikörper (p53 Ab-6; 1:1000 in PBSA) über Nacht auf die Schnitte gegeben. Überschüssiger Erstantikörper wurde durch erneutes zweimaliges Waschen mit PBS abgespült. Anschließend wurde der zweite Antikörper (anti-mouse IgG H+L, 1:1000 in PBSA) für eine Stunde auf die Schnitte pipettiert. Danach wurden die Präparate für eine Stunde in ca. 100 µl einer Mischung aus Lösung A und B des ABC-Peroxidase Systems (je 1:100 in PBSA) inkubiert. Die Schnitte wurden 8 Minuten mit einer 0,05%igen DAB-Lösung (0,05% DAB in 0,01% H₂O₂/PBS) gefärbt. Danach wurden die Schnitte mehrfach in Leitungswasser gespült. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte für 4 Sekunden in Hämalaun gegengefärbt und in Leitungswasser gewaschen. Die Präparate wurden dann mittels einer aufsteigender Alkoholreihe entwässert, für 2 Minuten in Xylol überführt und eingedeckelt. Für die Auswertung wurden in 5 Sichtfeldern (Vergrößerung: 250x) die Tumorzellen mit spezifischer p53-Färbung ausgezählt und in die Klassen 0%; <5%; 5-10%; 10-20%, >20% gefärbte Tumorzellen eingeteilt. Die Evaluierung wurde mindestens von 2 unabhängigen Personen (Prof. Dr. B. Schmitz-Dräger; Prof. Dr. W.A. Schulz; K.H. Franke) vorgenommen; bei Nichtübereinstimmung wurden die Schnitte erneut begutachtet. War keine Übereinstimmung aufgrund zu hoher Heterogenität zu erzielen, wurden die Proben erneut gefärbt. Als Kontrollen wurden bei jeder Färbung eine gesicherte Positivkontrolle sowie eine Negativkontrolle mitgeführt.

3.2 Polymerase Kettenreaktion - (PCR) Methoden

3.2.1 PCRs zur Mutationsanalyse von p53

Zur Amplifikation der Exone wurden folgende Bedingungen gewählt (die Angaben beziehen sich auf je eine Reaktion):

(1) Primerpaare: PU4/PD4; PU5/PD5; PU6/PD6; PU7/PD7; PU8/PD8 (vgl. Abb. 4.1)

1,3 µl	DMSO
0,5 µl	10 mM dNTP
5,5 µl	10x PCR-Puffer
0,3 µl	0,2% BSA
0,5 µl	je Primer [25 pmol/µl Stammlösung]
0,12 µl	Taq-Polymerase
100 ng	DNA

ad 25 µl aqua dest.

PCR-Bedingungen:

a. 94°C	3 min
b. 94°C	45 sec
c. 64°C	45 sec
d. 72°C	90 sec
e. 72°C	7 min

Schritte b.-d. wurden 35 mal wiederholt

(2) Primerpaare: ex4in-up/ex4in-down; ex6in-up/ex6in-down; ex5LA-U/ex5LA-D;
ex5LI-U/ex5RI-D

0,5 µl	DMSO
0,5 µl	10 mM dNTP
2,4 µl	10x PCR-Puffer
1,0 µl	je Primer [25 pmol/µl Stammlösung]
100 ng	DNA

ad 24 µl aqua dest.

in Schritt b. wurden zugesetzt

0,3 µl	0,2% BSA
0,1 µl	10x PCR-Puffer
0,25 µl	Taq-Polymerase

ad 1 µl aqua dest.

PCR-Bedingungen:

- a. 100°C 10 min
- b. 85°C 3 min
- c. 96°C 30 sec
- d. 60°C 1 min
- e. 78°C 30 sec
- f. 70°C 5 min

Schritte c.-e. wurden 30 mal wiederholt

(3) Primerpaare: ex8in-up/ex8in-down; ex8aus-up/ex8aus-down

- 0,5 µl DMSO
- 0,5 µl 10 mM dNTP
- 2,4 µl 10x PCR-Puffer
- 1,0 µl je Primer [25 pmol/µl Stammlösung]
- 100 ng DNA

ad 24 µl aqua dest.

in Schritt b. wurden zugesetzt

- 0,3 µl 0,2% BSA
- 0,1 µl 10x PCR-Puffer
- 0,25 µl Taq-Polymerase

ad 1 µl aqua dest.

PCR-Bedingungen:

- a. 100°C 10 min
- b. 85°C 3 min
- c. 96°C 30 sec
- d. 60°C 30 sec
- e. 78°C 30 sec
- f. 70°C 5 min

Schritte c.-e. wurden 30 mal wiederholt

(4) Primerpaare: ex6aus-up/ex6aus-down; ex7in-up/ex7in-down; ex7aus-up/ex7aus-down

- 1,25 µl DMSO
- 0,5 µl 10 mM dNTP
- 2,4 µl 10x PCR-Puffer
- 1,0 µl je Primer [25 pmol/µl Stammlösung]
- 100 ng DNA

ad 24 µl aqua dest.

in Schritt b. wurden zugesetzt

0,3 µl 0,2% BSA

0,1 µl 10xPuffer

0,25 µl Taq-Polymerase

ad 1 µl aqua dest.

PCR-Bedingungen:

a. 100°C 10 min

b. 85°C 3 min

c. 96°C 30 sec

d. 62°C 1 min

e. 78°C 30 sec

f. 70°C 5 min

Schritte c.-e. wurden 30 mal wiederholt

Tabelle 3.2 Überblick über Amplifikatgrößen und Verwendung der p53-PCR-Produkte:

Nummer	Primerpaar	Amplifikat- länge [bp]	Verwendung
1	PU4/PD4	304	Sequenzierung; Reamplifikation aus 6
2	PU5/PD5	165	Sequenzierung; Reamplifikation aus 11 oder 7
3	PU6/PD6	133	Sequenzierung; Reamplifikation aus 12
4	PU7/PD7	92	Sequenzierung; Reamplifikation aus 9 oder 13
5	PU8/PD8	153	Sequenzierung; Reamplifikation aus 14
6	ex4in-up/ex4in-down	313	SSCP
7	ex5LI-U/ex5LI-D	212	SSCP, Reamplifikation aus 11
8	ex6in-up/ex6in-down	184	SSCP, Reamplifikation aus 12
9	ex7in-up/ex7in-down	137	SSCP, Reamplifikation aus 13
10	ex8in-up/ex8in-down	191	SSCP; Reamplifikation aus 14
11	ex5LA-U/ex5LA-D	212	SSCP
12	ex6aus-up/ex6aus-down	184	SSCP
13	ex7aus-up/ex7aus-down	199	SSCP
14	ex8aus-up/ex8aus-down	355	1. Amplifikation (keine SSCP aufgrund der Länge)

Alle Reaktionen wurden durch elektrophoretische Trennung über ein 2%iges Agarosegel auf die Qualität der Amplifikation hin überprüft. Zur Durchführung der Sequenzierungen wurde 1 µl des Amplifikats direkt aus der PCR-Reaktion, ohne vorherige Aufreinigung, in die Cycle-Sequencing-Reaktion eingesetzt (vgl. 3.3.1). Für SSCP-Analysen wurden die PCR-Reaktionsansätze durch Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gereinigt.

3.2.2 Nachweis transfizierter p53-cDNA in Zellklonen

Zur Überprüfung, ob die mit p53-Expressionskonstrukten transfizierten Klone noch das eingeführte p53-Gen trugen, wurden folgende PCR-Reaktionen durchgeführt:

- (1) Durch Verwendung der Primer inEx4-up und inEx4-down, die innerhalb von Exon 4 liegen, wird mittels PCR zelluläre cDNA, die in dem Plasmid eingeführte cDNA und genomische p53 DNA amplifiziert.
- (2) Durch Verwendung der Primer ex7aus-up und ex7aus-down (3.2.1) wird nur zelluläre genomische p53-DNA amplifiziert, da diese Primer innerhalb des Introns binden.
- (3) Der Primer p53cDNA-up bindet an der Exongrenzen Exon 5/6. Zudem entspricht die Sequenz der p53cDNA-up-Primer der Basenfolge in dem Grenzbereich zwischen Exon 5 und Exon 6, wo in den verwendeten Expressionskonstrukten 9 Basenpaare in der Plasmid-p53-cDNA inseriert sind, so daß bei einer PCR nur p53-cDNA, aus dem eingeführten Plasmid amplifiziert werden kann.

Die Amplifikationsbedingungen für (1) und (3) wurden folgendermaßen gewählt:

1,0 µl	DMSO
0,25 µl	10 mM dNTP
2,5 µl	10x PCR-Puffer
0,2 µl	je Primer [25 pmol/µl]
0,25 µl	Taq-Polymerase
100 ng	DNA, bzw. 10 ng Plasmid-DNA

ad 25 µl aqua dest.

PCR Bedingungen:

- a. 96°C 5 min
- b. 96°C 1 min
- c. x°C 45 sec [x (inEx4-up/down): 60°C; x (p53cDNA-up/down): 61°C]
- d. 72°C 45 sec
- e. 72°C 5 min

Schritte b.-d. werden 35 mal durchgeführt

Als Kontrollen wurden (1) die Plasmide eingesetzt und (2) genomische DNA von untransfizierten Zellen als PCR-Template eingesetzt.

3.2.3 Durchführung von PCR-Amplifikationen für Klonierungen

PCRs für Klonierungen der entstehenden PCR-Produkte wurden unter den nachfolgenden Bedingungen durchgeführt (vgl. Absatz 3.4). In allen Reaktionen wurde 10 ng Matrizen-DNA

eingesetzt; die Fragmente wurden auf 1-2% igen Agarosegelen (in Abhängigkeit von der Fragmentgröße) elektrophoretisch getrennt und ihre Länge kontrolliert. Anschließend wurden sie aus dem Gel ausgeschnitten, unter Verwendung des Qiagen Gel Extraction Kits eluiert und in einem Gesamtvolumen von 40 µl TE aufgenommen. Gegebenenfalls wurden die Fragmente dann restriktionsverdaut oder mit Klenow-Enzym behandelt und nochmals über ein Agarosegel aufgereinigt.

PCR-Bedingung:

1,0 µl	DMSO
2,5 µl	10xPuffer (beigefügt zur Taq-Polymerase)
0,25 µl	dNTP (10 mM)
0,2 µl	je Primer [25 pmol/µl]
0,25 µl	Taq-Polymerase
10 ng	Plasmid

ad 25µl aqua dest.

- a. 96°C 5 min
- b. 96°C 1 min
- c. x°C 45 sec [x= Anlagerungstemperatur]
- d. 72°C 45 sec
- e. 72°C 5 min

Schritte b.-d wurden 35 mal wiederholt; die Anlagerungstemperatur ergibt sich als $[T_m-3]^{\circ}\text{C}$, wobei T_m in Tabelle 2.2 angegeben wurde. Der T_m bezeichnet die mittlere Schmelztemperatur, bei der 50% der Primer als Einzelstrang vorliegen.

3.3 Sequenzierungen

3.3.1 Cycle Sequencing

Nach Überprüfung der Qualität der Amplifikate auf einem Agarosegel, wurden PCR-Produkte je 1:20 in A.dest verdünnt. Für die Sequenzierung von Plasmiden wurde 1 µg DNA eingesetzt. 20 µl der Verdünnung wurden mit 2 µl markiertem Sequenzierprimer [1 pmol/µl], 0,5 µl SequiTherm EXCELTMII DNA Polymerase [5 U/µl] und 2 µl DMSO gemischt (=Lösung 1). Außerdem wurden je 2 µl Nukleotid-Mischlösung (enthält: 0,94 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, 3,1 µM des jeweiligen ddNTP, 250 mM Tris-HCl, pH 9,5, 12,4 mM MgCl₂, Thermostabile Pyrophosphatase und Thermo Sequenase DNA Polymerase; im Kit enthalten) in je einem Gefäß mit 6 µl der Lösung 1 vermischt und mit Mineralöl überschichtet. Es wurden folgende Bedingungen angewendet:

- für PCR-Produkte:

- a. 95°C 2 min
- b. 95°C 30 sec
- c. 60°C 30 sec

Schritt b. und c. wurde 30 mal wiederholt.

- für Plasmidsequenzierungen:

- a. 95°C 2 min
- b. 95°C 15 sec
- c. 60°C 30 sec
- d. 70°C 60 sec

Schritt b. bis d. wurde 30 mal durchgeführt.

Anschließend wurden 4 µl mit 2 µl Formamid-Ladepuffer vermischt und 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 96°C denaturiert.

3.3.2 Sequenzierung unter Verwendung des LICOR-Automaten

Zunächst wurde eine Acrylamid-Lösung angesetzt wie unter 2.8 beschrieben (Sequenziergele). Zwischen die gesäuberten Platten wurde das 0,2 mm dicke Sequenziergel gegossen und zunächst ein Vorkamm eingesetzt, um eine horizontale Gelkante zu erhalten. Nach 60 Minuten war die Polymerisation beendet. Das Gel wurde in 1x TBE-Laufpuffer in das Sequenziergerät eingesetzt, der Vorkamm entfernt und 15 Minuten bei 3000 V vorelektrophoresiert. Danach wurde der Haifischzahnkamm eingesetzt, die Taschen mit 1xTBE-Puffer gespült und 1-2 µl der denaturierten Probe je Geltasche aufgetragen. Danach wurden Fragmente für mindestens 10 Stunden (je nach Fragmentlänge) elektrophoretisch bei 3000 V aufgetrennt. Zur Auswertung der Sequenzen wurde die serienmäßige LICOR-Software des Sequenziergeräts verwendet.

3.4 Klonierungen

3.4.1 Klonierung von Fragmenten aus Restriktionsverdau

Vektor und Insert wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und dieser Ansatz auf einem Agarosegel überprüft. Wenn die 5'-überhängenden Enden noch aufgefüllt werden mußten, wurde 500 ng DNA mit 2,5 µl Puffer L (Roche), 5 µl dNTP (10 mM) und 1,5 U Klenow-Enzym in 25 µl Gesamtvolumen 16 h bei 37°C inkubiert und wiederum über ein

Agarosegel aufgereinigt. Wurden 5' und 3'-Enden mit demselben Restriktionsenzym geschnitten, so wurde der Vektor mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wurde die DNA in 18 µl aqua dest., 2 µl 10x alkalische Phosphatasepuffer (0,5 M Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,5) und 1-2 U alkalischer Phosphatase 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10minütige Inaktivierung bei 75°C.

Dann wurden die Fragmente phenolextrahiert (25:24:1 Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol), in 2,5 Volumen Ethanol (100%) präzipitiert, mit 70%-igem Ethanol gewaschen, die Proben getrocknet und in TE gelöst. Vektor und Insert wurden im molaren Verhältnis 1:5 in 17 µl Gesamtvolumen gemischt, 2 µl Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase zugefügt und bei 16°C über Nacht inkubiert. Bei Blunt-End-Ligationen wurde bei 10°C inkubiert.

3.4.2 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zunächst wurden die zu klonierenden Abschnitte amplifiziert wie unter 3.2.3 beschrieben, über ein Agarosegel gereinigt und in A.dest gelöst. PCR-Produkte mit überhängenden Restriktionsstellen, die durch die Primer eingeführt wurden, und der Vektor wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten, wiederum über ein Agarosegel aufgereinigt und im molaren Verhältnis 1:5 wie oben beschrieben ligiert.

3.4.3 Gezielte Mutagenese

Für die Mutation von spezifischen Basenpaaren im LINE-Promotor wurde das "Gene EditorTM in vitro site directed mutagenesis"-System (Promega) benutzt. Für die Mutation von HpaII-Schnittstellen wurden phosphorylierte Primer verwendet, die die Sequenzumgebung der verschiedenen HpaII-Schnittstellen umfaßten, aber statt der CCGG-Sequenz (HpaII) eine CATG-Sequenz enthielten (Oligonukleotide HpaII-1 bis -4) und so durch das Restriktionsenzym MaeI erkannt werden konnten. Die Mutagenese wurde nach Protokoll des Herstellers (Promega) durchgeführt und positive Klone durch Restriktionsverdau mit MaeI identifiziert.

3.5 Kultivierung von humanen Zellen

3.5.1 Kultivierung von Urothelkarzinom-Zelllinien

Die adhärent wachsenden Harnblasenkarzinomzelllinien VMCub1, VMCub2, HT1376, 5637, SW1710 und SD wurden in 75 cm² Kulturflaschen in 12 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (vgl. 2.6) bei 37°C mit 5% CO₂ -Partialdruck kultiviert. Sie wurden alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:8 bis 1:16 passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, in 3

ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) für 5 Minuten inkubiert und in 7 ml Medium aufgenommen. Zur langfristigen Aufbewahrung der Zellen wurde zu 1×10^6 Zellen FCS/DMSO (4,5 ml FCS, 0,5 ml DMSO) gegeben, die suspendierten Zellen auf 5 Probengefäße aufgeteilt und zunächst bei -20°C (20min), dann bei -80°C und danach in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37°C angetaut, in 6 ml kaltem Medium aufgenommen und in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät.

3.5.2 Kultivierung von Prostatakarzinom- und Nierenzellkarzinom-Zelllinien

Die Prostatakarzinomzelllinien und Nierenzellkarzinomzelllinien wurden in gleicher Weise wie die Harnblasenkarzinomzelllinien kultiviert. Die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP wurde wie unter 2.6 beschrieben in RPMI Medium und die Nierenzellkarzinomzelllinie SKRC47 in DMEM kultiviert.

3.5.3 Anlegen von humanen Uroepithel-Primärkulturen aus Ureter

Gewebe zur Isolierung normaler uroepithelialer Zellen wurden in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) Puffer unter Zusatz von 10 mM Hepes und 20 KIU/ml Aprotinin transportiert. Die Präparation und Kultivierung erfolgte nach Southgate et al (1994). Der Harnleiter wurde freipräpariert, der Länge nach aufgeschnitten und mit der Mukosa-Seite nach oben in einer Schale in PBS unter Zusatz von 0,1% EDTA und Aprotinin über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurde zunächst die PBS-Lösung abgesaugt und Kulturmedium (KFSM mit Zusätzen, vgl 2.6) zugegeben. Danach wurde die oberste Mukosa-Schicht mit einer sterilen Pinzette abgeschabt. Die Mukosastückchen in Medium wurden mit einer Glas-Pipette abgesaugt, durch Pipettieren weiter zerkleinert, gewaschen und in frischem Medium in einer mit Kollagen Typ IV beschichteten 75 cm² Kulturflasche ausgesät und die Flasche auf 12 ml Kulturmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Nach ca. 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Bei einem Konfluenzgrad von ca. 80% wurden die Zellen 1:3 passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Um Fibroblasten-Kontaminationen zu entfernen, wurde 2 ml Versen zugegeben und die Kulturflasche für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Dadurch wurden zunächst Fibroblasten abgelöst und durch Absaugen entfernt. Danach wurde 3 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) aufpipettiert und die Zellen für 3 Minuten wiederum bei 37°C inkubiert. Danach wurden 3 ml Trypsininhibitor (Stammlösung: 0,5 mg/ml Trypsininhibitor in PBS) sowie 6 ml Kulturmedium zugefügt. Die Zellsuspension wurde bei 4°C und 400 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde

dann in Kulturmedium aufgenommen und entsprechend der Versuchsanordnung in Kulturflaschen oder 6-Well-Platten (Greiner) ausgesät.

3.5.4 Giemsa-Färbung

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1:1 PBS/Methanol einmal und zweimal mit Methanol fixiert. Die Zellen wurden dann durch Zugabe von 2 ml Giemsa-Lösung/25 cm² 2 min gefärbt. Dann wurde das gleiche Volumen destilliertes Wasser hinzugefügt (2 Minuten). Danach wurde die Färbelösung abgegossen und die Schalen sehr gründlich unter fließendem Wasser gewaschen.

3.5.5 Fluoreszenzmikroskopie von GFP-transfizierten Zellen

Deckgläschen wurden in 5 cm-Platten gelegt und darauf Zellen ausgesät (3.5.1). Nach 24 Stunden wurden die Zellen transfiziert (3.7.1). Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und mit 3% Formaldehyd in PBS 20-30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie zweimal in PBS gewaschen. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen 9:1 Glycerin:Tris/HCl (1 M, pH 8,5) aufgebracht und das Deckgläschen mit den Zellen nach unten darauf überführt. Danach wurden die Präparate im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

3.5.6 Induktion von Apoptose durch CH-11-Antikörper, Mitomycin und Camptothecin

Die Zelllinie VMcub1 wurde in 6-Well-Platten ausgesät (10⁴ Zellen/Well). Nach 5 Stunden wurde zum Medium entweder 150 ng/ml CH-11-Antikörper (gelöst in Medium ohne Zusätze), 0,1 mM Mitomycin (in Medium ohne Zusätze) oder 4 µg/ml Camptothecin (in DMSO) zugefügt. Außerdem wurde eine DMSO-Kontrolle (die gleiche Menge DMSO wie bei Camptothecin-Zugabe) und eine weitere Negativkontrolle mit unbehandelten Zellen durchgeführt. Nach 12 Stunden wurden die Zellen mittels Annexin-V-Apoptose Test (vgl. 3.13.2) untersucht oder nach 24 h unter dem Mikroskop betrachtet.

3.6 Analytische Methoden an Zellen in Zellkultur

3.6.1 Bestimmung von Transfektionseffizienzen

Transfektionseffizienzen wurden bestimmt, indem 10⁴ Zellen/Well ausgesät wurden, nach 24 Stunden die Zellen mit pEGFP C1 transfiziert und dann durchflußzytometrisch der Anteil GFP-exprimierender Zellen bestimmt wurde. Dazu wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion in Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt (vgl. 3.12).

3.6.2 Bestimmung der Zellverdopplungszeiten

Die Harnblasenkarzinomzelllinien wurden in 6-Well-Platten ausgesät (10^4 Zellen/Well) und nach 24 h, 48 h, 72 h in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Verdopplungszeiten wurden aus den Mittelwerten unabhängiger Versuche mittels logarithmischer Regression bestimmt.

3.6.3 Proteinbestimmung

Für die Durchführung von Proteinbestimmungen wurden die zu untersuchenden Zellen in Puffer zur Zellyse (vgl. 2.8) lysiert. 20 μ l des Lysats wurden auf einer ELISA-Platte mit 10 μ l der im ProteinassayDC-Kit enthaltenen Lösung A (alkaline copper tartrate solution) und 80 μ l Lösung B (Folin Reagenz) vermischt. Nach 20 Minuten wurde die Extinktion bei 690 nm gemessen. Als Proteinstandard diente eine Albuminverdünnungsreihe; der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben wurde über die Standardreihe berechnet.

3.6.4 BrdU-Inkorporations-Test

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und nach 12 Stunden BrdU (5-Bromo-2'-Desoxyuridin) hinzugefügt, das statt Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Herstellerangaben (In situ Cell Proliferation ELISA, Roche). Dazu wurden die Zellen fixiert und im selben Schritt die DNA denaturiert, um sie für den nachfolgenden Antikörper-Schritt besser zugänglich zu machen. Dann wurde anti-BrdU-POD (ein monoklonaler BrdU-Antikörper, der Peroxidase (POD) -konjugiert ist) hinzugegeben. POD katalysiert in Anwesenheit von Hydrogenperoxid die Oxidation von Diazylhydrazid, so daß das Reaktionsprodukt lumineszenzphotometrisch messbar ist. Die Absorption wurde bei 405 nm/570 nm gemessen..

3.6.5 Apoptose-ELISA

Zur Durchführung des Apoptose-ELISA-Test wurden die Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät (10^4 Zellen/Well) und entsprechend der Versuchsanordnung behandelt (z.B. Serumentzug). Der Test wurde unter Verwendung des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden die adhärenenten Zellen lysiert und in eine mit Streptavidin beschichtete Multiterplatte pipettiert (10^4 Zellen pro Well). Eine Mischung von Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-Peroxidase wurde zugefügt und inkubiert. Der Anti-Histon-Antikörper (ein monoklonaler Maus-Antikörper, der gegen Histone (H2A, 2B, 3, 4) gerichtet ist) bindet an die Histon-Komponente des Nukleosoms und gleichzeitig den

Immunkomplex an die Streptavidin-beschichtete Platte über Biotinylierung. Zusätzlich reagiert der Anti-DNA-POD Antikörper mit der DNA-Komponente der Nukleosomen. Es folgte die quantitative Bestimmung der Nukleosomenmenge aufgrund der im Immunkomplex zurückgehaltenen POD (Peroxidase). Die Extinktion wurde bei 405/570 nm gemessen.

3.6.6 Luziferase-Messung

Die transfizierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und 500 µl/Well passiver Lyse-Puffer (Dual Luciferase Reporter Assay System) aufpipettiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt und 10 µl des Lysats mit 50 µl Luziferase Reagenz I gemischt. Nach 2 Minuten wurde das Gemisch im Luminometer zweimal gemessen. Dann wurden 50 µl Renilla Luziferase-Substrat zupipettiert und die Probe sofort zweimal gemessen.

3.7 Transfektionsversuch

3.7.1 Transiente Transfektionen

- FuGENE (6-Well-Platten): Zellen wurden auf einer 6-Well-Platte bis zu 40% Konfluenz kultiviert, dann mit PBS gewaschen und 2 ml neues Medium zupipettiert. Pro Well wurden 4 µl des Transfektionsreagenz mit 96 µl Medium ohne Zusätze vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 1 µg DNA zupipettiert und bei Raumtemperatur 12 Minuten inkubiert. Das Gemisch wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben. Für die Transfektion in anderen Platten wurden entsprechend veränderte Mengen Reagenzien verwendet.
- DOSPER Liposomal Transfection Reagent (6-Well-Platten): Pro Well wurde 1,5 µg DNA in 75 µl HBS (HEPES Buffered Saline) gelöst. Außerdem wurden 7,5 µl DOSPER in 75 µl HBS verdünnt. Die DNA-Lösung wurde zu dem Transfektionsreagenz gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Mischung tropfenweise auf gewaschene Zellen, auf die 1 ml Kulturmedium gegeben worden war, pipettiert und nach 6 h ein Mediumwechsel vorgenommen.
- DOTAP Liposomal Transfection Reagent (6-Well-Platten): Pro Well wurde 2,5 µg DNA in 25 µl HBS gelöst. Außerdem wurde 15 µl DOTAP in 25 µl HBS verdünnt. Die DNA-Lösung wurde der Transfektionsreagenzlösung zugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In 2 ml Medium wurde die Lösung auf die gewaschenen Zellen gegeben und das Medium nach 5 Stunden gewechselt.

- SuperFect (6-Well-Platten): Pro Well wurde 1 µg DNA in 36 µl Medium ohne Zusätze gegeben und 4,8 µl SuperFect hinzugefügt. Nach 5-10 Minuten wurde 600 µl Medium hinzugegeben und die Mischung für 3 h auf die gewaschenen Zellen pipettiert. Danach wurde die Mischung abgesaugt und 2 ml Medium mit Zusätzen auf die Zellen gegeben.

3.7.2 Selektion stabiler Klone

Stabile Klone wurden in Medium mit Hygromycin (VMCub1, VMCub2, 5637: 150 µg/ml; SD: 200 µg/ml) selektiert. Zum Klonieren wurden die Platten mit PBS gewaschen und um je einen Klon ein unten mit sterilem Silikon abgedichteter Metallring gelegt. Die Zellen wurden im Metallring trypsiniert, in Medium aufgenommen und in einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Klone wurden dann schrittweise erst in einem 25 cm² Gefäß, dann in einer 75 cm² Flasche expandiert.

3.8 Kultur von Bakterienzellen

3.8.1 Kultur von E.coli-Zellen

Sämtliche Bakterien wurden bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) in flüssigem LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums gezüchtet. Auf Agarplatten (mit entsprechendem Antibiotikum versetzt) wurden Dauerkulturen mittels 3-Ösenausstrich ausgestrichen, im 37°C-Brutschrank über Nacht inkubiert und Einzelklone in flüssiges LB-Medium mit Antibiotikum (Ampicillin: 50 µl/ml; Kanamycin: 25 µg/ml) überführt.

3.8.2 Transformation

Zur Transformation wurden kompetente Zellen mit ca. 50 ng DNA 30 Minuten auf Eis unter Zugabe von 1 µl Mercaptoethanol inkubiert. Dann wurden die Ansätze für 45 Sekunden in einem 42°C-Wasserbad hitzegeschockt und 2 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurde 1,5 ml SOC-Medium hinzupipettiert und die Ansätze 50 Minuten bei 160 rpm und 37°C geschüttelt. 100 µl des Ansatzes wurde auf geeigneten Agar/Antibiotikum-Platten ausgestrichen und über Nacht im 37°C-Brutschrank inkubiert.

3.9 Untersuchungen von Nukleinsäuren und Proteinen

3.9.1 DNA-Extraktion aus Blut, Gewebe, Zelllinien

- DNA-Extraktion aus EDTA-Blut: Aus je 4 ml EDTA-Blut wurde mittels Qiagen-Genomic DNA Kit DNA extrahiert.

- DNA-Extraktion aus Gewebe: Zunächst wurden die Gewebestücke in einem trockeneisgekühlten Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver homogenisiert. DNA wurde daraus unter Verwendung des Qiagen Blood & Cell Culture DNA-Kits isoliert.
- DNA-Extraktion aus Zelllinien: 10^4 - 10^6 Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert und in 200 µl PBS aufgenommen. Nach den Herstellerangaben zum QiaAmp-Kit wurde hieraus DNA isoliert.

Auf einem Agarosegel wurden alle DNA-Extraktionen auf Intaktheit überprüft.

3.9.2. DNA-Extraktion aus Polyacrylamidgelen, Paraffinschnitten und Agarosegelen

- DNA-Extraktion aus Polyacrylamidgelen: Definierte DNA-Banden wurden aus silbergefärbten Polyacrylamidgelen mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 100 µl A. dest. 60 Minuten aufgekocht. Die Mischung wurde dann zentrifugiert. 18 µl des Überstands wurden in eine PCR-Reaktion eingesetzt.
- DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten: Die ausgewählten Gewebestücke wurden mit einem sterilen Skalpell von den Objektträgern in ein Reagenzgefäß gekratzt und 20 µl DEXPATTM-Reagenz zugefügt. Die Mischung wurde 20 Minuten gekocht und abzentrifugiert. Von der obersten Phase wurden vorsichtig 20 µl abgenommen. Aus dieser Lösung wurde DNA in PCR-Reaktionen eingesetzt.
- DNA-Extraktion aus Agarosegelen: Mittels eines UV-Transilluminators wurden ethidiumbromidgefärbte DNA-Fragmente sichtbar gemacht, und die gewünschte DNA-Bande wurde aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten. Nach dem Wiegen des Gelstücks wurde die DNA mittels des Qiaquick Gel Extraktion Kits isoliert und in TE oder A. dest. gelöst.

3.9.3 Plasmidpräparationen

- Minipräparation: Aus 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur wurden die Bakterien abzentrifugiert (10.000 rpm, 5 Minuten), und dann mittels Qiaprep Minikit Plasmid-DNA-isoliert. Die Intaktheit der Plasmide und der relative Anteil hochspiralisierten Plasmids wurde auf einem Agarosegel geprüft und die Konzentration photometrisch bestimmt. Jede Plasmidpräparation wurde zur Kontrolle restriktionsverdaut.
- Midi-oder Maxipräparation: 1 ml einer 5 ml über-Tag Kultur (8 Stunden) wurde in eine 200 ml Übernachtskultur eingesetzt. Für eine Midipräparation wurden 50 ml, für eine

Maxipreparation 200 ml der Kultur abzentrifugiert und daraus mit dem Qiafilter™ Plasmid Midi- bzw. Maxikit Plasmid-DNA präpariert.

3.9.4 Proteinextraktion aus Zelllinien und normalen Uroepithelialzellen

Zur Proteinextraktion wurden 2 ml Proteinlysepuffer/10⁶ Zellen auf die Zellen pipettiert und diese 1 h auf Eis geschwenkt. Um die Viskosität zu minimieren, wurden die Lysate durch eine 25G Kanüle 3-4 mal passiert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mittels ProteinDC-Assay (vgl. 3.6.3).

3.10 Enzymatische Reaktionen

3.10.1 Restriktionsverdau

1 µg Plasmid-DNA wurde ad 17 µl A. dest. aufgefüllt und 2 µl des entsprechenden 10xPuffers und 10 U Restriktionsenzym zugefügt. Der Ansatz wurde bei der für das entsprechende Enzym optimalen Temperatur für 1-3 Stunden inkubiert und die Reaktion dann mit 3 µl Blaumarker abgestoppt.

3.10.2 In-vitro-DNA-Methylierung

5 µg Plasmid wurden in 100 µl, 80 µM S-Adenosylmethionin Puffer L (Roche) und 20 U HpaII-Methylase in einem Gesamtvolumen von 100 µl 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei 65°C 20 Minuten inaktiviert. Die Vollständigkeit der Methylierung wurde kontrolliert, indem 10 µl des Ansatzes mit 10 U HpaII bzw. MspI kontrollverdaut wurden.

3.11 Gelelektrophoretische Methoden

3.11.1 Agarosegele

Die DNA-Proben bzw. der Längenstandard wurde mit 1/5 Volumen Blaumarker versetzt und auf ein Agarosegel in 1x TBE-Puffer bei 100 V aufgetrennt. Die Dichte des Gels (0,7%-3%) wurde in Abhängigkeit von der Fragmentgröße gewählt. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte mittels Ethidiumbromidfärbung, wobei das Gel 5-20 Minuten in einer Lösung aus 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und anschließend auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm betrachtet wurde.

3.11.2 Polyacrylamidgele und SSCP

Durch SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) werden DNA-Fragmente detektiert, die aufgrund von Mutationen oder Polymorphismen eine andere

Wanderungsgeschwindigkeit im Gel zeigen als Kontrollfragmente. Nach Reinigung der PCR-Ansätze mit 1:1 Chloroform/Isoamylalkohol wurden ca. 100-300 ng DNA mit 4 µl Ladepuffer vermischt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und von dort auf ein 10%iges partiell denaturierendes Polyacrylamidgel (10% Acrylamid/Bisacrylamid, 2 M Harnstoff) aufgetragen. Die Polymerisierung wurde mit 0,8% Temed und 1/125 Volumen einer 10%igen APS-Lösung eingeleitet. Zur Vereinfachung der Handhabung wurde das Gel auf einer Polyester-Folie gegossen. Die DNA-Einzelstränge wurden in 1xTBE im elektrischen Feld bei 300-400 V über 16-24 Stunden bei 4°C aufgetrennt. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte über eine Silberfärbung. Dazu wurde das Gel zunächst 20 Minuten lang in 10% Ethanol, 0,5% Eisessig fixiert. Danach wurde das Gel in einer 1%igen Silbernitratlösung 20 Minuten geschwenkt, zweimal mit Aqua dest. gewaschen und solange in Entwickler geschüttelt, bis die Banden deutlich erkennbar waren. Dann wurden die Gele in Haushaltsfolie eingeschweißt.

3.12 Western Blot

Zwischen gereinigten Minigelplatten (6,2 cm x 8,7 cm) wurde zunächst ein Trenngel gegossen und eine Stunde polymerisiert. Der Gelrand wurde durch Aufpipettieren von Butanol geglättet. Nach Abgießen und Reinigen der Gelkante wurde das Sammelgel gegossen, der Kamm eingeschoben und das Gel 30 Minuten polymerisieren gelassen. Die Spacer wurden entfernt, das Gel in die Kammer in 1x Laufpuffer gestellt und der Kamm entfernt. Die Proteinlysate wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, abzentrifugiert und sofort auf Eis gestellt. 10 µg Gesamtprotein wurde auf ein Volumen von 10 µl gebracht, mit 10 µl Lämmli-puffer vermischt und 5 Minuten bei 96°C denaturiert. Proben und 10 µg eines Längenstandards (Protein Ladder, Gibco; 10-220 kDa) wurden in die ausgespülten Taschen aufgetragen, 10 min bei 70 V einlaufen gelassen und dann zur Proteintrennung ca. 75 min bei 140 V laufen gelassen. Nach dem Gellauf wurde das Sammelgel vom restlichen Gel abgeschnitten. Zunächst wurden 3 in Blotpuffer angefeuchtete Whatmanpapiere (in Größe des Gels) auf die Anode der Blotkammer gelegt. Dann wurde die Immobilon-Membran (in Methanol angefeuchtet und in Blotpuffer abgespült) aufgelegt; darauf wurde das Gel und nochmals 3 Lagen feuchtes Whatmanpapier aufgelegt. Die Blotkammer wurde mit 1 kg Gewicht beschwert; und das Gel wurde mindestens 60 Minuten geblottet. Anschließend wurde die Membran in 10% Magermilchpulver in PBS/0,1% Tween überführt und über Nacht bei 4°C geblockt. Dann wurde die Membran für eine Stunde in der 1. Antikörperlösung inkubiert (die Antikörper wurden in 10% Magermilchpulver in PBS/0,1% Tween

folgendermaßen verdünnt: E2F-1 KH95 sc-251 (1:1000), p21WAF1 Ab-1 (1:1000), p53 Ab-2 (1:2750), p27 F-8 sc-1641 (1:1000), Rb C-15 sc-50 (1:5000), Rb IF-8 sc102 (1:1000), anti- α -tubulin 3-5-1-2 (1:5000)). In PBS/0,1% Tween wurde die Membran 1x15 Minuten und 2x5 Minuten auf einem Schüttler gewaschen. Dann wurde die Membran 60 Minuten in der Zweit-Antikörper Lösung geschwenkt (1:5000 HRP-gekoppelten anti-mouse Antikörper in 10% Magermilchpulver in PBS/0,1% Tween) und wiederum gewaschen. Für die Proteindetektion wurden ca. 0,125 ml/cm² Membran ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 gemischt und exakt 1 Minute auf der abgetropften Membran inkubiert. Diese wurde in Frischhaltefolie eingelegt, in eine Röntgenkassette geklebt und ein ECL-Film unterschiedlich lange (zwischen 5 und 30 Minuten) darauf exponiert und entwickelt.

3.12 Durchflußzytometrie

Für alle durchflußzytometrischen Messungen wurden mindestens 10⁶ Zellen pro Ansatz benötigt. Die Zelllinien wurden darum in 35 mm-Platten kultiviert und transfiziert, während für Normalzellen pro Ansatz 4-6 Wells einer 6-Well Platte benötigt wurden.

3.13.1 Zellzyklusanalyse

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 0,1% Trypsin abgelöst. Dann wurde die Zellsuspension im doppelten Volumen Medium aufgenommen und dabei die Zellen gut vereinzelt. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei 4°C und 1000 Upm zentrifugiert und zweimal in PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in FACS-Puffer-2 resuspendiert, in der Neubauer-Kammer ausgezählt und auf 10⁶/ml eingestellt. Die Zellen wurden wiederum zentrifugiert. Auf das Zellpellet wurde tropfenweise langsam 1 ml eiskalter 70% Ethanol gegeben, worin die Zellen zunächst resuspendiert und dann über Nacht bei 4°C fixiert wurden. Dann wurden die Proben zentrifugiert (5 Minuten, 3000 rpm, 4°C) und auf das Zellpellet 1 ml Propidiumiodid-Färbelösung gegeben. Nach dem Mischen der Suspension inkubierten die Proben mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurden die Proben durchflußzytometrisch gemessen. Dabei wurde nach den Vorgaben des Herstellers (Becton Dickinson) zur Bedienung und Auswertung am FACS-Analysegerät vorgegangen. Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurde das Programm CellQuest (Becton Dickinson) verwendet.

3.13.2 Annexin-V-Biotin-Apoptose-Assay

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 0,1% Trypsin abgelöst. Dann wurde die Zellsuspension im doppelten Volumen Medium aufgenommen und dabei die Zellen gut vereinzelt. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert und zweimal in PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in PBS resuspendiert, in der Neubauer Kammer ausgezählt und auf 10^6 Zellen/ml eingestellt. Das Zellpellet wurde nach Herstellerangaben 15 Minuten in 10 µl Markierungslösung resuspendiert, anschließend zentrifugiert, in Inkubationspuffer gewaschen und in 5 µg/ml Avidin-Fluorescein/Inkubationspuffer 20 Minuten bei 4°C geschüttelt. Die Proben wurden in Inkubationspuffer gewaschen, in 40 µl Inkubationspuffer aufgenommen und im FACS-Analysegerät gemessen.

Folgende Kontrollen wurden mitgeführt:

- untransfizierte Zellen
- untransfizierte Zellen, 3-4 h in 10^{-4} M Mitomycin inkubiert
- untransfizierte Zellen, 3-4 h in 5 µg/ml Camptothecin inkubiert
- untransfizierte Zellen, 12 h mit 150 ng/ml CH-11 inkubiert

3.13.3 Intrazelluläre Färbung von p53

Für diesen Test wurden folgende Antikörper verwendet:

- FITC-konjugierter Mouse-Anti-Human p53 monoklonaler Antikörper, Klon DO-7; PharMingen
- FITC-konjugierter Mouse IgG_{2b} monoklonale Isotypen-Kontrolle, Klon 27-35; PharMingen

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 0,1% Trypsin abgelöst. Dann wurde die Zellsuspension im doppelten Volumen Medium aufgenommen und dabei die Zellen gut vereinzelt. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert und zweimal in PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in FACS Puffer-2 resuspendiert, in der Neubauer-Kammer ausgezählt und auf 10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Proben wurden abzentrifugiert und die Zellen in je 500 µl 4% Paraformaldehyd fixiert und auf Eis 15 Minuten inkubiert. Dann werden die Zellen in FACS Puffer gewaschen, 20 µl der Antikörper-Lösung [3 ng/µl] auf die Zellen pipettiert und auf Eis 25 Minuten inkubiert. Die Proben wurden 1x in Saponin-Puffer und 1x in FACS-Puffer gewaschen und dann durchflußzytometrisch gemessen.

Es wurden folgende Kontrollen mitgeführt:

- untransfizierte Zellen, fixiert, unbehandelt

- untransfizierte Zellen, fixiert aber nicht permeabilisiert, +AK (monoklonaler FITC-konjugierter Maus Anti-human p53 Antikörper)
- untransfizierte Zellen, fixiert, permeabilisiert, +AK
- untransfizierte Zellen, fixiert, permeabilisiert, + Isotypenkontrolle (monoklonaler FITC-konjugierter Maus IgG_{2b})
- RSV-p53 transfiziert, fixiert aber nicht permeabilisiert, +AK
- RSV-p53 transfiziert, fixiert, permeabilisiert, +AK
- RSV-p53 transfiziert, fixiert, permeabilisiert, + Isotypenkontrolle

4. Ergebnisse

4.1 Analyse von p53-Mutationen in Harnblasenkarzinomen

4.1.1 Immunhistochemische Untersuchung der P53-Proteinakkumulation in Harnblasenkarzinomen

Zur Optimierung der immunhistochemischen Färbungen wurden zunächst an zwei gesichert p53-positiven, paraffin-eingebetteten Proben Konzentrationsreihen des primären (Ab-6) und sekundären Antikörpers (biotinylierter anti-mouse IgG H+L) und unterschiedliche Aufschlußmethoden (ohne Vorbehandlung, Zitratpufferbehandlung, TweenX-100-Aufschluß) ausgetestet. Die Verdünnung 1:100 in 2% PBSA für beide Antikörper nach Zitratpuffervorbehandlung erwies sich als optimal, um eine spezifische und reproduzierbare nukleäre Färbung in den Tumorzellen zu erzielen.

Dann wurden insgesamt 95 Schnitte aus Harnblasenkarzinomen gefärbt. Diese Proben stammten überwiegend aus Cystektomiepräparaten, also zumeist fortgeschrittenen Tumoren (vgl. Tab. 4.1.3). Sämtliche Proben waren zuvor vom Pathologen begutachtet und klassifiziert worden. Dabei wurden Färbungen, die sehr heterogen erschienen und einzelne Reihen, in denen Positiv- oder Negativkontrolle nicht eindeutig waren, wiederholt. Die Ergebnisse werden in Tabelle 4.1.1 dargestellt. Legt man den "Cut-off"-Wert für positive p53-immunhistochemische Färbung - wie häufig üblich - bei 10% gefärbter Tumorzellen, so zeigen 52% der Proben ein positives Resultat. Ein signifikanter Zusammenhang mit Stadium oder Grad des Tumors war nicht zu erkennen (vgl. Tab. 4.1.1 (a)). Verwendet man den Mantel-Haenszel-Test, so ergibt sich allerdings ein Trend für die Überprüfung des Zusammenhangs von Grad des Tumors und immunhistochemischem Resultat. Der niedrigere Wert im Mantel-Haenszel-Test gegenüber dem Fisher-Test unterstreicht einen graduellen Trend mit zunehmendem Tumorgrad (vgl. statistischer Anhang). Dabei ist in dem vorliegenden Kollektiv die Anzahl der fortgeschrittenen Tumoren sehr hoch, da vorwiegend Cystektomiepräparate analysiert wurden, so daß nicht für alle Stadienklassen oder Gradklassen annähernd die gleiche Anzahl von Tumorpräparaten analysiert wurden.

Tabelle 4.1.1: Immunhistochemischer Nachweis von p53 in Harnblasenkarzinomen

Die Tumorstadien wurden aufgegliedert in pTis, pTa, pT1-4, pTx; der Tumorgrad in G1, G2, G3, G4, Gx. Die immunhistochemische Bewertung wurde in die Klassen "0%, 0-5%, 5-10%, 10-20% und >20% der Tumorzellen mit positiver immunhistochemischer Färbung" eingeteilt.

(a) Zusammenfassung der immunhistochemischen Daten und Statistik. Angegeben wird die absolute Anzahl der Proben, die in die jeweilige Kategorie fallen.

linker Teil der Tabelle: Abhängigkeit vom Stadium; rechter Teil: Abhängigkeit vom Malignitätsgrad. Es werden die errechneten p-Werte aus dem exakten Test von Fisher und Mantel-Haenszel-Test (MH) angegeben.

(b) Immunhistochemische Auswertung. Angegeben wird Anzahl und prozentualer Anteil von Proben mit den jeweiligen immunhistochemischen Resultat.

(a)	>10% der Tumor- zellen positiv	<10% der Tumor- zellen positiv		>10% der Tumor- zellen positiv	<10% der Tumor- zellen positiv
pTis	1	0	G1	2	2
pTa	5	4	G2	12	18
pT1	5	5	G3	29	24
pT2	12	11	G4	5	1
pT3	17	21	Gx	0	1
pT4	9	4			
pTx	0	1			
Summe	49	46	Summe	48	46
p-Wert (Fisher-Test)	0,696		p-Wert (Fisher-Test)	0,261	
p-Wert (MH-Test)	0,972		p-Wert (MH-Test)	0,090	

(b)

IHC: 0%	Tx	Ta	T1	T2	T3	T4	Gx	G1	G2	G3	Summe
total	1	3	2	7	6	2	1	2	8	10	21
relativ	4,8%	14,3%	9,9%	33,3%	28,6%	9,9%	4,8%	9,5%	38,1%	47,6%	
IHC: < 5%	Ta	T1	T2	T3	T4	G2	G3	G4	Summe		
total	1	2	2	14	2	7	13	1	21		
relativ	4,8%	9,5%	9,5%	66,7%	9,5%	33,3%	61,9%	4,8%			
IHC: 5-10%	T1	T2	T3	G2	G3	Summe					
total	1	2	1	3	1	4					
relativ	25,0%	50,0%	25,0%	75,0%	25,0%						
IHC: 10-20%	Ta	T1	T2	T3	T4	G1	G2	G3	Summe		
total	2	3	1	2	2	1	5	4	10		
relativ	20,0%	30,0%	10,0%	20,0%	20,0%	10,0%	50,0%	40,0%			
IHC: >20%	Ta	T1	T2	T3	T4	Tis	G1	G2	G3	G4	Summe
total	3	2	11	15	7	1	1	7	25	5	39
relativ	7,7%	5,1%	28,2%	38,5%	17,9%	2,6%	2,6%	17,9%	64,1%	12,8%	

4.1.2 SSCP-Analyse des p53-Gens in Harnblasenkarzinomproben

Als Ausgangsmaterial wurde in der Regel DNA aus in flüssigem Stickstoff schockgefrorenem Gewebe verwandt. In den Fällen, in denen dieses nicht mehr verfügbar war, wurde aus Paraffinschnitten DNA isoliert und in die PCR-Reaktion eingesetzt. Zur Optimierung der Methodik wurden zunächst die PCR-Bedingungen für die einzelnen Primerpaare optimiert (vgl. 3.2.1). In Abbildung 4.1.2 wird eine Übersicht zur Position der verwendeten Primer im Gen gegeben. Amplifikate aus jeweils drei verschiedenen Amplifikationen (drei Primerpaare je Exon) wurden auf SSCP-Gele aufgetragen und für jedes Exon die optimalen Gellaufbedingungen bestimmt. Als Kontrollen wurden jeweils Zelllinien mitgeführt, die nachgewiesene Mutationen in den entsprechenden Exonen trugen, sowie zwei DNA-Proben aus Blut von Personen mit nicht-malignen Erkrankungen. Insgesamt wurden 109 Patienten untersucht.

Die Ergebnisse werden in Tabelle 4.1.2 zusammengefaßt. 30% der Patienten zeigten abweichende Banden in einem oder mehreren Exonen. Der sehr häufige G>C Polymorphismus in Exon 4 (Codon 72) konnte dabei auf den Gelen nicht identifiziert werden und wurde erst in der Sequenzierung detektiert. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß auch nicht alle Mutationen in der SSCP-Analyse erkennbar waren. Der A>G Polymorphismus in Exon 6 (Codon 213) fiel dagegen in der SSCP als abweichende Bande auf.

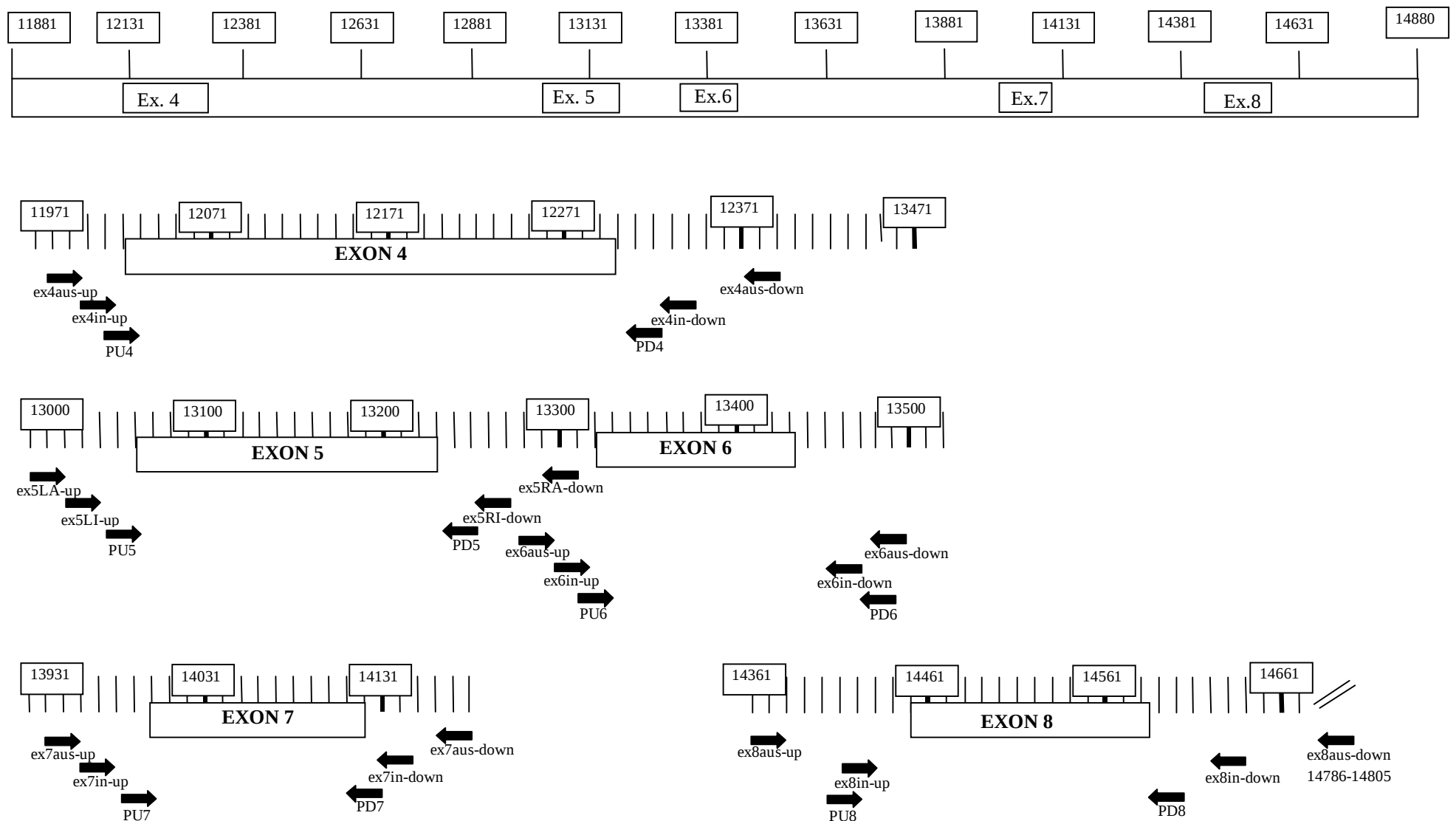


Abb. 4.1.2: Lage der verwendeten p53-Primer im Gen; Nummerierung gibt Basenpaar innerhalb des p53-Gens an (Accession # U9478Y)

Tab 4.1.2: Ergebnisse der SSCP-Analyse.

Anzahl und Prozent (von der Gesamtanzahl der untersuchten Patienten) der Proben mit abweichenden Banden. Zwei Patienten zeigten sowohl in Exon 6 wie in Exon 8 eine Abweichung

	Einzelmutation in :					Doppel- mutation
	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 6+8
Anzahl	3	3	6	2	8	2
Prozent (n=109)	2,8%	2,8%	5,5%	1,8%	7,3%	1,8%

4.1.3 Sequenz-Analyse des p53-Gens in Harnblasenkarzinomproben

Zur Sequenzierungsanalyse wurden zunächst die PCR-Reaktionen verwandt, die auch für die SSCP-Analysen verwendet worden waren. Zuerst wurde für jedes Exon optimiert, mit welchen Primerpaaren die besten Sequenzierungsergebnisse erzielt werden konnten. Die folgenden Ansätze erwiesen sich als optimal: Exon 4: ex4in-up/ex4-down; gefolgt von PU4/PD4 im "Cycle Sequencing"; Exon 5: ex5LI-U/ex5LI-D und ex5LA-U/ex5LA-D gefolgt von PU5/PD5 im "Cycle Sequencing"; Exon 6: ex6in-up/ex6in-down und ex6aus-up/ex6aus-down gefolgt von PU6/PD6 im "Cycle Sequencing"; Exon 7: ex7in-up/ex7in-down und ex7aus-up/ex7aus-down gefolgt von PU7/PD7 im "Cycle Sequencing"; Exon 8: ex8in-up/ex8in-down gefolgt von PU8/PD8 im "Cycle Sequencing" (vgl. Abbildung 4.1.2). In den Fällen, wo eine Mutation nicht durch direktes Sequenzieren aus der PCR-Reaktion entdeckt werden konnte, wurde die mutante Bande aus dem SSCP-Gel ausgeschnitten, um den mutanten DNA-Anteil anzureichern. Aus extrahierter DNA wurde eine erneute PCR durchgeführt und dann in das "Cycle Sequencing" eingesetzt. Jede Sequenzierung wurde mehrmals wiederholt. Anhand von Mischung von Zelllinien-DNAs von Zelllinien mit unterschiedlichen Mutationen wurde eine Abschätzung vorgenommen, wie hoch in den Gewebeproben die Kontamination durch nichtmutierte normale DNA sein darf, damit die Mutation noch durch direktes Sequenzieren erkennbar bleibt. Die Grenze lag für die getesteten Mutationen (VMCub1: Exon 5, Codon 175; VMCub2: Exon 5; Codon 158 und 163) bei 70% mutanter DNA: 30% Wildtyp-DNA. Sequenziert wurde stets

in beide Richtungen, so daß eventuelle Mutationen abgesichert werden konnten. In Tabelle 4.1.3a wird ein Überblick über die Ergebnisse der Mutationsanalyse gegeben, und bei detektierten Mutationen ihre offizielle, internationale Klassifikation und Identifikation und der vorhergesagte Aminosäureaustausch angegeben. Zählt man stille Mutationen nicht mit, so wurden 11,7% der Mutationen bei Patienten gefunden, die in der Immunhistochemie ein Ergebnis unter dem Cut-off gezeigt hatten (<10%), während 25,5% bei Patienten mit positivem immunhistochemischen Resultat erkannt wurden (>10%).

Tabelle 4.1.3a: Ergebnisse der immunhistochemischen, SSCP- und Sequenzierungsanalyse.

n.d.: nicht erhobene Daten; IHC: immunhistochemische Resultate; k.P.: kein paraffineingebettetes Gewebe vorhanden; SSCP: Exone, die abweichende Banden zeigen sind angegeben, + : keine abweichende Bande detektierbar, Sequenzierung: die Ziffern geben das Basenpaar an, bei dem eine Mutation detektiert wurde; Art der Veränderung: Basenaustausch; die Identifikation erfolgt entsprechend der Nummerierung der unter der Kennziffer U94788 verzeichneten p53-Gensequenz; Pol: Polymorphismus, n.b.: nicht bekannt, falls die Mutation bislang nicht international verzeichnet ist, gefolgt von dem durch die Mutation bedingten Aminosäureaustausch; ID x: internationale Identifikationsnummer dieser Mutation nach [www.iarc.fr/p53/index.html].

Nr.	Histologie	IHC	SSCP	Sequenzierung	Art der Veränderung	Codon	Wildtyp-codon	Identifikation
2	pT3biiN0M0G2	<5%	+	+				
3	pT2aN0MxG2	>20%	+	+				
4	pT2bN0M0G3	<5%	+	Ex.4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
5	pT3aN0M0G3-4	>20%	+	Ex.5, 13079	T>G	134	TTT	n.b. Lys>Arg
6	pTaN0M0G2	<5%	+	Ex.4, 12124	C>T	67	CCA	n.b. Pro>Leu
7	pT1N0M0G2	5-10%	Ex.6	Ex.4, 12171; Ex.6, 13399	T>G A>G	83 213	TCG CGA	n.b. Thr>Ala Pol
9	pT3biiN2M0G3	<5%	Ex.6	+				
10	pT3bN0MxG2	<5%	+	+				
11	>pT2bG3	kP	+	+				
13	pT3aN0M0G3-4	<5%	Ex.5	n.d.				
14	pT2aNxMxG3	0%	+	+				
15	pT3NxMxG3	>20%	+	Ex.4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
16	>pT2G2	kP	+	Ex.4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
17	pT2N0M0G2	5-10%	+	+				
19	pT3bN0M0G3	>20%	+	Ex.4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
21	pTaG1	>20%	+	+				
22	pT2aN1M0G2	<5%	+	+				

24, 99	pT2bN0M0G3	>20%	Ex.6+8	Ex.6, 13399 Ex.7, 14071 Ex.8, n.d.	A>G G>A	213 248	CGA CAG	Pol n.b. silent Mut.hotspot
25	pT3bN0M0G2	<5%	+	Ex.7, 14104	C>A	259	GAC	n.b. Asp>Glu
27	pT2aN0MxG2	0%	+	Ex.4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
28	pT3bN0M0G3	kP	+	+				
30	pT3aN2M0G3	>20%	+	+				
31	pTaNxMxG2	0%	+	+				
36	pT3bN2G3	>20%	+	+				
37	pT3aN2M0G3	0%	+	+				
38, 39	pT3bN0M0G3	>20%	+	+				
40	pT3biiN0MxG3	>20%	+	Ex. 4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
42	pT4aN1M0G3	0%	+	+				
43	pT3bN1M0G3-4	>20%	+	+				
45	pT2aN0M0G3	0%	+	+				
50	pT3bN0M0G2	10-20%	Ex.6	+				
52	pT3bN0M0G2	<5%	+	+				
53	>pT2G3	kP	Ex.7	n.d.				
54	pT4aN0M0G3	>20%	+	+				
57	pT1NxMxG3	10-20%	Ex.8	n.d.				
58	>pT2%%G3	kP	Ex.8	n.d.				
60	pT4aN0M0G4	>20%	Ex.8	Ex.8, 14522	G>A	285	GAG	ID 19105; 19100; 19085 Glu>Asp
61, 18	pT3N0G4	>20%	Ex.8	Ex.8, 14501	C>A	278	CCT	ID 19106 Pro>Thr
62	pTaG2	10-20%	+	+				
63	pT2bN0M0G2-3	>20%	+	+				
65	pT3aN0G3	0%	+	+				
66	pTaN0M0G2	kP	+	Ex.4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
67	pT4aN0M0G3	<5%	+	+				
69	pT2NxMxG1	0%	+	+				
72	pTaN0M0G3	>20%	+	+				
74	>pT2N0M0G3	>20%	+	Ex.7, 14036	A>G	237	ATG	ID14435 Met>Val
76	pT1N0M0G3	0%	+	+				
77	pT4aN0M0G3	<5%	+	Ex.4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
78	pT3aN0M0G2	>20%	+	Ex.5, 13206	G>T	175	CGC	ID 20193 Arg>Leu
79	pT1N0M0G2	>20%	+	+				
81	pT3biN0M0G3	5-10%	+	Ex.4, 12171	T>C	83	TCG	n.b. Thr>Pro
82	pT4aN0M0G3	>20%	+	+				
85	pT3bN0M0G2-3	<5%	+	+				
87	pT1N0M0G2-3	<5%	+	+				
89	pT4N2M0G4	>20%	+	+				
91	pT1G2	10-20%	+	Ex.7, 14058	G>A	244	GGC	ID 20655; 43456 Gly>Asp
92	pT1G2	10-20%	+	Ex.4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
93	pT2N0MxG2	0%	+	Ex.4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
94	pT3aN0M0G3	<5%	+	Ex.7, 14067 Ex.7, 14083	A>T C>T	247 252	AAC CTC	n.b. n.b.
96	pT2bN0M0G3	>20%	+	+				
98	pT4aN0M0G3	10-20%	+	+				
100	pT3bN0M0G3	<5%	Ex.6	Ex.6, 13425	C>A	222	CCG	ID 15161; 15185 Pro>Gln
102	pT4aN2MxR1	>20%	Ex.7	Ex.7, 14071	G>A	248	CAG	n.b. silent Mut.hotspot
104	pT3aN0M0G2	10-20%	Ex.4	n.d.				
106	pT3bN0M0G3	<5%	+	Ex.4, 12139; Ex.6 13397	G>C C>T	72 213	CGC CGA	Pol ID 19095

								Arg>Stop
108	pTis	>20%	Ex.4	n.d.				
110	pT3biiN0M0G3	>20%	Ex.6	n.d.				
112	pT1N0M0G2	<5%	+	+				
113	pT2aN0M0G3	>20%	+	+				
114	pT4aN2M0G3	10-20%	+	+				
116	pT3b N1M0G3	>20%	+	+				
118	pT4aN2M0G3	>20%	Ex.6+8	n.d.				
119	pT3aN2M0G3	<5%	+	+				
120	pT2aN0M0G3	>20%	Ex.4	n.d.				
122	pTaN0M0G2	0%	+	Ex.7, 14066	A>G	247	AAC	n.b. Asn>Asp
124	pT2N0M0G2	0%	+	+				
125	pTaN0M0G1	0%	+	+				
126	pT4N1M0G2	0%	+	+				
128	pT1N0M0G3	>20%	+	Ex.6, 13392	C>T	211	ACT	ID 43360 Thr>Ile
129	n.b.	kP	+	+				
130	n.b.	0%	+	+				
132	pT3aN2M0G3	>20%	+	+				
133	pTaN0M0G1	kP	+	+				
135	pT3bN1M0G3	<5%	+	Ex.4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
136	pT3N2M0G2	>20%	Ex.8	Ex.8, 14491	T>C	274	GTT	ID13864 Val>silent
138	pT2bN0M0G3	>20%	Ex.5	Ex.5, 13075	G>T	132	AAG	n.b. Lys>Asn
139	pT1N0M0G2-3	0%	+	+				
140	pT2aN0M0G2	5-10%	+	Ex.4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
141	pTaN0M0G1	10-20%	+	+				
144	pTaG2	>20%	+	Ex.4, 12139	G>C	72	CGC	Pol
149	pT4aN0M0G3	kP	+	+				
152	pT2bN0M0G3	0%	+	+				
153	pTaN0M0G2	kP	+	+				
155	n.d.	kP	Ex.6	n.d.				
157	pT3bN0M0G3	0%	+	+				
159	pT2bcN3M1G3	10-20%	Ex.8	n.d.				
161	pT3aN1M0G3	kP	+	+				
163	pT2aN1M0G2	>20%	+	+				
165	pT3bN0M0G3	0%	+	+				
167	pT3bN2M0G3	<5%	+	Ex.5, 13357	A>C	199	GGA	n.b. silent
169	pT3aN0M0G2	>20%	Ex.5	n.d.				
172	pT2bN0M0G3	>20%	Ex.8	n.d.				
174	pT4aN1M0G3	>20%	Ex.8	Ex.5, 13172; Ex.8: n.d.	C>T	165	CAG	ID 42500 Gln>Stop
178	pT3bN0M0G2	0%	+	+				
180	pT4aN0M0G2	kP	+	+				
182	pT2aN0M0G3	>20%	+	+				
184	pT3bN0M0G2	0%	+	+				
186	pT3b N0M0G3	<5%	+	+				

Vergleicht man die immunhistochemischen Daten mit den Mutationen, die durch SSCP-Analyse oder Sequenzierung entdeckt wurden (Tab. 4.1.3b), so ergibt sich eine signifikant höhere Anzahl von Mutationen bei denjenigen Proben, die immunhistochemisch ein stark positives Ergebnis zeigten. Der besonders niedrige p-Wert

im Mantel-Haenszel-Test im Vergleich zum Fisher-Test unterstreicht den graduellen Trend zu stark positiven Proben (vgl. statistischer Anhang). Bei dieser Auswertung wurden nur diejenigen Proben berücksichtigt, bei denen ein immunhistochemisches Ergebnis vorlag; Polymorphismen wurden ebenfalls nicht berücksichtigt. Der häufige Polymorphismus in Exon 6 war offensichtlich in der SSCP erkennbar und in der Sequenzierung detektierbar. Der Polymorphismus in Exon 4 war in der SSCP nicht erkennbar, aber in der Sequenzierung detektierbar. Bei Nicht-Vorliegen der direkten Sequenzierungsergebnisse wurden diejenigen aus der SSCP benutzt. So konnten durch Benutzung der SSCP-Daten höchstens zuwenige Mutationen aufgenommen werden, nicht aber fälschlicherweise zuviele durch das Einbeziehen von Polymorphismen. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4.1.3b dargestellt; in Abbildung 4.1.3 werden Beispiele für Immunhistochemien, SSCP-Gele und Sequenzierungsdaten gegeben.

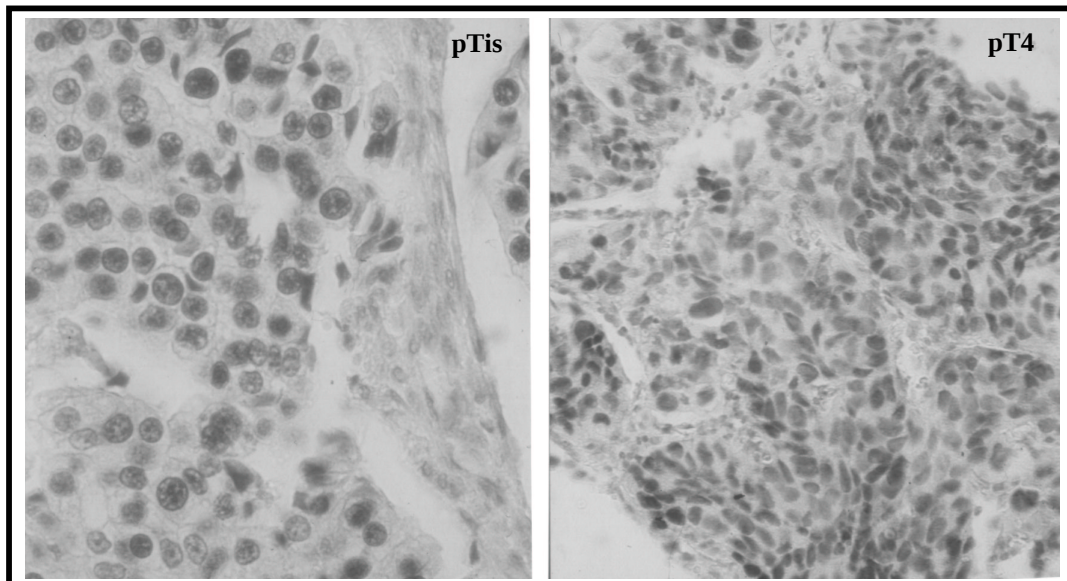
Tabelle 4.1.3b Vergleich von immunhistochemischen Daten, SSCP- und Sequenzierungsanalyse; MH: Mantel-Haenszel-Test; F: approximative Version des exakten Test von Fisher

	Mutationen in					Summe:	Summe keine erkennbare Mutation
	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	mutant	
0-5%	1	2	3	3	0	9	33
5-10%	2	0	0	0	0	2	2
10-20%	0	0	1	1	1	3	7
>20%	2	5	3	3	8	21	18

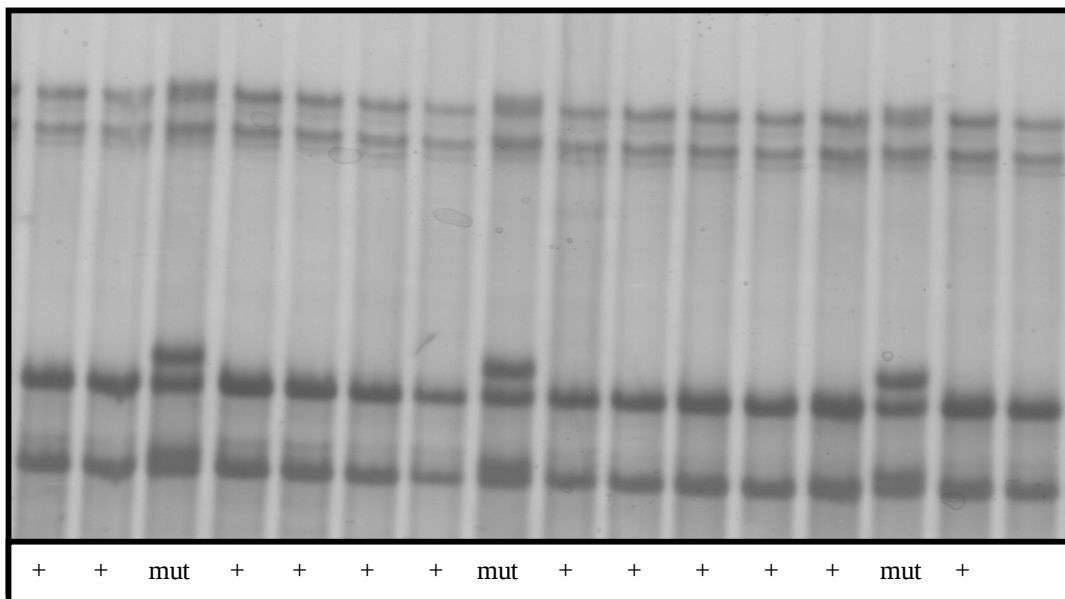
$$p(\chi^2) = 0,022$$

$$p(\text{MH}) = 0,00385$$

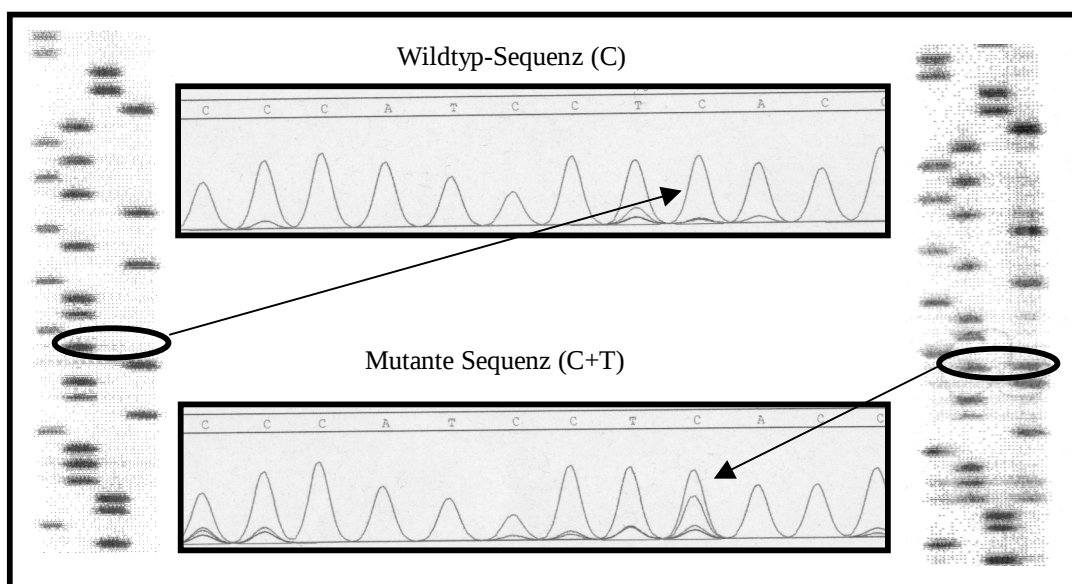
$$p(\text{F}) = 0,015$$



Immunhistochemie
p53
Antikörper: Ab-6



SSCP-
Analyse
Exon 6 p53



Sequenzierung
p53, Exon 7

Abb. 4.1.3: Immunhistochemie, SSCP-Analyse und Sequenzierung von p53, mut=mutant; Erläuterungen im Text (4.1.3)

4.2 Tumorspezifisches Targeting p53-induzierter Apoptose

Um einen Promotor zu identifizieren, der spezifisch in Harnblasenkarzinomzellen stärker aktiv ist als in normal proliferierenden uroepithelialen Zellen (NUZ= Normale Uroepitheliale Zellen), sollten spezifische Defekte in der G1-S-Restriktionspunktkontrolle von Tumorzellen ausgenutzt werden. Im Modell von Harnblasenkarzinomzelllinien und primärkultiviertem Normalurothel wurde durch Reporteranalysen die Tumorspezifität verschiedener zellzyklusabhängiger Promotoren untersucht, von denen bekannt war, daß sie im Verlauf des G1-S Übergangs aktiviert werden. Dazu wurden Promotoren ausgewählt, die mindestens eine funktional aktive E2F-Bindungsstelle trugen (diese werden im folgenden als E2F-abhängige Promotoren bezeichnet) und Harnblasenkarzinomzelllinien mit verschiedenen Störungen im G1-S-Kontrollpunkt. Im weiteren Verlauf wurden die Auswirkungen der durch ausgewählte Promotoren kontrollierten transgenen Wildtyp-p53-Expression auf den Zellzyklus untersucht.

4.2.1 Zellkulturmodelle

4.2.1.1 Etablierung der Kultur von normalen Uroepithelialzellen

Da die im weiteren Verlauf beschriebenen zellzyklusspezifischen Experimente grundsätzlich im Vergleich von Harnblasenkarzinomzellen mit ihrem natürlichen "Pendant", nämlich normalen Uroepithelialzellen, erfolgen sollten, mußte die Kultur von normalen Zellen etabliert werden. Diese Kulturen sollten es erlauben, über einen Beobachtungszeitraum von mindestens drei Wochen normale Uroepithelialzellen kultivieren und transfizieren zu können und Expressionsuntersuchungen, Zellzyklusuntersuchungen, Apoptose-, Proliferations- und Proteinmessungen durchführen zu können. Dabei sollten die Zellen nicht immortalisiert werden, damit für die nachfolgenden, insb. zellzyklusregulatorischen, Experimente davon ausgegangen werden konnte, daß die Ergebnisse weitgehend einen normalen, nichtmalignen Zustand uroepithelialer Zellen widerspiegeln.

Die Zellen wurden aus Harnleiterstücken von Patienten, die nephrektomiert worden waren, gewonnen. Hierzu wurde im wesentlichen nach der in Southgate, 1994, beschriebenen Methodik vorgegangen. Auf die darin beschriebene Verwendung von Kollagenase konnte verzichtet werden. Es war allerdings unbedingt erforderlich, die Zellen beim ersten Aussäen auf Kollagen-beschichteten Platten auszusäen. Nach dem

Anwachsen der Zellen mußte innerhalb von 24 h das Medium gewechselt werden, um Zelltrümmer abgestorbener Zellen zu entfernen. Innerhalb von ca. einer Woche konnten die Zellen zum ersten Mal passagiert werden. Dabei war es wichtig, die Zellen möglichst früh zu passagieren, um die Kultur von Fibroblasten zu befreien, die ansonsten die Kultur überwuchsen. Dazu wurde Versen eingesetzt, worin sich die Fibroblasten als erstes ablösen (vgl. 3.5.3). Abbildung 4.2.1.1a zeigt eine phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer primären Uroepithelialkultur nach der ersten Passage. Alle Expressionsversuche und durchflußzytometrischen Messungen wurden unmittelbar nach der ersten Passage vorgenommen, da schon ab der zweiten Passage die Zellen wesentlich schlechter transfizierbar waren und zunehmend seneszent wurden. Zur Etablierung der Transfektionsbedingungen wurden wie unter 4.2.1.3 beschrieben verschiedene liposomale Reagenzien ausgetestet; hierbei erwies sich FuGene als optimal (vgl. 4.2.1.3), da alle anderen liposomalen Reagenzien einen cytotoxischen Effekt auf die Normalzellen zeigten. Abbildung 4.2.1.1b zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme normaler Uroepithelialzellen nach Transfektion mit pEGFP C1 mittels FuGene. Sie demonstriert, daß sich die Primärkulturen transfizieren lassen. Hierbei wurde durchflußzytometrisch eine für normale Primärkulturen erstaunlich hohe Transfektionseffizienz gemessen, die je nach Kultur zwischen 5% und 30% variierte (vgl. Abb. 4.2.1.1c). Dabei könnte man auf zwei unterschiedliche Weisen die Transfektionseffizienz festlegen. Zunächst könnten diejenigen Zellen als GFP-positiv bezeichnet werden, die stärker GFP-positiv sind, als der Schnittpunkt zwischen der Kontrolle (nicht transfizierte Zellen) und GFP-transfizierten Zellen vorgibt (in Abb. 4.2.1.1c durch M1 markiert). Dann ist in der Regel ein hoher Prozentsatz (18,1% im Beispiel 4.2.1.1c) untransfizierter Zellen als Hintergrund GFP-positiv. Adjustiert man bezüglich dieses Hintergrunds, ergibt sich eine Transfektionseffizienz von 22,1% in diesem Beispiel. Man kann auch diejenigen Zellen als GFP-positiv definieren, wie es in 4.2.1.1c durch M2 markiert wurde. Hierbei wurde die Grenzlinie so gelegt, daß weniger als 1% der untransfizierten Zellen in den GFP-positiven Bereich fallen. In diesem Beispiel ergibt sich so eine Transfektionseffizienz von ca. 8%.

Untransfizierte normale Uroepithelialzellen zeigen eine vergleichbare Zellzyklusverteilung wie die untransfizierte Tumorzelllinie VMcub1 (Abb. 4.2.1.1d); dies ist nicht der Fall für Fibroblasten, die einen geringeren Prozentsatz von Zellen in S-Phase aufweisen.

Abb. 4.2.1.1a: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer konfluenten Kultur normaler Uroepithelialzellen (NUZ) nach der ersten Passage; Vergrößerung: links: 250 x; rechts: 400 x.

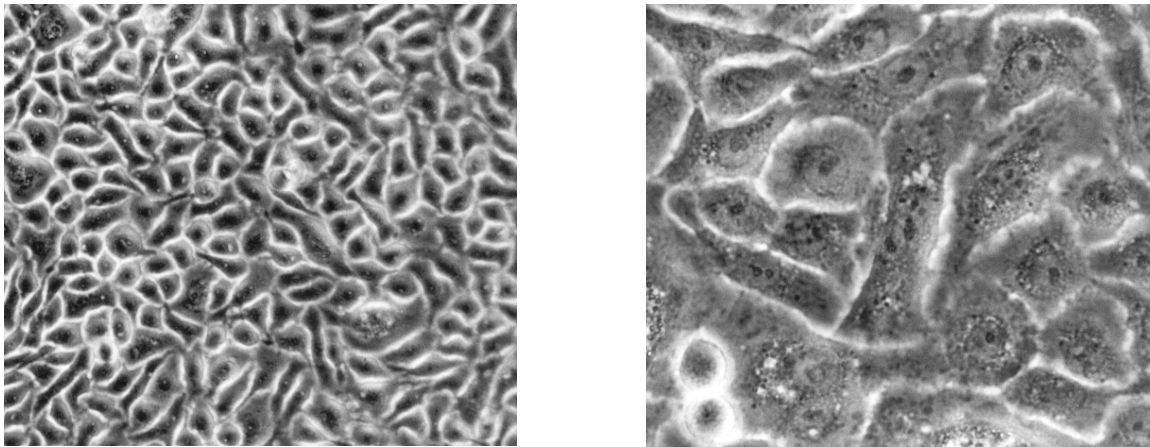


Abb. 4.2.1.1b: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit GFP transfizierter normaler Uroepithelialzellen (NUZ). Die NUZ wurden nach erster Passage auf Objektträgern ausgesät und mit pEGFP C1 mittels FuGene transfiziert. Nach weiteren 48 h Kultur wurden die Zellen fixiert und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet und fotografiert; Vergrößerung: 630 x.

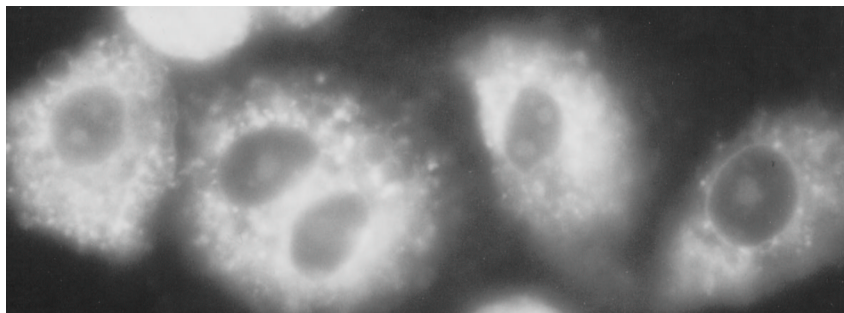


Abb. 4.2.1.1c: Transfektionseffizienz primär kultivierter normaler Uroepithelialzellen (NUZ) mittels FuGene. Die NUZ wurden nach erster Passage auf 24-Well-Platten ausgesät und mit pEGFP C1 transfiziert. Nach weiteren 48 h Kultur wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und die GFP Fluoreszenz durchflußzytometrisch gemessen.

M2 wurde so gelegt, daß weniger als 1% der normalen, untransfizierten Zellen in den GFP-positiven Bereich=M2 fallen. Als alternative Betrachtung wurde M1 so gelegt, daß die Grenze genau die Schnittstelle der Kurven untransfizierter und GFP-transfizierter Zellen markiert. weitere Erläuterungen im Text.

NUZ, untransfiziert (----): M1=18,1%

M2=0,9%

NUZ, GFP-transfiziert (....): M1=82,0%

M2=7,3%

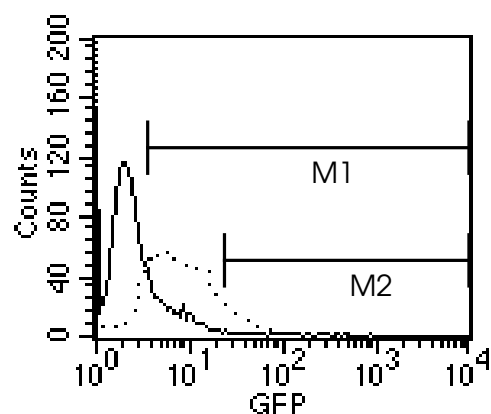
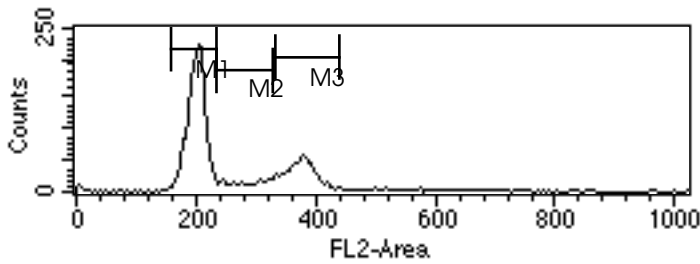
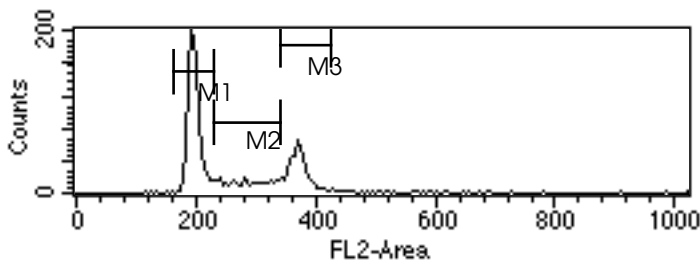


Abb. 4.2.1.1d: Zellzyklusverteilung von Fibroblasten, normalen uroepithelialen Zellen (NUZ) und der Tumorzelllinie VMCub1.

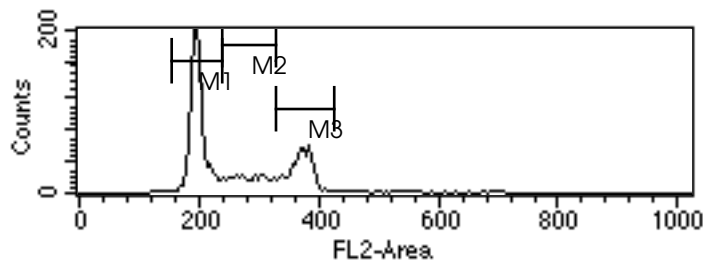
Die Zellen wurden mit Propidiumiodid gefärbt und durchflußzytometrisch gemessen. Die Daten wurden mittel CellQuest analysiert. M1= Prozentsatz aller gemessenen Zellen in der G1-Phase; M2= Prozentsatz aller gemessenen Zellen in der S-Phase; M3= Prozentsatz aller gemessenen Zellen in der G2/M-Phase, auf der y-Achse wird die Anzahl der Zellen abgetragen, auf der x-Achse der DNA-Gehalt



Fibroblasten:
M1=59,14%
M2=9,09%
M3=21,09%



NUZ:
M1=58,09%
M2=15,61%
M3=25,74%



VMCub1:
M1=56,56%
M2=17,09%
M3=25,21%

4.2.1.2 Charakterisierung der verwendeten Harnblasenkarzinomzelllinien

Zunächst wurden die verwendeten Harnblasenkarzinomzelllinien hinsichtlich der vorliegenden zellzyklusregulatorischen Defekte charakterisiert. Einen Überblick darüber gibt Tabelle 4.2.1.1. Die Mutationen im p53-Gen waren aus Vorarbeiten im Labor bekannt (Grimm, 1996) und wurden mittels SSCP und Sequenzierung verifiziert. Die vermutete p21-Mutation (HT1376) war aus der Literatur bekannt (Kawasaki, 1996). Weitere Daten wie p16-Deletion, Hypomethylierungsstatus und c-myc-Expression lagen aus früheren oder laufenden Arbeiten im Labor vor (Jürgens, 1996; Christoph, 1997; Florl, 2000). Drei Zelllinien (VMCub2, SD und SW1710) zeichnen sich durch homozygote Deletion von p16 aus. VMCub1 zeigte eine besonders starke Deregulation der c-myc-Expression, was sich ebenfalls auf den G1-S-Kontrollpunkt auswirkt (vgl. 1.2).

Die in Grimm (1996) erhobenen Rb-Expressionsdaten wurden durch Westernblot-Analyse abgesichert. Hierzu wurden zwei Antikörper ausgetestet. Der monoklonale Antikörper (IF-8, sc-102) zeigte eine Reihe unspezifischer Banden; allerdings war mittels dieses Antikörpers eine deutliche Doppelbande auf der zu erwartenden Höhe zu detektieren, die wahrscheinlich Rb in hyper- und hypophosphorylierter Form entsprechen. Mit dem polyklonalen Antikörper (C-15, sc-50) war nur eine einzige spezifische Bande detektierbar. In beiden Fällen konnten die Ergebnisse aus der Literatur (Horowitz, 1990; Grimm, 1996) bestätigt werden, daß in den Zelllinien 5637 und HT1376 ein kompletter Verlust des Rb-Proteins vorliegt (Abb. 4.2.1.2). In normalen uroepithelialen Zellen läßt sich nur sehr schwach Rb nachweisen. Weiter wurden Expressionsdaten auf Proteinebene für p53, E2F-1, p27 und p21 erhoben (Abb.4.2.1.2). Alle Zelllinien bis auf 5637 zeigen eine deutliche Akkumulation mutanten p53-Proteins, besonders ausgeprägt in der Zelllinie VMCub2. In 5637 ist kein p53-Protein detektierbar. Im Proteinlysat normal proliferierender Zellen war p53-Protein nicht nachweisbar. Wurden die normalen Zellen aber unter Entzug der spezifischen Wachstumsfaktoren EGF und Choleratoxin kultiviert, so war akkumuliertes p53 nachweisbar.

Der Antikörper E2F-1 KH 95 sc251 ist spezifisch gegen E2F-1 gerichtet und erkennt nicht E2F-2 bis E2F-5; es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß auch das fast gleichgroße E2F-like Protein (Accession: A45032) ebenfalls detektiert wurde, da das zur Immunreagenzherstellung verwendete Peptid in beiden Proteinen nahezu identisch ist.

Dabei ist zu bemerken, daß E2F-1 auf Westernblotgelen der meisten Gewebe als Doppelbande (Kusek, 2000) erscheint, obwohl in einigen Zelllinien (wie SW1710) nur eine Bande zu detektieren ist. Die Hauptmenge akkumulierten E2F-Proteins war in der unteren Bande zu erkennen, die wahrscheinlich unphosphoryliertem Protein entspricht. Im Westernblot zeigten besonders die Zelllinien VMCub1, VMCub2 und SD eine deutliche Akkumulation des Proteins.

Die Expression der Proteine p27 und p21 war in allen Zelllinien gleich stark. Die Proteinmengen von p27 und p21 waren höher als in Normalzellen, wo diese Proteine nicht detektierbar waren.

Zusätzlich wurden die Zellverdopplungszeiten (CDT) bestimmt. Die Zelllinien unterschieden sich nicht wesentlich in der Verdopplungszeit, sie lagen im normalen Bereich für Säugetierzelllinien zwischen 20 h und 43 h. Hingegen schwankten die Verdopplungszeiten bei normal proliferierenden Zellen sehr stark in Abhängigkeit von der Kultur, waren aber durchweg höher als die der Zelllinien. Sie lagen nach der ersten Passage zwischen 2 Tagen und einer Woche.

Die Transfektionseffizienzen wurden durchflußzytometrisch bestimmt. Hierbei gibt es sehr große Unterschiede. Während die Zelllinien VMCub1 und HT1376 eine sehr hohe Transfektionseffizienz von 84% bzw. 94% erreichten, lag diese bei VMCub2 bei nur 11%. Da in Primärkulturen zumeist eine sehr niedrige Transfektionseffizienz beschrieben wird, ist es beachtlich, daß in unseren Urothelkulturen wenigstens 5%, aber bis zu 40% Transfektionseffizienz erreicht wurden. Dies war allerdings nur unter Verwendung des Transfektionsreagenz FuGene möglich, da alle weiteren getesteten liposomalen Reagenzien einen starken cytotoxischen Effekt auf die Zellen hatten.

Tabelle 4.2.1.2: Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien.

Angaben zum Rb-Status stützen sich auf Westernblot-Daten, zu p16 auf Gen-Deletionsanalysen mittels PCR und zu c-myc auf Northernblot-Daten (+: überexprimiert). Hypomethylierung wurde anhand des Methylierungsstatus von LINE-1 Elementen im Genom bestimmt. Transfektionseffizienzen: unter Verwendung von FuGene, gerundete Mittelwerte zweier pEGFP C1-Transfektionen mit anschließender durchflußzytometrischer Messung, vgl. 4.2.1.3; TCC: Übergangszell-Karzinom

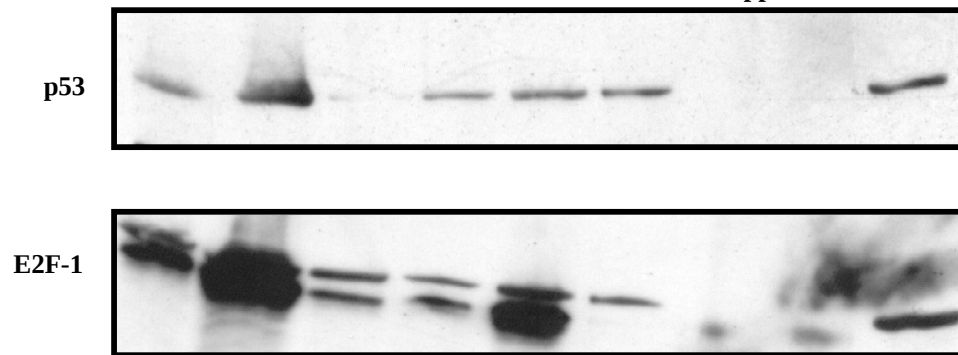
Zelllinie	Ur-sprung	p53-Mutation	p21	Rb	p16	c-myc	Hypo-meth.	CDT (h)	Transf. effizienz
VMCub1	TCC	Exon 5; Codon 175	+	+	+	++	mittel	20	84%
VMCub2	TCC	Exon5; Codon 158, 163	+	+	del	+	schwach	22	11%
5637	TCC	Exon 8, Codon 280	+	-	+	+	schwach	37	22%
HT1376	TCC	Exon 7; Codon 250	Mutation	-	+	+	stark	37	94%
SW1710	TCC	Exon 8; Codon 273	+	+	del	n.d.	schwach	43	9%
SD	TCC	Exon 4; Codon 116	+	+	del	n.d.	mittel	28	25%

4.2.1.3 Optimierung der Transfektionsbedingungen

Zunächst wurde die optimale Inkubationszeit für die Luziferasereaktion bestimmt. Diese lag bei 2 Minuten für die Messung der Firefly-Luziferase (*Photinus pyralis*=Glühwurm) Expression und im Sekundenbereich für Renilla-Luziferase (*sea pansy*=Seeanemone) (Abb. 4.2.1.3a). Entsprechend dieser Ergebnisse wurden alle Expressionsmessungen vorgenommen, d.h. Firefly-Luziferase wurde nach einer zweiminütigen Inkubation und Renilla-Luziferase sofort nach Zupipettieren des Substrats gemessen.

Um das optimale Transfektionsreagenz zu ermitteln, wurden die Transfektionsreagenzien Dosper, Dotap, SuperFect und FuGene zunächst nach Herstellerangaben in der Zelllinie 5637 getestet. Dazu wurde ein Vektor, der GFP (Green Fluorescent Protein) exprimiert, pEGFP C1, und LINE, ein Vektor, der Firefly-Luziferase unter der Kontrolle des

VmCub1 VmCub2 5637 HT1376 SD SW1710 UP17 UP17 UP17
+Suppl --EGF -EGF/CT



VmCub1 VmCub2 5637 HT1376 SD SW1710 UP17 UP20

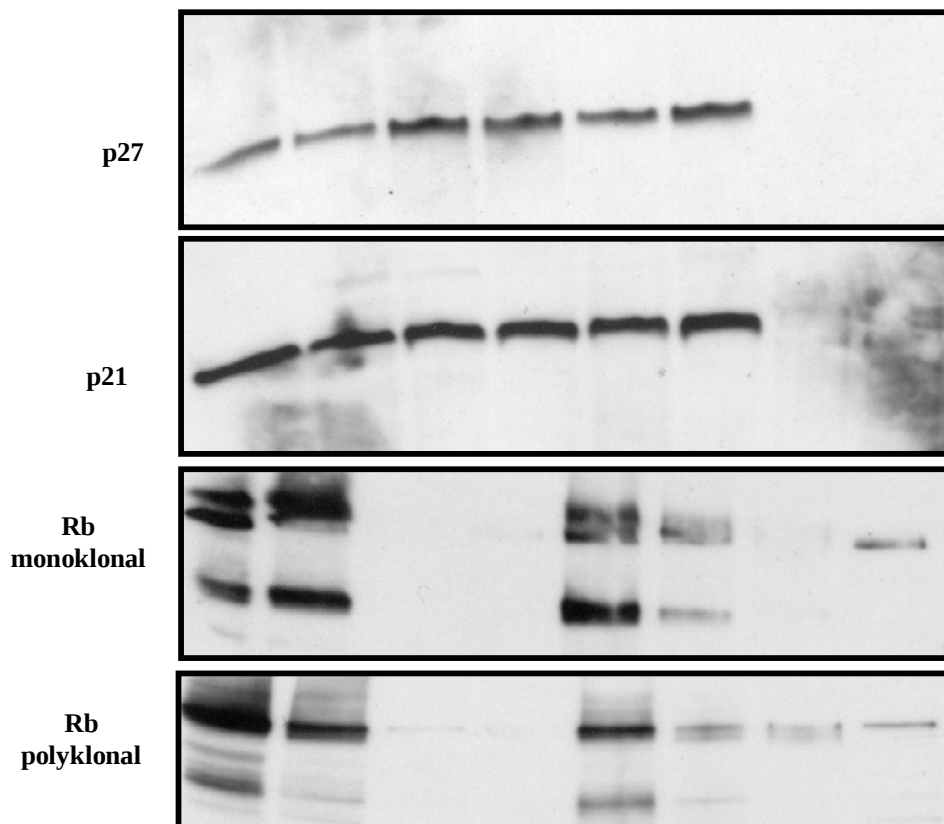


Abb. 4.2.1.2: Westernblot-Analyse zellzyklusregulierender Proteine in Zelllinien und Primärkulturen. UP17, UP20 bezeichnen Normalurothelkulturen zweier Patienten.

Abb.4.2.1.3: Optimierung der Luziferase-Substrat-menge und der Plasmidmenge

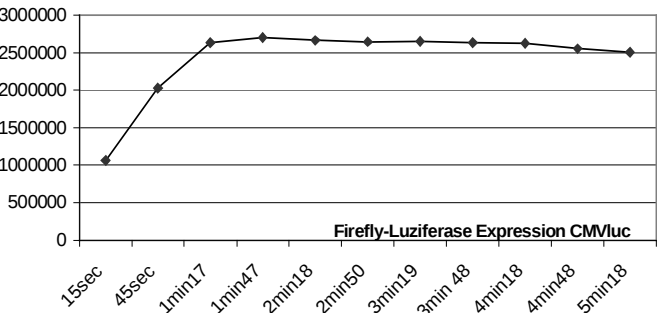


Abb. 4.2.1.3a
Absolute Firefly-Luziferase-Meßwerte nach Transfektion mit 0,5 µg/ml CMVluc in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Luziferase-Substrat.
Zelllinie: HT1376

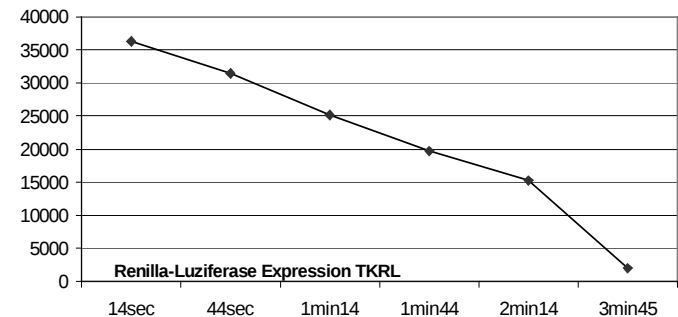


Abb. 4.2.1.3b
Absolute Renilla-Luziferase-Meßwerte bei Kotransfektion mit 0,075 µg/ml TKRL in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Renilla-Luziferase-Substrat nach vorheriger Firefly-Luziferase-Messung.
Zelllinie: HT1376

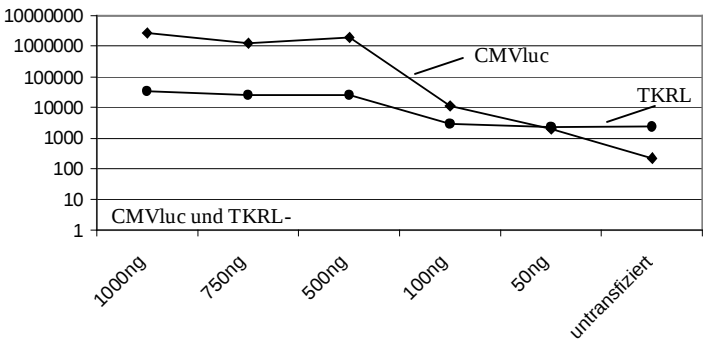


Abb. 4.2.1.3c: Absolute Firefly-Luziferase-Werte (durchgehende Linie, Messung nach 2 Minuten Inkubation) und Renilla-Luziferase-Meßwerte (gestrichelte Linie, Messung innerhalb von 10 Sekunden) in Abhängigkeit von der zur Transfektion eingesetzten Plasmid-Menge. Auf der x-Achse wird die eingesetzte Menge an Firefly-Luziferase-Plasmid. Auf 1 µg Firefly-Luziferase-Plasmid wurde 150 ng TKRL Plasmid eingesetzt.
Zelllinie: HT1376

Promotors des humanen Retrotransposons L1.2B exprimiert (vgl. 4.2.3), transfiziert. Bei pEGFP C1-transfizierten Zellen wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet (vgl. Abb. 4.2.1.1b). Zellen, die mit LINE transfiziert wurden, wurden kotransfiziert mit TKRL, einem Vektor, der Renilla-Luziferase unter der Kontrolle des konstitutiven HSV-Thymidin-Kinase Promotors exprimiert. Die Zellen wurden lysiert, und es wurde die Expressionshöhe mittels Luziferaseaktivitätsmessung bestimmt. In diesem dualen Messungsansatz wird zunächst die Expression von Firefly-Luziferase (LINE-Plasmid) gemessen, dann diese Reaktion abgestoppt und unter Zufügen von Koelenteraten-Luziferin die Expression von Renilla-Luziferase (TKRL-Plasmid) bestimmt. Die Kotransfektion von TKRL ermöglicht es, Schwankungen der Transfektionseffizienz infolge unterschiedlicher Zellzahlen, Passagen, Pipettierfehler oder Mediumkonditionen zu verfolgen, und die Firefly-Luziferase-Werte gemäß dieser Schwankungen zu adjustieren. Dabei erwiesen sich SuperFect und FuGene als die geeignetsten Reagenzien. Die TKRL-Werte (Transfektionseffizienz-Messung) lagen für Dosper und Dotap teilweise unter den Hintergrundwerten aus der Messung nicht-transfizierter Zellen; fluoreszenzmikroskopisch ließen sich nur vereinzelt leuchtende Zellen nachweisen. Um die Prozeduren für FuGene und SuperFect weiter zu optimieren, wurden die Plasmidmengen, das Verhältnis von Firefly-Plasmid zu Renilla-Plasmid, das Volumen des zur Vorbereitung verwendeten Mediums ohne Zusätze, die Mengen der Transfektionsreagenzien und die Inkubationszeiten variiert. Die optimalen Protokolle finden sich unter 3.7.1 und wurden im weiteren verwendet.

Tab. 4.2.1.3: Transfektion der Zelllinie 5637 mit LINE (Kotransfektion:TKRL):

	TKRL-Mittelwert	adjustierter LINE-Wert	Faktor-Unterschied (Firefly-Luziferase)
FuGene	60907 (+/- 15%)	181872 (+/-16%)	} 2,9
SuperFect	27001 (+/- 16%)	524240 (+/-14%)	
Dosper	niedrige Effizienzen, unterhalb des Hintergrundwertes		
Dotap			

Anschließend wurde die Transfektionsprozedur für normale Uroepithelialzellen (NUZ) optimiert (vgl. 4.2.1.1). SuperFect erwies sich als zytotoxisch. Darum wurden alle Transfektionen mit FuGene vorgenommen und die Transfektionseffizienzen mit diesem

Reagenz ermittelt. Hierzu wurden die Zelllinien bzw. Normalzellen mit dem Plasmid pEGFP C1 transfiziert und dann (vgl. 3.13.1) durchflußzytometrisch gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2.1.2 aufgelistet.

Im weiteren Verlauf sollten die Promotoren TK und LINE als Standardexpressiongrößen weiterverwendet werden. Darum mußte sichergestellt werden, daß diese Promotoren keine Zelllinien- oder Zelltyp- spezifischen Expressionschwankungen aufwiesen. Hierzu wurden die Expressionsstärken der Promotoren CMV, TK und LINE in verschiedenen Zelllinien und Primärzellen verglichen. Der virale Promotor CMV sollte keine zelltypspezifischen Schwankungen aufweisen. In allen untersuchten Zelllinien und Primärkulturen betrug die Aktivität des LINE-Promotors zwischen 8 und 15% des CMV-Promotors und die Aktivität des TK-Kinase-Promotor 0,8-2% des CMV-Promotors. Diese Differenzen waren nicht signifikant. Darum läßt sich eine Adjustierung der Transfektionseffizienzen bezüglich TKRL vornehmen und LINE ließ sich in weiteren Versuchen als Positivkontrolle und Bezugsgröße verwenden. Das Plasmid pT109luc trägt ebenfalls den HSV-Thymidin-Kinase Promotor und wird im weiteren Verlauf häufig als Bezugsgröße verwendet.

4.2.2 Tumorspezifische Deregulation E2F-abhängiger Promotoren und Auswirkung transgener p53-Expression auf den Zellzyklus von Tumor- und normalen Uroepithelialzellen

4.2.2.1 Aktivitäten E2F-abhängiger Promotoren in Karzinomzelllinien und normal proliferierenden uroepithelialen Zellen

In den folgenden Experimenten wurden mehrere E2F-abhängige Promotoren verwendet:

1. E2Fluc: Hierbei handelt es sich um einen Vektor, auf dem die Firefly-Luziferase Expression durch einen artifiziellen Promotor mit 3 E2F-Bindungsstellen kontrolliert wird (Magnaghi-Jaulin, 1998).
2. Rbluc: Hierbei handelt es sich um einen Vektor, auf dem die Firefly-Luziferase Expression durch einen ein 1,8 kb-Fragment des humanen Rb-Promotors kontrolliert wird. Der Promotor enthält eine E2F-Bindungsstelle und einige weitere mehr oder weniger gut charakterisierte Bindungsstellen (Greeger, 1989).
3. c-mycP2luc: Hierbei handelt es sich um einen Vektor, auf dem die Firefly-Luziferase Expression durch den humanen c-myc P2-Promotor kontrolliert wird. Der Promotor enthält wesentlich eine E2F-Bindungsstelle (Mautner, 1995).

4. -3565/+263 (=cycE_{max}): Hierbei handelt es sich um einen Vektor, auf dem die Firefly-Luziferase Expression durch das -3565/+263-Fragment des Maus-CyclinE-Promotors kontrolliert wird. Der Promotor enthält eine E2F-Bindungsstelle und einige weitere mehr oder weniger gut charakterisierte Bindungsstellen (Botz, 1996).
5. -94/+263 (=cycE_{min}): Hierbei handelt es sich um einen Vektor, auf dem die Firefly-Luziferase Expression durch das -94/+263-Fragment (Minimalpromotor) des Maus-CyclinE-Promotors kontrolliert wird. Der Promotor enthält wesentlich eine E2F-Bindungsstelle (Botz, 1996).
6. pT109luc: Hierbei handelt es sich um Firefly-Luziferase-Konstrukt, wobei die Expression durch den Thymidin-Kinase-Promotor kontrolliert wird.

Die Aktivitäten dieser Promotoren wurden im dualen Luziferase-Testsystem bestimmt (vgl. 4.2.1.3). Dazu wurden die 6 Zelllinien VM_{Cub}1, VM_{Cub}2, 5637, HT1376, SW1710 und SD sowie normale Uroepithelialzellen mit den einzelnen Firefly-Luziferasekonstrukten unter Kotransfektion von TKRL transfiziert und nach 48 Stunden die Expression gemessen. Als Bezugsstandard wurde pT109luc gewählt. In Tabelle 4.2.2.1 werden die Ergebnisse sowie die statistische Evaluierung zusammengefaßt; in Abbildung 4.2.2.1 wird eine graphische Übersicht gegeben.

Im allgemeinen entsprach die Aktivität der E2F-abhängigen Promotoren etwa der der Kontrolle pT109 luc. Der artifizielle E2F-Promotor und der c-myc P2 Promotor waren im allgemeinen stärker aktiv in den Zelllinien als in den Normalzellen, obwohl die Differenz nicht in allen Zelllinien eine Signifikanz erreichte (Tab. 4.2.2.1). Diese Promotoren waren deutlich am aktivsten in den Rb-defizienten Zelllinien HT1376 und 5637. Letztere zeigte auch als einzige Zelllinie eine signifikante Aktivitätserhöhung für den CyclinE-Promotor. Die Ergebnisse des CyclinE_{min}-Promotors wurden nicht in die statistische Berechnung mit einbezogen, da hier wesentlich weniger Versuchswiederholungen vorgenommen worden waren. Sie zeigen aber ebenso wie die Promotorfragmente E2F und c-mycP2 höhere Aktivitätsspiegel in Karzinomzellen als in Normalzellen. Da VM_{Cub}1 eine besonders starke Deregulation der c-myc-Expression zeigt (vgl. 4.2.1.2), war zu erwarten, daß der c-myc P2 Promotor hier besonders aktiv war (Grimm 1995). Die Aktivität des Rb-Promotors variierte von Zelllinie zu Zelllinie, ohne eine Korrelation zur Art des vorliegenden Defekts des Rb-Pathways zu zeigen. Während z.B. die Rb-Promotoraktivität in der Zelllinie HT1376 signifikant erniedrigt war, ergab sich in der zweiten Zelllinie mit Rb-Verlust, 5637, kein signifikanter Unterschied zu normalen Zellen. Insgesamt zeigten E2F-

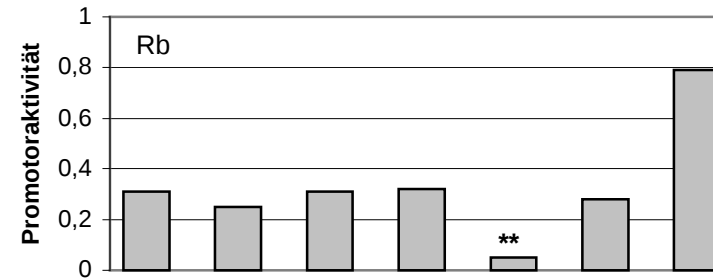
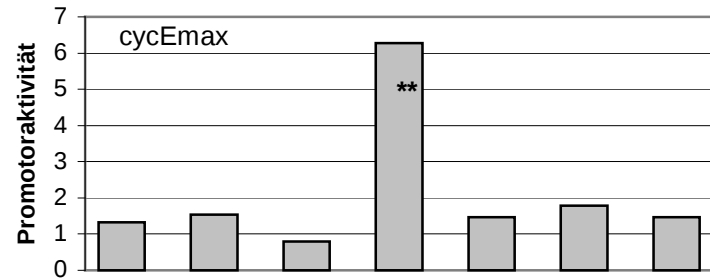
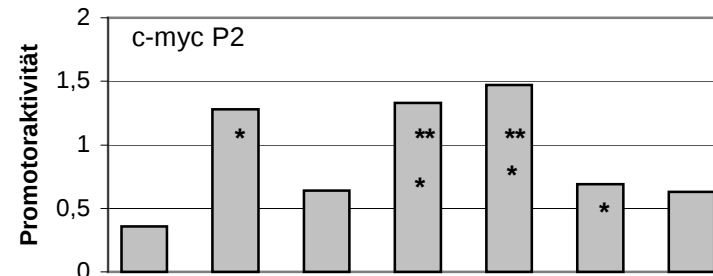
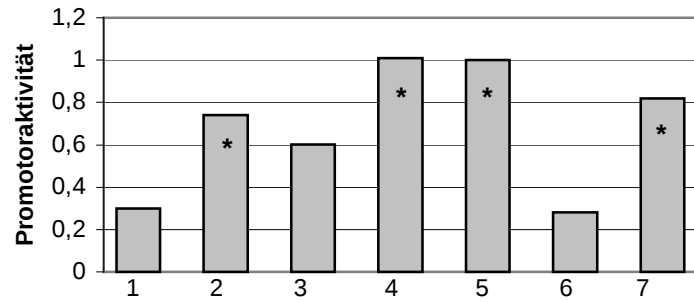


Abb. 4.2.2.1

Relative Promotoraktivitäten der in Tab. 4.2.2.1 detailliert angegebenen Ergebnissen

Arithmetische Mittelwerte der adjustierten Firefly-Luziferase-Expressionswerte nach Transfektion der angegebenen Promotoren.

Die Aktivität von pt109luc wurde als 1 gesetzt und die Firefly-Luziferase-Expression relativ dazu gesetzt.

1=NUZ (normale urotheliale Zellen); 2= VMCub1; 3=VMCub2; 4=5637; 5=HT1376; 6=SW1710; 7=SD

Sternchen markieren signifikante Abweichungen im Vergleich zu NUZ

**= Signifikanz im Mann Whitney-U-Test

*= Signifikanz im t-Test

Promotor		NUZ (1)	VMCub1 (2)	VMCub2 (3)	5637 (4)	HT1376 (5)	SW1710 (6)	SD (7)	LNCaP ()
E2F	adjustierter Mittelwert	0,30	0,74	0,60	1,01	1,00	0,28	0,82	3,80
	SD	0,23	0,02	0,23	0,15	0,07	0,07	0,08	0,40
c-mycP2	adjustierter Mittelwert	0,36	1,28	0,64	1,33	1,47	0,69	0,63	2,80
	SD	0,23	0,09	0,16	0,28	0,38	0,11	0,17	0,31
cycE _{max}	adjustierter Mittelwert	1,32	1,54	0,80	6,27	1,46	1,78	1,46	1,70
	SD	0,94	0,01	0,21	2,07	0,52	0,18	0,56	0,68
cycE _{min}	adjustierter Mittelwert	0,53	0,42	1,00	2,8	1,31	1,00	0,87	0,70
	SD	0,33	0,26	0,08	0,77	0,21	0,41	0,08	0,27
Rb	adjustierter Mittelwert	0,31	0,25	0,31	0,32	0,05	0,28	0,79	1,41
	SD	0,17	0,14	0,15	0,08	0,01	0,01	0,31	0,58

		VMCub1 (2)	VMCub2 (3)	5637 (4)	HT1376 (5)	SW1710 (6)	SD (7)
Mann-Whitney-U-Test (asymptotische Signifikanz, 2-seitig)	E2F	0,064	0,157	0,034	0,035	0,480	0,034
	c-mycP2	0,053	0,180	0,016	0,025	0,086	0,101
	cycEmax	0,355	0,480	0,021	0,724	0,289	0,480
	Rb	1,000	1,000	0,480	0,034	0,857	0,229
Kolmogorov-Smirnov-Test (asymptotische Signifikanz, 2-seitig)	E2F	0,139	0,982	0,065	0,065	0,785	0,065
	c-mycP2	0,115	0,180	0,023	0,047	0,116	0,181
	cycEmax	0,441	0,655	0,037	0,927	0,290	0,785
	Rb	0,927	0,927	0,785	0,065	0,785	0,290
T-Test (asymptotische Signifikanz, 2-seitig)	E2F	0,042	0,228	0,008	0,009	0,887	0,022
	c-mycP2	0,003	0,133	0,010	0,036	0,027	0,150
	cycEmax	0,713	0,415	0,015	0,835	0,463	0,844
	Rb	0,698	0,995	0,915	0,080	0,808	0,138

Tab. 4.2.2.1: Relative Aktivität E2F-abhängiger Promotoren in Harnblasenkarzinomzelllinien, LNCaP und normal proliferierenden Uroepithelialzellen (NUZ).

In der oberen Tabelle sind arithmetische Mittelwerte der adjustierten Firefly-Luziferase-Expressionswerte und Standardabweichungen (SD) aufgeführt. Alle Werte wurden auf pT109luc (als 1 gesetzt) bezogen. Die Ziffern nach der Zelllinie bezeichnen die Nummerierung der Zellen in der Grafik (Abb. 4.2.2.1). In der untenstehenden Tabelle werden asymptotische Signifikanzwerte bei Durchführung der Tests: Mann-Whitney-U, Kolmogorov-Smirnov, T-Test angegeben. Es wurde die Differenz zu Normalurothel-Werten getestet. Fett gedruckt und grau unterlegt sind signifikante Ergebnisse.

abhängige Promotoren in Zelllinien mit komplettem Rb-Verlust im Vergleich zu normalen proliferierenden Zellen eine besonders hohe Aktivität. In den übrigen Zelllinien war die Aktivität nur leicht höher. In der t-Test-Statistik, die normalverteilte Variablen voraussetzt, sind die E2Fluc-Promotoraktivitäten in den Zelllinien VMCub1, 5637, HT1376 und SD signifikant erhöht. Die c-myc P2-Promotoraktivität war in den Zelllinien VMCub1, 5637, HT1376 und SW1710 signifikant erhöht, und die Aktivität des Promotors cycEmaxluc war nur in der Zelllinie 5637 signifikant höher als in Normalzellen. Bei Anwendung anderer Tests, die keine Normalverteilung voraussetzen (vgl. statistischer Anhang), sind im wesentlichen die Promotoraktivitäten in den Zelllinien mit Rb-Verlust signifikant erhöht. Die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP zeigt für die Promotoren E2F und c-myc P2 eine besonders deutliche Aktivitätserhöhung, die aber aufgrund der wenigen Versuchswiederholungen (zwei unabhängige Versuche) nicht in die statistische Analyse mit einbezogen wurde.

4.2.2.2 Effekt von Serum- und Wachstumsfaktorentzug auf Zellwachstum und auf Promotoraktivitäten

Nach Weglassen von EGF und Choleratoxin aus dem Medium normaler Uroepithelialzellen wurde die BrdU-Inkorporation innerhalb von 48 h gemessen. Diese nahm signifikant ab (Tab.4.2.1.4 und Abb. 4.2.1.4). Der Gesamtgehalt an Protein nahm ebenfalls ab, wenn auch nicht so drastisch, während die Apoptoserate unverändert blieb. Dagegen war in den Zelllinien bei Entzug von Serum (von 15% auf 0,5%) die BrdU-Inkorporationsrate nicht wesentlich vermindert; die Werte bewegten sich zwischen 91% (HT1376) und 114% (VMCub2). Die Proteinmenge nahm in ähnlicher Weise ab wie bei Normalzellen, die Werte bewegten sich zwischen 56% (VMCub1) und 72% (SW1710) in den Zelllinien und lagen bei 77% für Normalzellen. Die Apoptoserate war in allen getesteten Zelllinien signifikant erhöht (Tab. 4.2.2.2). Somit reagieren die normalen Uroepithelialzellen auf Wachstumsfaktorentzug mit einem Proliferationsstop, gehen aber nicht in die Apoptose, während die Tumorzelllinien auf Serumentzug unvermindert proliferieren, aber mit erhöhter Apoptose reagierten.

Die E2F-abhängigen Promotoren reagieren auf Serumreduktion sehr unterschiedlich. In allen Tumorzellen außer SD waren keine starken Aktivitätsverminderungen infolge von Serumentzug zu messen (vgl. Tab. 4.2.2.2, Abb. 4.2.2.2). Allerdings reagierte die Zelllinie SD mit erheblichen Aktivitätserhöhungen (E2F luc, CyclinEmax luc, CyclinEmin luc,

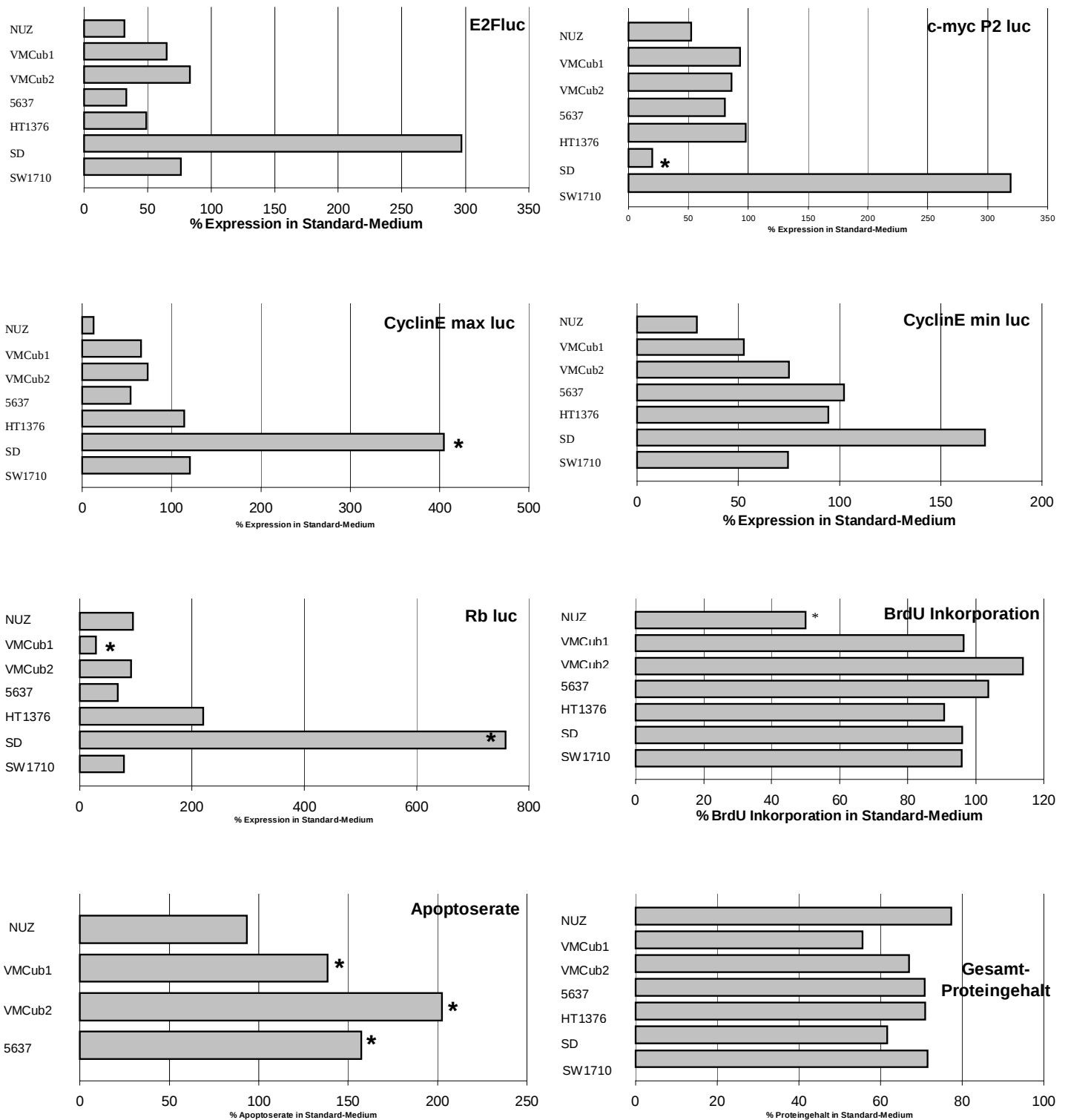


Abb. 4.2.2.2 Relative Aktivitäten E2F-abhängiger Promotoren
Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 4.2.2.2. Abgetragen sind Meßwerte (Expression, Proteingehalt, BrdU-Inkorporation und Apoptoserate) in reduziertem Medium (0,5% FCS bzw. Medium ohne Zusatz von CT/Choleratoxin) in Prozent der Meßwerte in komplettem Kulturmedium. Sternchen markieren signifikante Differenzen (t-Test) im Vergleich zu den Werten komplettem Kulturmedium.

Protein- gehalt	adj. Wert (15%)	276,14	0,147	236,58	2,565	209,47	7,292	240,76	0,917	244,57	1,106	164,75	2,685	171,6	2,005
	SD	37,18		53,14		6,01		77,34		75,19		26,08		23,51	
	adj. Wert (0,5%)	213,49		131,61		140,22		170,53		173,42		101,5		122,73	
	SD	42,32		22,93		12,01		75,8		51,21		20,72		25,21	

Tab. 4.2.2.2: Relative Aktivitäten E2F-abhängiger Promotoren in Medium mit und ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren (0,5% FCS-Zusatz für Zelllinien und unter Entzug von EGF/CT für Normalzellen).

Promotoraktivitäten

werden (relativ zu pT109luc=1) angegeben. Dargestellt sind arithmetische Mittel adjustierter Mittelwerte aus unabhängigen Messungen. Es werden außerdem kritische Werte (t') im Vergleich der Expressionswerte in kompletten

und reduzierten Medium dargestellt (Erläuterungen im Text).

Rb luc) um einen Faktor 1,7 bis 7,7 und für den Promotor c-mycP2 luc mit einem erheblichen Aktivitätsverlust (vgl. Abb. 4.2.2.2) um einen Faktor 5. Die Normalzellen hingegen reagieren auf Wachstumsfaktorentzug mit einer Aktivitätsverminderung um 48-87%; lediglich der Rb-Promotor zeigt keine Aktivitätsverminderung. Diese Verminderungen erreichen keine Signifikanz, was wahrscheinlich auf die geringe Anzahl von Wiederholungen zurückzuführen ist (2 unabhängige Experimente mit jeweils Vierfachbestimmungen).

4.2.2.3 Auswirkung transgener Wildtyp-p53 Expression in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen Uroepithelialzellen: Langfristige Wirkung

Zur Expression von p53 in Harnblasenkarzinomzelllinien wurde ein episomales System verwendet. Dies begünstigte, daß die übertragenen Plasmide nach Transfektion innerhalb des Beobachtungszeitraums von maximal drei Wochen in den transfizierten Zellen verblieben. Als Episom wurde der Vektor pREP7 ausgewählt. Dieser trägt EBNA-1 und einen davon abhängigen "Replikationsorigin" und läßt sich über eine Hygromycinresistenz selektieren. Nach den Ergebnissen aus den transienten Transfektionsversuchen wurde der Promotor des Konstrukts E2Fluc zur tumorspezifischen Reexpression ausgewählt. Neben dem c-mycP2-Promotor zeigte er den stärksten Unterschied zwischen normal proliferierenden Zellen und Tumorzelllinien. Das Ausgangsplasmid enthält den retroviralen RSV-Promotor, der in den verwendeten Zelllinien etwa gleich starke Aktivität wie der CMV-Promotor besitzt. Zusätzlich wurde der humane LINE-Promotor ausgewählt. Dieser ist ungefähr um einen Faktor 10 schwächer aktiv als der virale RSV-Promotor, während der E2F-Promotor etwa um einen Faktor 100 schwächer aktiv ist als der virale Promotor (vgl. 4.2.2.1 und 4.2.3.2). Der E2F-Promotor und der LINE-Promotor wurden ebenfalls in pREP7 kloniert und der bereits im Episom vorhandene RSV-Promotor dabei entfernt. Die Konstrukte, die nur einen Promotor trugen, aber keine cDNA enthielten, dienten im folgenden als Kontrollen. In jedes der drei Konstrukte wurde dann Wildtyp-p53-cDNA hinter die einzelnen Promotoren kloniert, so daß insgesamt 6 Konstrukte vorlagen: drei episomale Vektoren mit Promotor ohne Gen und drei mit Promotor und p53-cDNA. Einen Überblick über diese Konstrukte gibt Abbildung 4.2.2.3a. Es war bereits gezeigt worden, daß Reexpression von Wildtyp-p53 von einem sehr starken Promotor wie dem viralen CMV-Promotor sehr schnell und effizient zu einer Apoptose in Harnblasenkarzinomzelllinien führt (Makri, 1995; 1998). Um festzustellen, ob E2F-abhängige Promotoren wie der artifizielle E2F-Promotor aus E2Fluc stark genug sind,

einen ähnlichen Effekt auszulösen, wurde die Wirkung der sechs Konstrukte auf die vier Zelllinien VMcub1, VMcub2, SW1710, 5637 ermittelt. Nach Transfektion wurde auf die Hygromycin-Resistenz des Vektors selektiert und stabile Klone heranwachsen gelassen. Bei allen Zelllinien zeigte sich eine massiv verringerte Anzahl stabiler Klone in denjenigen Schalen, die mit p53-haltigen Konstrukten transfiziert worden waren (Abb.4.2.2.3b). Die nachfolgende Tabelle gibt arithmetische Mittel der Zahl der isolierten stabilen Zellklone aus jeweils drei Versuchen an.

Tabelle 4.2.2.3a: Wirkung von p53-haltigen episomalen Konstrukten auf Harnblasenkarzinomzelllinien.

Arithmetisches Mittel der Anzahl stabiler Zellklone aus jeweils drei unabhängigen Transfektionen. Die Zellen wurden mit den in der obersten Zeile angegebenen Konstrukten in 10 cm-Schalen transfiziert und drei Wochen mit Hygromycin selektiert. Nach Fixieren und Giemsa-Färbung wurden die Klone ausgezählt.

Zelllinie	RSV	RSV-p53	LINE	LINE-p53	E2F	E2F-p53
VMcub1	konfluent	5	konfluent	4	konfluent	6
VMcub2	44	3	38	1	39	2
SW1710	11	0	15	6	12	2
5637	konfluent	0	nahezu konfluent	5	konfluent	6

Die Expression von p53 von starken Promotoren führte ebenso wie die von einem E2F-Promotor kontrollierte Expression zu einer vergleichbaren Verminderung der Zahl stabiler Klone. Um sicherzustellen, daß diese verminderte Zahl stabiler Klone tatsächlich auf eine Expression des eingeführten p53 zurückzuführen war, wurde hinter den RSV-Promotor und den LINE-Promotor jeweils mutierte, funktional inaktive p53-cDNA (273 R>H; Wagner, 1991) kloniert. Diese Konstrukte wurden in die Zelllinie VMcub2 transfiziert. Beide führten zu annähernd derselben Anzahl stabiler Klone wie das Konstrukt, das ausschließlich den Promotor enthielt (Beispiel in Abb. 4.2.2.3b).

In fast allen Ansätzen gab es einzelne überlebende Klone. Da sie sich selektieren lassen, sind diese Zellen transfiziert worden und enthalten zumindest das Hygromycin-

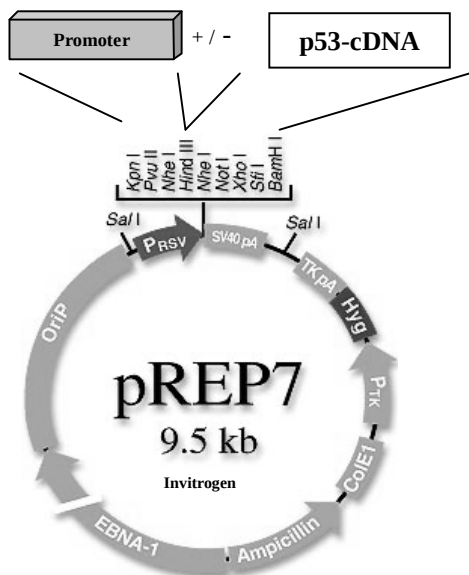


Abb. 4.2.2.3a: Episomale Konstrukte

Promotoren:

- RSV (enthalten im pRep7-Plasmid)
- LINE (RSV wurde entfernt und durch LINE (-193/+661) ersetzt)
- E2F (RSV wurde entfernt und durch E2F ersetzt)

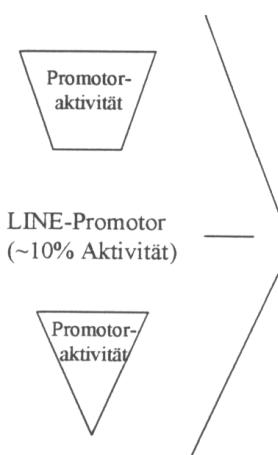
p53-Konstrukte:

In die obigen Promotor-Konstrukte wurde HindIII/BamHI p53cDNA aus kloniert

p53-Mutationskonstrukte:

In die Promotor-Konstrukte RSV Rep7 und LINE Rep7 wurden mutiertes p53 aus kloniert

RSV-Promotor
(100% Aktivität)



E2F-Promotor
(~1% Aktivität)

```

agcttaacggtgacacgctccctggattggcagccagactgcctccgggtcactg
ccatggaggagccgagtcagatcctagcgtcgagccccctctgagtcaggaaac
Exon4
attttcagacctatggaaactacttcctgaaacaacgttctgtcccccttgcctcca
inEx4up
agcaatggatgattgatgctgtccccggacgatattgaacaatggtcactgaagac
ccggggccagatgaagctcccagaatgccagaggctgtccccctgtggccccctg
caccagcagctctacaccggcgccccctgcaccagccccctctgtggccccctgtc
atcttctgtccctcccagaaacctaccagggcagctacgggttcgtctgggtcttct
inEx4down Exon5
tgcaattctggagacccaagtctgtgacttgacgtactccccctgccctaacaagat
gttttgccagctagccaagacctgccctgtgcagctgtgggtgattccacaccccc
gcccggcaccgcgtccgcgcatgcccactctacaagcagtcacagcacatgac
Insertion zw. Ex 5 u. 6
ggagggttgtaggcgctgccccaccatgagcgtgtctcaGATAGCGAT
Exon6 p53cDNAup
Gggtctggccccctctcagcaictatccgagtggaaggaaatttgcgtgtgagta
tctagacgatcgaacacctttcgacatagtgtgtgtgcccctatgagccgcctgag
Exon7
gttggctctgactgtaccaccatccactacggctacatgtgtaacagttcctgcatgg
Exon8
gcggcatgaaccggaggcccatcctcaccatcatcacactggaagactccagtggt
273: cgt>tgt
aatctactcggccgaacagctttaggtgcgtgtttgtgcctgtcctgggagagac
cggcgcacagaggaagagaatctccgaaagggaggcctcaccacgagct
p53cDNAdown Exon9
gccccaggagcactaagcgagcactgcccaacaacaccagctcctctcccca
gccaagaagaaccactggatggagaatatttcacccctcagatccgtggcggtg
agcgttccgaatgttccgagagctgaatgaggccttggaactcaaggatccccag
gttgggaaggagccaggggggagcaggtcactccagccacctgagtcacaaa
agggctcagctctacctccgccataaaaaactcatgttcaagacagccgggcctgact
cagactgacattctccacttctgttcccttg

```

Resistenzgen. Es stellt sich also die Frage, warum sie die p53-Expression überlebt haben. Um diese Frage zu beantworten, wurde VMCub1 mit den p53-haltigen Konstrukten oder den entsprechenden Promotorkontrollen transfiziert und nachfolgend mit Hygromycin stabile Klone isoliert. Überlebende stabile Klone wurden expandiert und sowohl DNA als auch Protein isoliert. Zunächst wurde mit einem PCR-Test überprüft, ob das auf dem Episom eingeführte p53-Gen noch in den Zellen vorhanden war. Hierzu wurden PCRs mit drei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt (vgl. 3.2). Das erste Primerpaar (inEx4-up/-down) liegt innerhalb von Exon 4. Damit werden sowohl Plasmid-p53-cDNA als auch genomische p53-Sequenzen amplifiziert. Das zweite Primerpaar (ex7aus-up/-down) liegt zum Teil im Intron und amplifiziert somit nur genomische p53 DNA. Das dritte Primerpaar (p53cDNA-up/-down) liegt über Exongrenzen hinweg, und amplifiziert daher nur p53 cDNA. Zusätzlich liegt allerdings der Primer p53cDNA-up über der Exongrenze 5/6, die im Plasmid eine Insertion von 9 Basenpaaren trägt (vgl. auch Abb. 4.2.2.3a). Daher kann zelluläre p53-cDNA nicht amplifiziert werden. Als Kontrolle dienten zum einen die Plasmide selbst, zum anderen DNA aus untransfizierten Zellen. DNA aus isolierten stabilen Klonen und Kontroll-DNA wurden in diese drei verschiedenen PCRs eingesetzt. Hierbei zeigte sich, daß ungefähr 50% der Klone kein eingeführtes p53 mehr trugen, obwohl sie offensichtlich die Hygromycinresistenz noch enthielten (da sie kontinuierlich unter Hygromycin kultiviert worden waren). Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4.2.2.3b aufgelistet.

Tabelle 4.2.2.3b: Resultat des PCR-Tests zum Nachweis von p53 cDNA in transfizierten Zellen

"+": Amplifikation mit den angegebenen Primern

"-": keine Amplifikation mit den angegebenen Primern

Klonbezeichnung/ Kontrolle	PCR 1 inEx4-up/ -down	PCR 2 ex7aus-up/-down	PCR 3 p53cDNA-up/-down
RSV, LINE, E2F	-	-	-
RSV-,LINE-,E2F-p53	+	-	+
untransfizierte Zellen	+	+	-
RSV: Klon 1-6	+	+	-
RSV-p53, Klon 1	+	+	-
RSV-p53, Klon 2	+	+	-

RSV-p53, Klon 3	+	+	-
RSV-p53, Klon 4	+	+	+
RSV-p53, Klon 5	+	+	+
RSV-p53, Klon 6	+	+	+
LINE: Klon 1-6	+	+	-
LINE-p53, Klon 1	+	+	+
LINE-p53, Klon 2	+	+	+
LINE-p53, Klon 3	+	+	+
LINE-p53, Klon 4	+	+	+
LINE-p53, Klon 5	+	+	-
LINE-p53, Klon 6	+	+	-
E2F: Klone 1-2	+	+	-
E2F-p53, Klon 1	+	+	-
E2F-p53, Klon 2	+	+	-
E2F-p53, Klon 3	+	+	+

Nun stellte sich die Frage, warum die einzelnen Zellklone, die offensichtlich p53-Plasmid cDNA enthielten, überlebten. Mehrere dieser Klone wurden in einer Westernblotanalyse auf p53-Expression hin getestet. Im Vergleich zu den Proteinlysaten von Zellen, die nur mit der Promotor-Kontrolle transfiziert worden waren, konnte in keiner Probe eine signifikant erhöhte p53-Expression gezeigt werden (Abb.4.2.2.3c obere Reihe). Ebenso ist in keiner Probe eine signifikant erhöhte Expression des direkten p53-Targets p21 festzustellen (Abb. 4.2.2.3c untere Reihe).

4.2.2.4 Auswirkung transgener Wildtyp-p53 Expression in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen Uroepithelialzellen: Kurzfristige Wirkung

Nachdem die Langzeitwirkung transgener p53-Expression untersucht worden war (vgl. 4.2.2.3), sollten nun die Auswirkungen transgener p53-Expression kurz nach Transfektion bestimmt werden. Hierzu wurden Zellzahl, Proteingehalt und Apoptose untersucht. Es konnte davon ausgegangen werden, daß für die Zelllinien HT1376 und VMCub1 weit mehr als die Hälfte der Zellen transfiziert waren (vgl. Tab. 4.2.1.2). Bei Normalzellen konnte von einer Transfektionseffizienz zwischen 5% und 40% ausgegangen werden.

Zunächst wurde VMCub1 mit den sechs episomalen Konstrukten transfiziert und nach 12 h, 24 h und 48 h ohne Hygromycinselektion Proteinlysate hergestellt. Die p53 Protein-

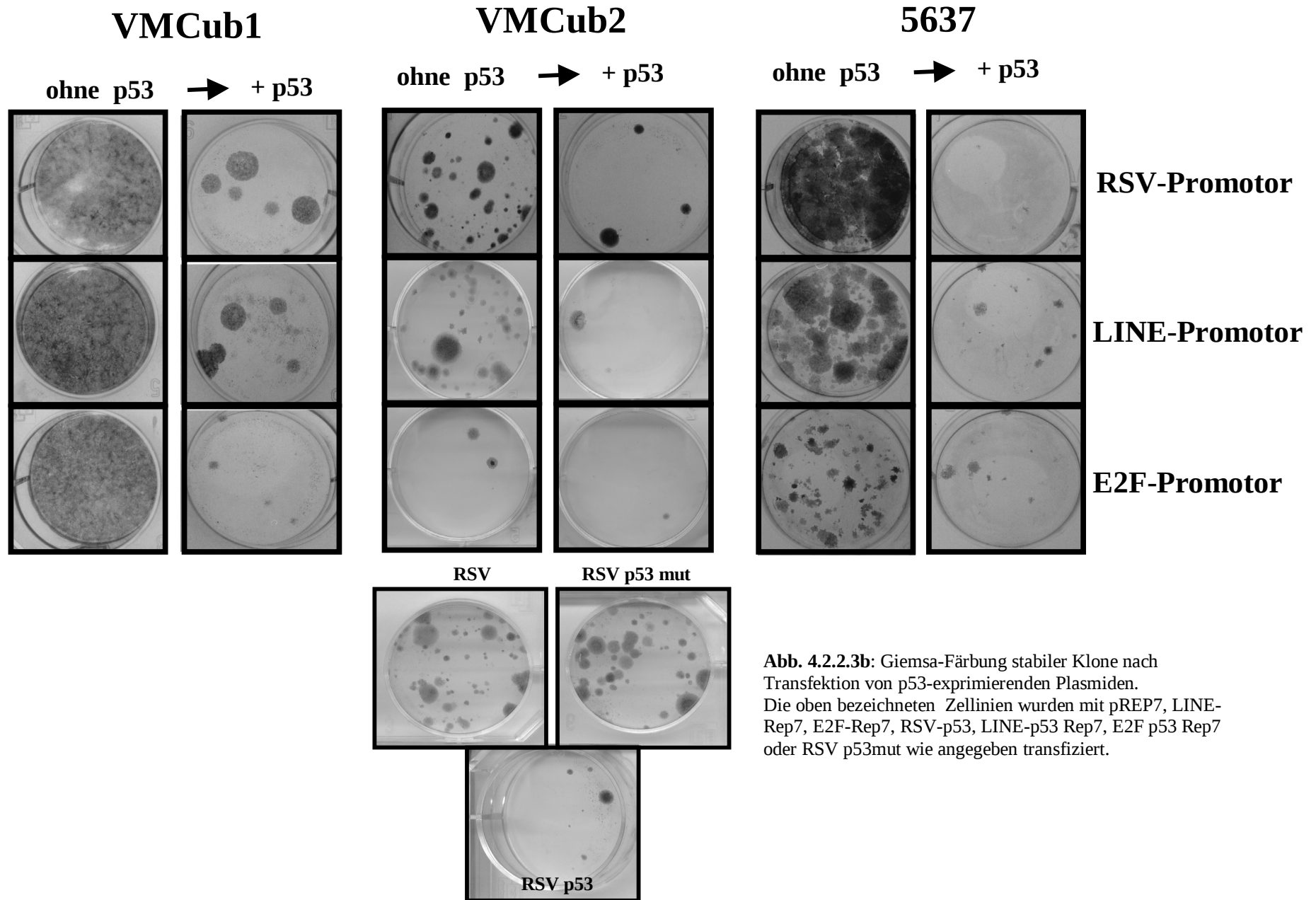


Abb. 4.2.2.3b: Giemsa-Färbung stabiler Klone nach Transfektion von p53-exprimierenden Plasmiden. Die oben bezeichneten Zelllinien wurden mit pREP7, LINE-Rep7, E2F-Rep7, RSV-p53, LINE-p53 Rep7, E2F p53 Rep7 oder RSV p53mut wie angegeben transfiziert.

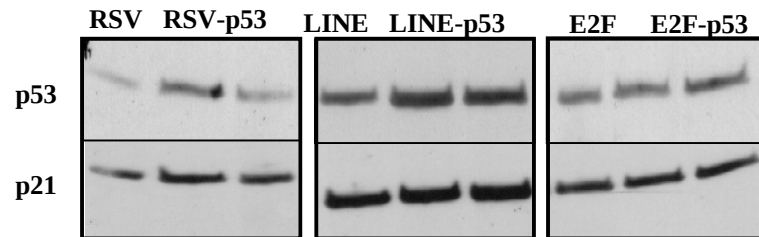


Abb. 4.2.2.3c Westernblotanalyse stabiler Klone

Die Zelllinie VMCub1 wurde mit den in der obersten Reihe bezeichneten Konstrukten transfiziert. Nachdem stabile Klone isoliert und expandiert worden waren, wurde von den einzelnen Klonen ein Proteinlysate hergestellt und ein Westernblot mit Antikörpern gegen p53 (oben) oder p21 (unten) durchgeführt.

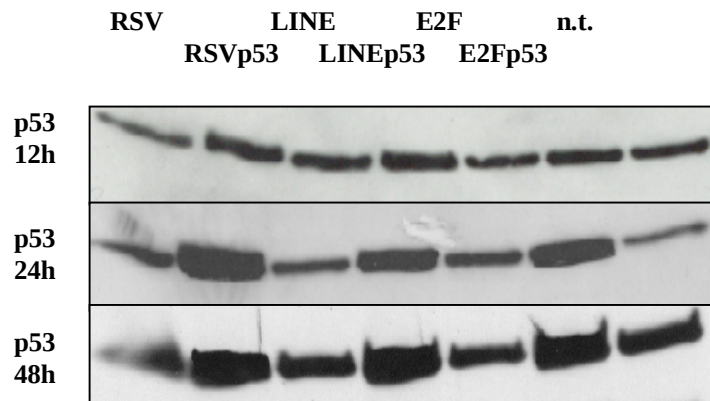


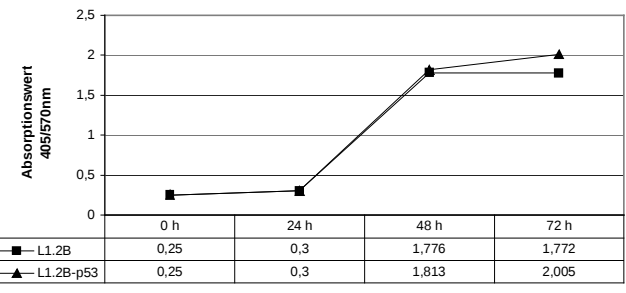
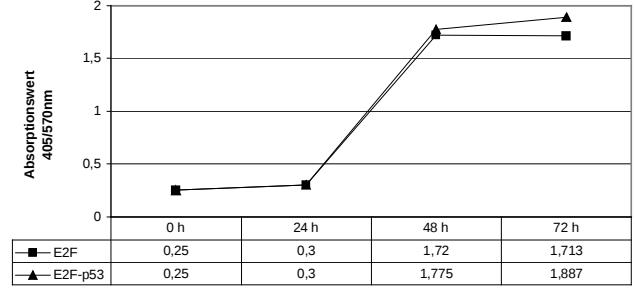
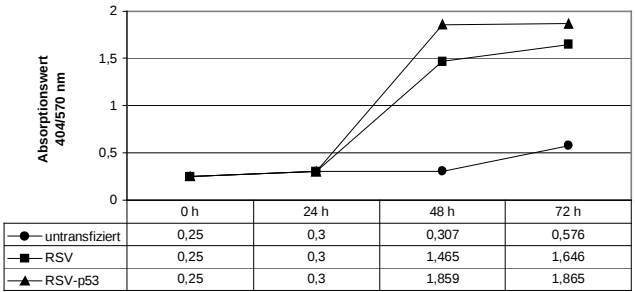
Abb. 4.2.2.4a

Westernblotanalyse von mit p53 exprimierenden Konstrukten transfizierter Zellen

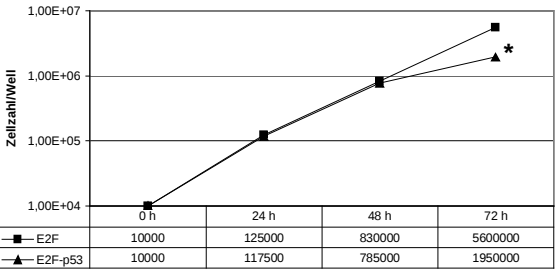
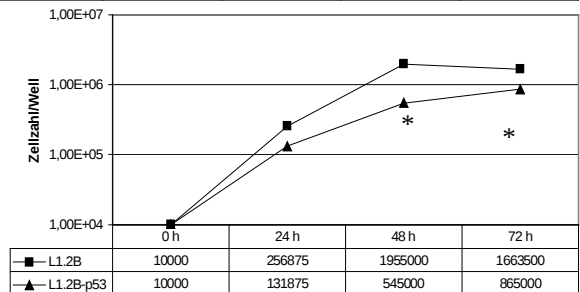
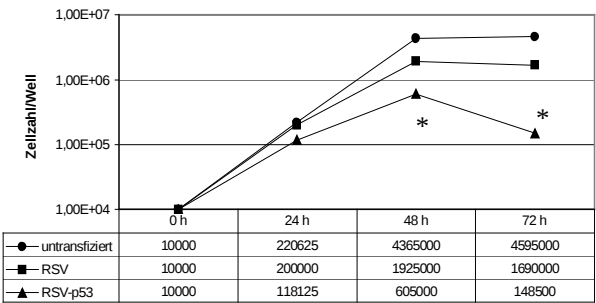
VMCub1 wurde mit den in der obersten Reihe angegebenen episomalen Konstrukten transfiziert, und es wurden nach 12 h, 24 h und 48 h ohne Hygromycinselektion Proteinlysate hergestellt. Die p53 Protein-Expression wurde dann in einem Westernblot untersucht.

n.t.= nicht transfiziert

Apoptose



Zellzahl



Proteingehalt

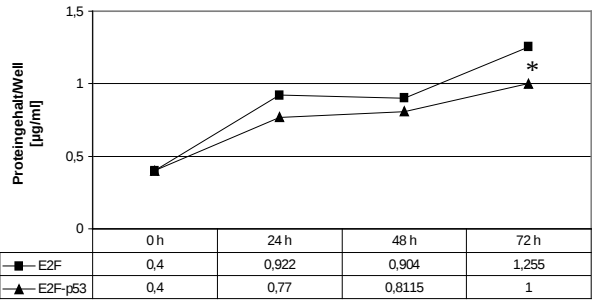
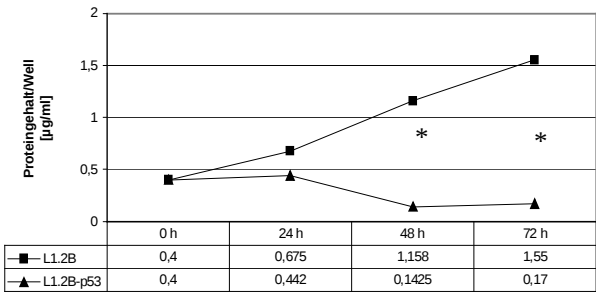
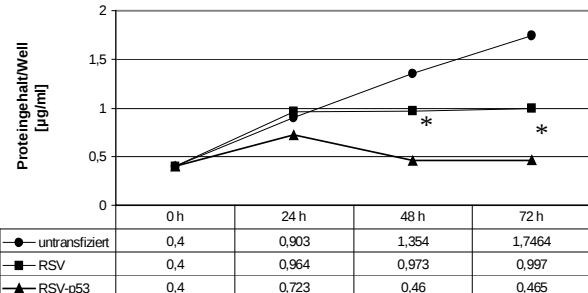


Abb. 4.2.2.4b: Zellzahl, Proteingehalt und Apoptoserate nach Transfektion mit den p53 tragenden Episomen und Promotorkontrollen
Die Zelllinie VMcub1 wurde mit den in den Graphen bezeichneten Plasmiden transfiziert und nach 24h, 48h und 72h wurden Zellzahl, Proteingehalt und Apoptose (ELISA Test) bestimmt.

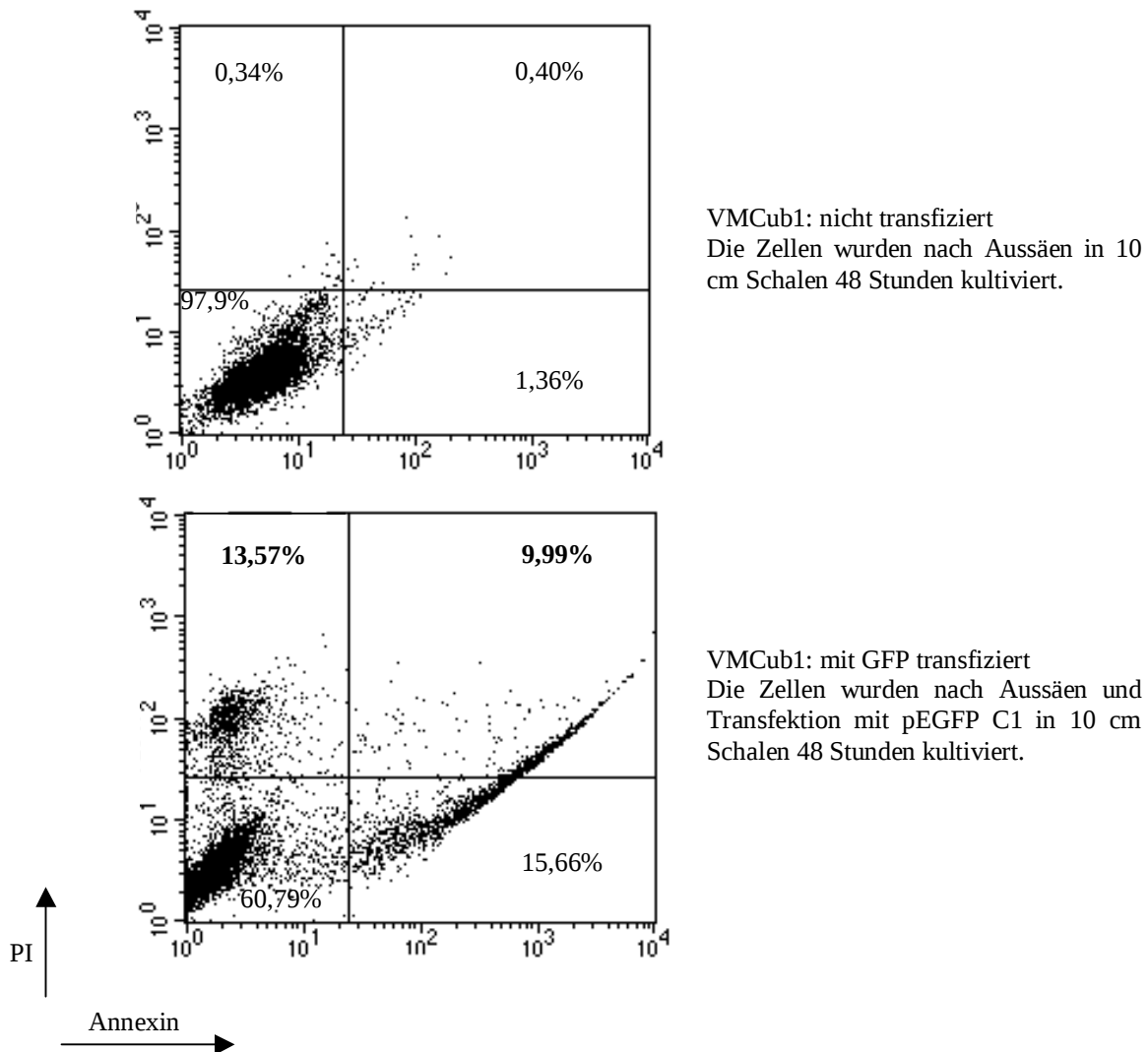


Abb. 4.2.2.4c: Apoptose-Test mittels Annexin V

VMcub1-Zellen wurden mit pEGFP C1 transfiziert und nach 48 h durchflußzytometrisch auf Apoptose untersucht. Die Zahlen in den Quadranten geben den Prozentsatz bezüglich aller gemessenen Zellen dieser Probe an, die auf diesen Quadranten entfallen. Auf der x-Achse ist die Annexin-Detektion, auf der y-Achse die Propidiumiodid (PI)-Detektion abgetragen.

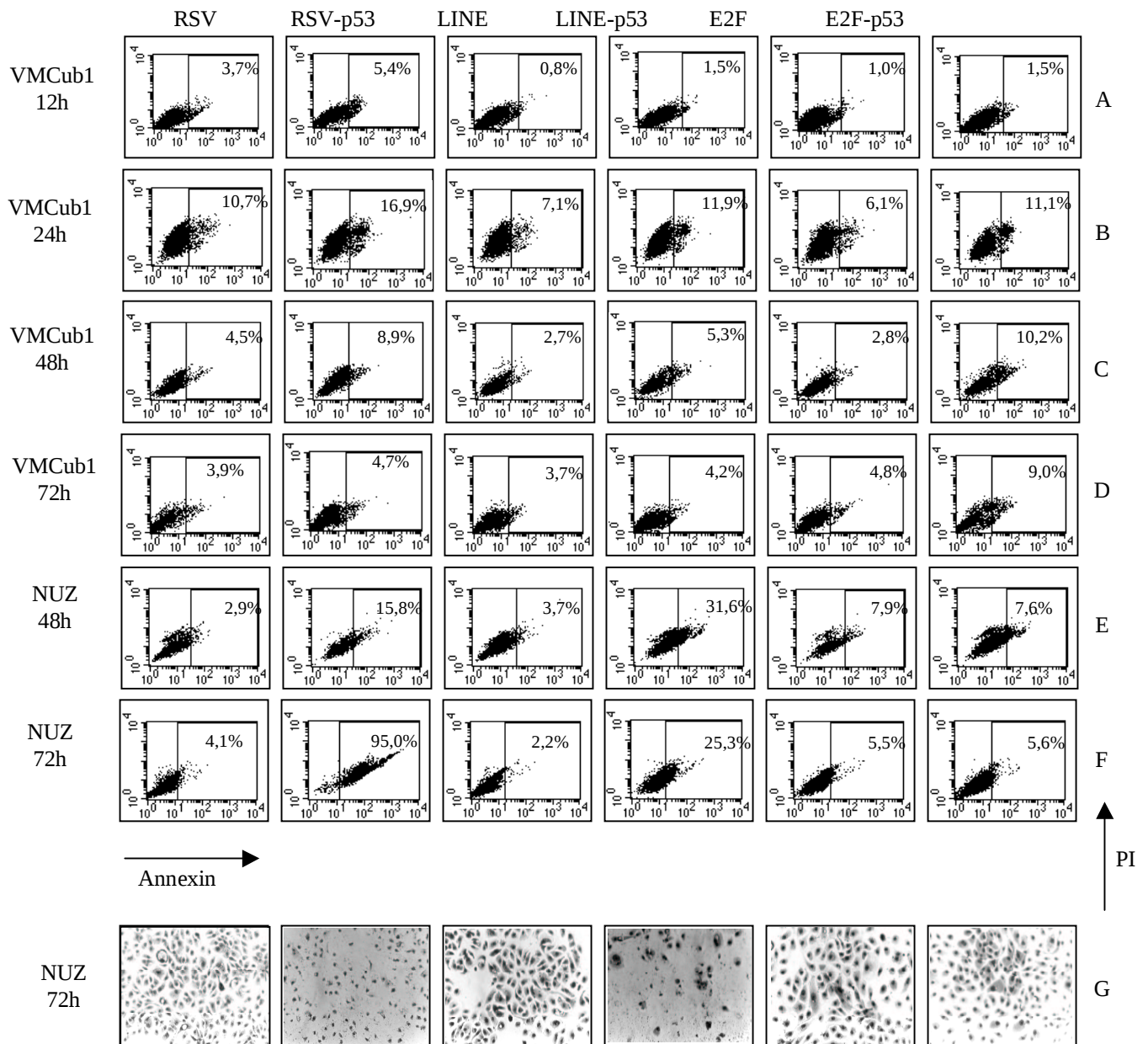
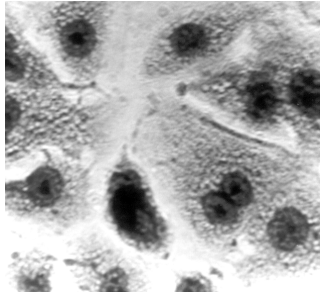
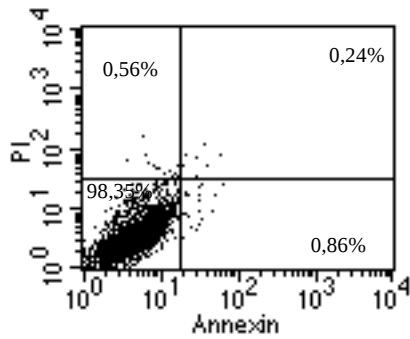
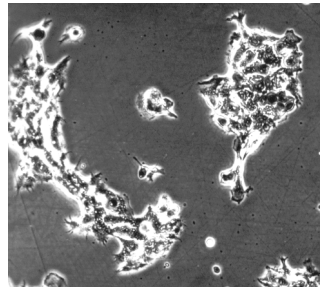
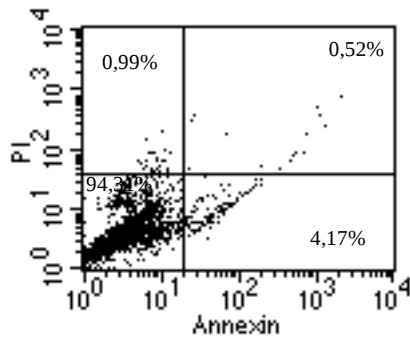


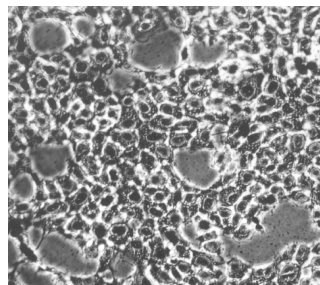
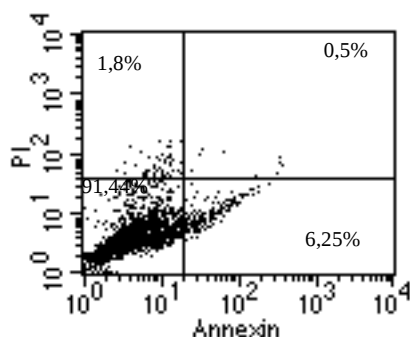
Abb. 4.2.2.4d: Apoptose in VMCub1 und NUZ nach Transfektion mit verschiedenen episomalen Konstrukten. Nach Transfektion mit den in der ersten Reihe angegebenen Konstrukten wurden VMCub1 (A-D) oder NUZ (E-G) 12 h, 24 h, 48 h oder 72 h kultiviert und entweder mikroskopisch betrachtet (G) oder auf Apoptose mittels eines Annexin-V-Tests (x-Achse) hin untersucht. Die vertikale Linie in jedem einzelnen Bild markiert den Schwellenwert, der durch untransfizierte Zellen aus jedem Experiment ermittelt wurde. Er ist so gelegt, weniger als 1% der untransfizierten Zellen Annexin-positiv waren. Die Prozentangabe gibt den Prozentsatz der Zellen an, die Annexin-positiv waren.



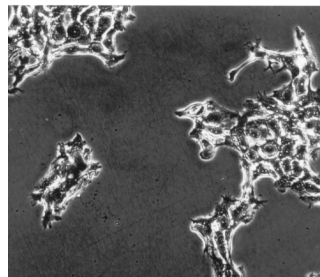
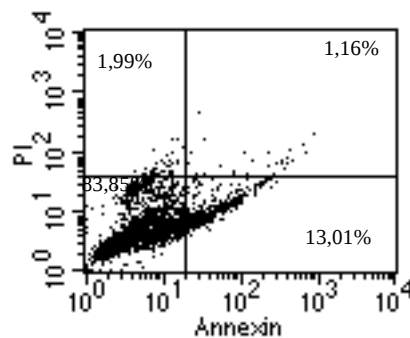
VMCub1:
unbehandelt
Vergrößerung: 250 x



VMCub1:
3 h mit Mitomycin behandelt
Vergrößerung: 100 x



VMCub1:
12 h unter Zugabe von
C-11-Antikörper inkubiert
Vergrößerung: 100 x



VMCub1:
3 h mit Camptothecin behandelt
Vergrößerung: 100 x

Abb. 4.2.2.4e: Annexin V-Test und mikroskopische Photographie von VMCub1-Zellen, die mit Mitomycin (0,1 mM; 3 h), CH11-Antikörper (150 ng/ml; 12 h) oder Camptothecin (4 µg/ml; 3 h) behandelt worden waren.

Expression wurde dann in einem Westernblot untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die p53-Expression sowohl 24 h als auch 48 h nach Transfektion in allen Proben, die mit p53-tragenden Konstrukten transfiziert worden waren, deutlich erhöht war (Abb. 4.2.2.4a). Nach 12 h ließ sich erst eine minimal erhöhte Expression erkennen, v.a. mit RSVp53 und LINEp53. Der Effekt der p53-Expression auf das Zellüberleben wurde in den Zelllinien VMCub1 und HT1376 näher untersucht, da diese die höchste Transfektionseffizienz zeigten. Dabei zeigte sich, daß die Anzahl lebender Zellen und der absolute Proteingehalt nach 48 h und 72 h Transfektion im Vergleich zur Promotorkontrolle signifikant abgenommen hatte. Dieser Effekt war besonders deutlich bei Transfektion mit den Konstrukten, die die Promotoren RSV und LINE trugen. Bei Transfektion mit dem E2F Promotor zeigte sich zwar der gleiche Effekt, jedoch zeitlich verzögert (Abb. 4.2.2.4b). Hier war die Erniedrigung in der Anzahl der noch lebenden Zellen erst nach 72 h signifikant. Weiterhin wurde die Apoptoserate in einem ELISA-Assay untersucht. In diesem Testverfahren ergaben sich sehr hohe Schwankungen, die wahrscheinlich darauf zurückzuführen waren, daß in sehr kleinen Gefäßen (96-Well-Platte) gearbeitet werden mußte. Da dieser Test zu Apoptosewerten führte, die sich teilweise von Hintergrundkontrollen nicht wesentlich unterschieden, mußte eine sensitivere Methode gewählt werden, bei der eine größere Anzahl von Zellen untersucht wurde. Darum wurde im weiteren Verlauf der Annexin V-Apoptose-Test verwendet und mittels Durchflußzytometrie ausgewertet (Abb. 4.2.2.4b). Hieraus ergibt sich, daß die p53-Expression - vermittelt durch starke oder weniger starke Promotoren - zu einem sehr raschen Sterben der Zellen führt; dieser Effekt scheint allerdings im Falle des schwachen E2F-Promotors leicht verlangsamt zu sein gegenüber den starken viralen oder retrotransposalen Promotoren.

Da normale Zellen eine geringere Transfektionseffizienz liefern, waren die oben verwendeten Methoden sehr schlecht geeignet, den Effekt der transgenen p53-Expression zu untersuchen. Außerdem konnten keine stabilen Klone isoliert werden, da selbst bei sehr geringen Hygromycinkonzentrationen sämtliche Zellen starben. Darum erschien es sinnvoll, auf durchflußzytometrische Methoden zurückzugreifen, um einen Vergleich zwischen den Zelllinien VMCub1 und HT1376 und normal proliferierenden Uroepithelialzellen durchzuführen. Nach Transfektion mit je einem der 6 Konstrukte wurde ein auf Annexin V-basierender Apoptose-Assay mittels durchflußzytometrischer Detektion durchgeführt. In jedem Experiment wurde ein Ansatz mit Transfektion von pEGFP C1 mitgeführt, um die Transfektionseffizienz zu kontrollieren. Allerdings wurde dabei festgestellt, daß die Transfektion von pEGFP C1 zu einer deutlichen Apoptose in den Zelllinien führte (Abb.

4.2.2.3c). Nach Transfektion von p53-haltigen Konstrukten in VMCub1 und HT1376- Zellen war die Anzahl der lebenden Zellen stark vermindert (48 h und 72 h nach Transfektion). Dieser Effekt war zu diesem Zeitpunkt sogar für den schwachen E2F-Promotor am stärksten. Hingegen fand sich für normale Zellen zwar eine massive Apoptoserate für die starken Promotoren, aber fast keine Erhöhung der Apoptoserate bei Verwendung des schwachen E2F-Promotors (Abb. 4.2.2.3d). Während also die p53-Expression von einem schwächeren Promotor wie E2F in Harnblasenkarzinomzelllinien (VMCub1 und HT1376) zu einer starken Apoptose führen, hat die mäßige p53-Expression in Normalzellen keinen Effekt. Im Gegensatz dazu führt eine starke p53-Expression z.B. durch virale Promotoren sowohl in Tumorzellen wie in Normalzellen zu einer hohen Apoptoserate.

Um mit einer gesicherten Positivkontrolle vergleichen zu können, wurden VMCub1-Zellen mit dem Antikörper CH11, durch den CD95 vermittelte Apoptose ausgelöst werden kann, mit Mitomycin oder Camptothecin behandelt. Mikroskopisch zeigte sich in allen Fällen ein starkes Zellsterben, das bereits 24 h nach Beginn der Behandlung deutlich sichtbar war. Zellen (VMCub1), die 3-4 h mit den jeweiligen Reagenzien behandelt worden waren, wurden in den Annexin-V-Apoptose Assay eingesetzt. In allen Fällen war deutlich Apoptose nachweisbar (Abb. 4.2.2.3e).

4.2.2.5 Zellzyklus-Untersuchung und intrazelluläre p53-Färbung mit anschließender FACS-Analyse

Um festzustellen, ob p53 neben Apoptose auch den Zellzyklus beeinflusst, wurden VMCub1-Zellen mit episomalen Konstrukten transfiziert und die Zellzyklusverteilung durchflußzytometrisch bestimmt. Dazu wurden nach 48 Stunden die Zellen geerntet, fixiert, mit RNase behandelt und mit Propidiumiodid gefärbt. In dieser Analyse traten keine Unterschiede zwischen mit Promotorkontrollen und mit p53-Konstrukt transfizierten Zellen auf (Abb. 4.2.2.5a). Ebenso wurde die Zellzyklusverteilung von nicht-transfizierten Normalzellen bestimmt, die offensichtlich der von nicht-transfizierten Zelllinien entsprach (Abb.4.2.1.1d).

Durch eine intrazelluläre p53-Färbung wurde die erhöhte p53-Expression in den p53-transfizierten Zellen bestätigt. Dazu wurden die Zellen (48 h transfizierte VMCub1-Zellen) fixiert, permeabilisiert und mit einem FITC-konjugierten Maus-anti-human p53 Antikörper markiert. Als Kontrollen dienten 1.) untransfizierte VMCub1-Zellen, die entweder fixiert und nicht behandelt; 2.) fixiert, aber nicht permeabilisiert und mit Antikörper behandelt; 3.) fixiert

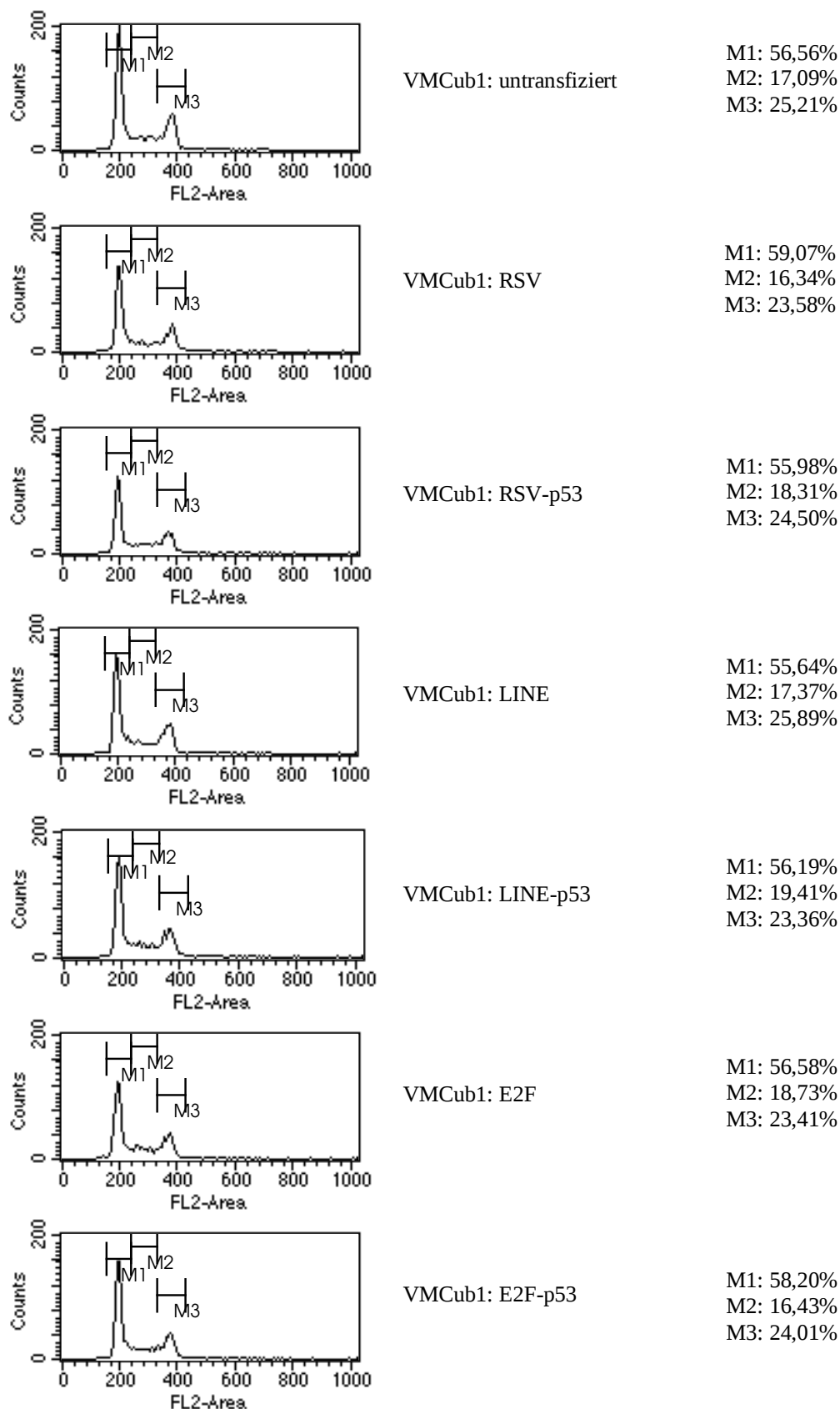


Abb. 4.2.2.5a: Zellzyklusanalyse von VMCub1 nach Transfektion mit unterschiedlichen episomalen Konstrukten,
M1= Prozentsatz der Zellen bzgl. aller gemessenen Zellen, die auf M1=G1-Phase entfallen;
M2= Prozentsatz der Zellen bzgl. aller gemessenen Zellen, die auf M2=S-Phase entfallen;
M3= Prozentsatz der Zellen bzgl. aller gemessenen Zellen, die auf M2=G2/M-Phase entfallen.
x-Achse: DNA-Gehalt; y-Achse: Anzahl der Zellen

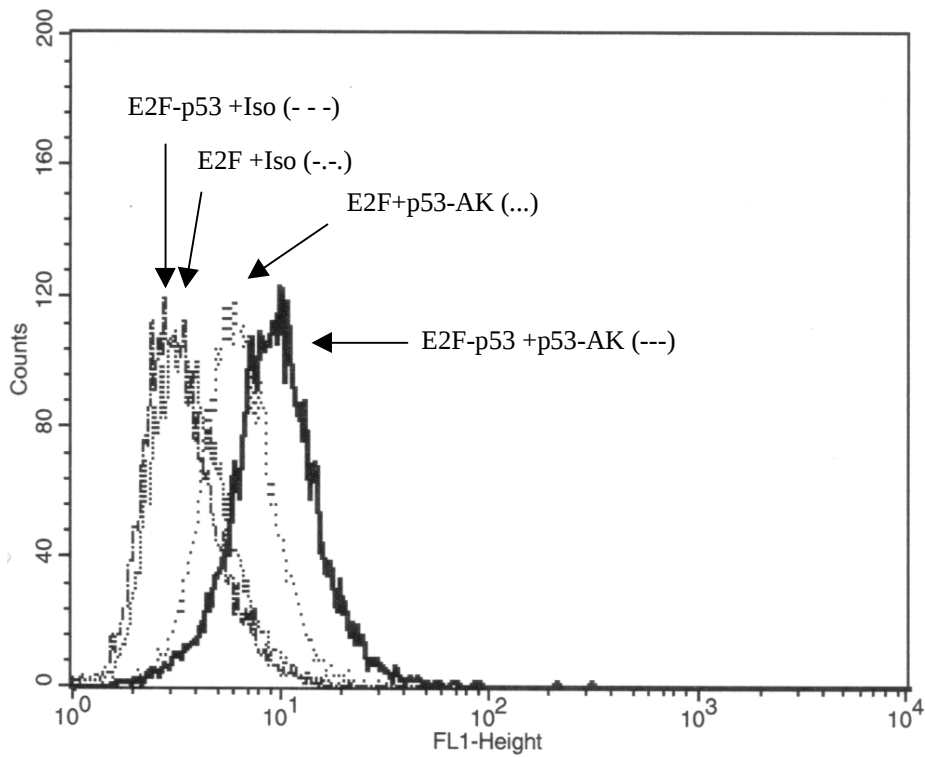


Abb. 4.2.2.5b: Intrazelluläre p53-Färbung von VMcub1-Zellen

VMcub1-Zellen wurden mit E2F Rep7 und E2F-p53 Rep 7 transfiziert. 48 h später wurden die Zellen intrazellulär p53-gefärbt und die Färbung über FACS-Analyse nachgewiesen. Es wurde ein FITC-konjugierter Maus-anti-human p53 Antikörper verwendet (vgl. 3.13.3) Als Isotypenkontrolle (Iso) diente ein monoklonaler FITC-konjugierter Maus IgG_{2b}-Antikörper (vgl. 3.13.3 und 4.2.2.5). AK=Antikörper

und permeabilisiert und mit Antikörper behandelt oder 4.) fixiert, permeabilisiert und mit Isotypenkontrolle behandelt wurden. Das Ergebnis für das Konstrukt mit dem Promotor E2F wird in Abbildung 4.2.2.3b dargestellt. Es unterstreicht die Daten aus dem Westernblot, denn die erhöhte p53-Expression in Zellen, die mit p53-tragenden Konstrukten transfiziert worden waren, wird hier ebenfalls nachgewiesen. Allerdings zeigt das Ergebnis der Promotorkontrolle mit p53-Antikörper, daß auch hier eine leicht erhöhte p53-Expression vorliegt. Das deutet darauf hin, daß der Antikörper noch nicht optimal austitriert ist; für eine umfassende Untersuchung müßten sowohl der Antikörper als auch die Isotypenkontrolle in einer Reihe von Konzentrationen untersucht werden.

4.2.3 Charakterisierung des humanen L1.2B-Promotors

In einem zweiten Ansatz zur tumorspezifischen Expression von p53 sollte der humane LINE Promotor des Elements L1.2B verwendet werden, der im weiteren Verlauf mit LINE oder LINE-Promotor bezeichnet wird. Dazu mußte dieser Promotor zunächst hinsichtlich seiner Aktivität, vorhergesagter Transkriptionsfaktorbindungsstellen und Effekt von in vitro Methylierung in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen Uroepithelialzellen charakterisiert werden.

Hierzu wurden sukzessive folgende Annahmen geprüft:

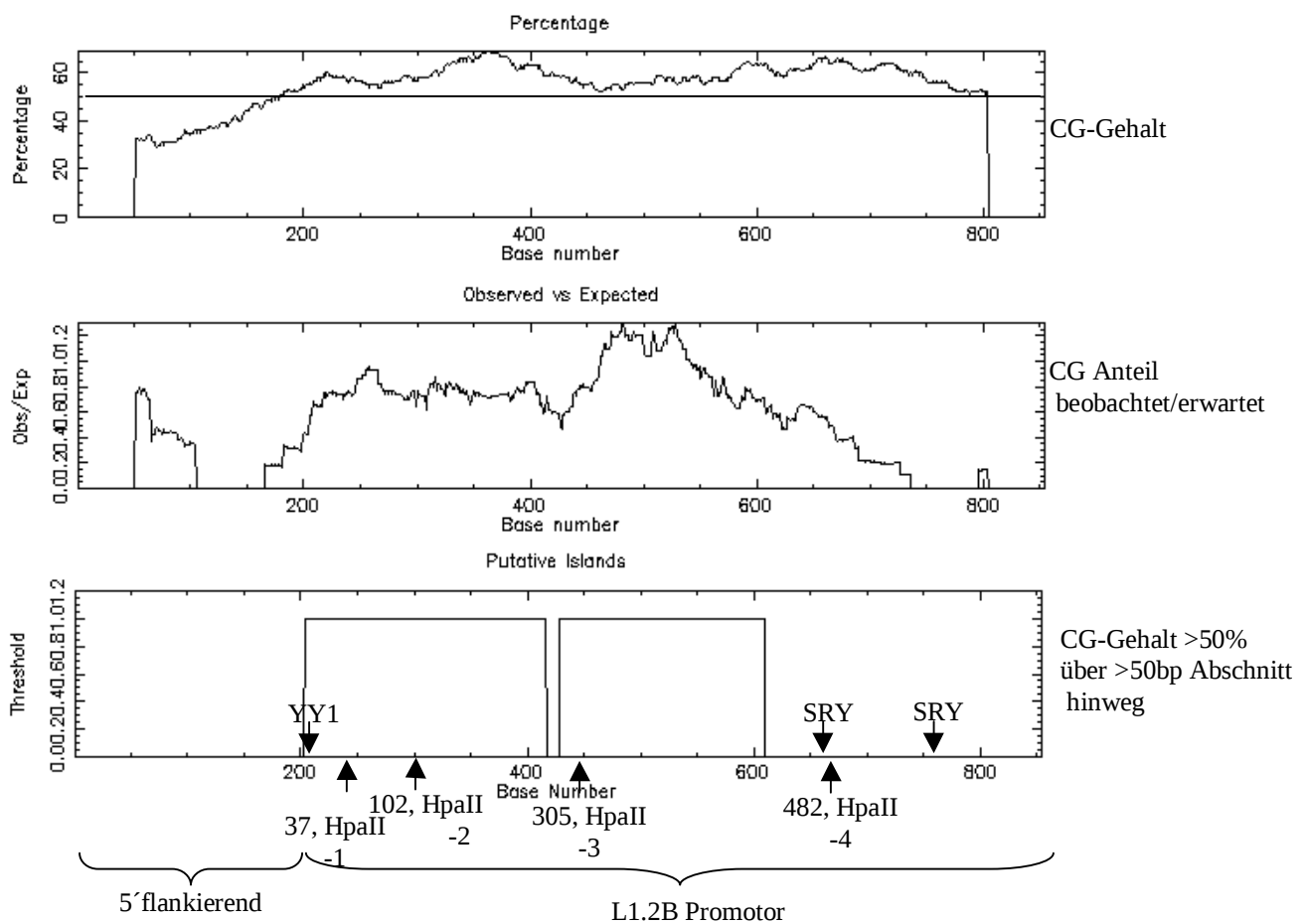
1. Zunächst könnte der Vollängenpromotor in den verwendeten Zelllinien und Normalzellen eine unterschiedliche Aktivität zeigen und dies für eine tumorspezifische Expression ausgenutzt werden (vgl. 4.2.3.2).
2. Wenn der Promotor modular funktioniert, könnten gewisse Elemente oder Abschnitte des Promotors in Tumor- und Normalzellen unterschiedlich aktiv sein (vgl. 4.2.3.3).
3. In vitro Methylierung des Promotors könnte zu einer unterschiedlichen Aktivitätsverminderung in Zelllinien gegenüber Normalzellen führen (vgl. 4.2.3.4). In Tumorzellen könnte die Repression infolge von Methylierung weniger effizient sein als in Normalzellen.

Außerdem ist bislang noch nicht eindeutig geklärt, ob der LINE-Promotor ein RNA-Polymerase II- oder ein RNA-Polymerase III-Promotor ist.

4.2.3.1 Beschreibung des humanen L1.2B-Promotors

Der im folgenden verwendete L1.2B Promotor stimmt in den ersten 100 bp mit Ausnahme von 3 bp mit dem von Swergold et al (1990) beschriebenen Promotor des humanen L1H-Elements überein. Das in der vorliegenden Arbeit benutzte Fragment umfaßt 193 bp der 5' flankierenden Region des humanen L1.2B Elements und die ersten 661 bp, die laut Swergold et al für die volle Aktivität des Promotors ausreichen. Schematisch wird der L1.2B Promotor in Abbildung 4.2.3.3a dargestellt. Demnach gibt es in dieser Sequenz zwei eng benachbarte CG-reiche Sequenzabschnitte, die einen GC-Gehalt von über 50% in einer Umgebung von 50 bp aufweisen. Da der GC-Gehalt aber nicht wesentlich 60% übersteigt und die Sequenz weniger als 900 bp lang ist, handelt es sich hier nicht um eine echte CpG-Insel. Der C/G-Gehalt liegt zwar über 50% und damit über dem im Mittel im Genom vorkommenden Gehalt, aber unter der bei Gleichverteilung zu erwartenden. Es befinden sich 4 HpaII-Restriktionsstellen in der untersuchten Promotorsequenz. Diese liegen an den Stellen +37, +102, +305 und +482. In der 5'flankierenden Region liegt keine HpaII-Stelle; der CG-Gehalt liegt hier unter dem statistisch zu erwartenden Prozentsatz (vgl. Abb. 4.2.3.1). Im Promotor wurden bislang zwei funktionale Transkriptionsfaktorbindungsstellen nachgewiesen, für YY1 und SOX11 (Becker, 1993; Tchénio, 2000). Führt man Datenbankrecherchen durch, so werden keine weiteren Transkriptionsfaktorbindungsstellen mit ähnlich hohem Wahrscheinlichkeitswert prognostiziert. Außerdem finden sich weder TATA-Box für RNA-Polymerase II noch eine A-Box oder B-Box für RNA-Polymerase III in der untersuchten Sequenz.

Abbildung 4.2.2.1: (i) Es wird der CG-Gehalt in Prozent innerhalb der Promotorsequenz angegeben. (ii) Abgetragen wird der Quotienten aus beobachteten und erwarteten CG innerhalb der Sequenz. (iii) Dargestellt sind die Bereiche mit einem CG-Gehalt über 50% über mindestens 50 benachbarte bp. Eingetragen sind weiterhin der 5' flankierende Bereich, die bekannten Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren YY1 und SRY und die HpaII-Bindungsstellen.



4.2.3.2 Aktivität des L1.2B Promotors in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen Uroepithelialzellen

Der gesamte Promotor (LINE=-193/+661) wurde in einen Firefly-Luziferase Vektor kloniert. Als Bezugsgröße wurde das Plasmid CMVluc gewählt. Dieses enthält ein Firefly-Luziferasegen unter der Kontrolle des viralen Promotors CMV. Als interner Standard, über den die Transfektionseffizienz adjustiert wurde, wurde TKRL gewählt.

Die Harnblasenkarzinomzelllinien VM Cub1, VM Cub2, 5637, HT1376 und SD, die embryonale Mauszelllinie F9 und normale Uroepithelialzellen wurden entweder mit LINE oder CMVluc transfiziert und jeweils mit TKRL kotransfiziert. Die Expressionswerte des LINE-Promotors wurden bezüglich CMV berechnet. Hierbei zeigt sich, daß in sämtlichen Zelllinien, in der Embryonalzelllinie und den Normalzellen der LINE-Promotor bemerkenswert gleich aktiv ist; es existieren keine signifikanten Expressionsunterschiede. Außerdem ist der LINE-Promotor offensichtlich ein starker Promotor; seine Aktivität liegt bei 20% des viralen CMV-Promotors, einem der stärksten bekannten (Tab. 4.2.3.2). Diese hohe Aktivität ist nicht auf Harnblasenkarzinomzellen beschränkt, denn auch in der embryonalen Mauszelllinie F9 lag die relative Aktivität des LINE-Promotors bei 22% des CMV-Promotors (Tab. 4.2.3.2).

Tabelle 4.2.3.2: Aktivität des LINE-Promotors in verschiedenen Zellarten.

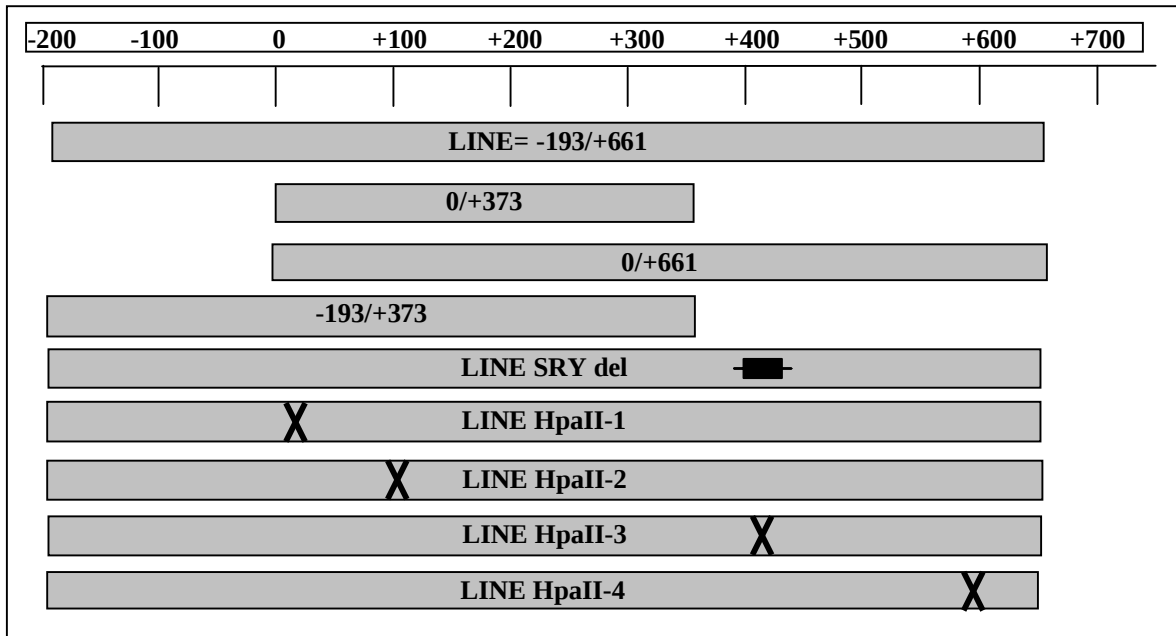
Die bezüglich TKRL adjustierten Luziferaseaktivitäten nach Transfektion des LINE-luc-Konstrukts wurden auf die ebenfalls bezüglich TKRL adjustierten CMV-Werte bezogen und der mittlere Quotient angegeben. Rel. Akt.= relative Aktivität; SD=Standardabweichung

		NUZ	VM Cub 1	VM Cub 2	5637	HT1376	SW1710	SD	F9
LINE/ CMV	Rel. Akt.	20,7	22,0	23,9	22,5	25,5	32,0	18,4	22,3
	SD	9,9	7,1	1,2	11,9	13,4	1,6	3,5	0,7

4.2.3.3 Promotoraktivitäten von Deletionsfragmenten des humanen L1.2B-Promotors in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen Uroepithelialzellen

Um die Frage beantworten zu können, ob sich eine unterschiedliche Aktivität im Vergleich von Tumor- und Normalzellen in Abhängigkeit von einzelnen Fragmenten oder Transkriptionsfaktorbindungsstellen ergibt, wurden zunächst verschiedene Deletionen und Punktmutationen in den LINE-Promotor L1.2B eingeführt und deren Aktivität in Transfektionsexperimenten untersucht. Es wurde ausgegangen von dem 853 bp großen Promotorfragment, wobei die ersten 193 bp aus dem 5' flankierenden Bereich stammen, gefolgt von den ersten 661 bp des eigentlichen Promotors. Wie in Abbildung 4.2.3.3a dargestellt, wurden 8 Fragmente des humanen L1.2B Promotors kloniert. Alle Konstrukte LINE, 0/+373, 0/+661, -193/+373, LINE SRY del, LINE HpaII-1, LINE HpaII-2, LINE HpaII-3 und LINE HpaII-4 wurden wie in 2.6 beschrieben in den Expressionsvektor pGl3 eingefügt, so daß die relative Promotoraktivität über Firefly-Luziferasemessungen bestimmt werden konnte. Dabei wurden die Konstrukte LINE (-193/+661), -193/+373, +1/+373, +1/+661 und LINE SRY del konventionell PCR-kloniert, während die Konstrukte LINE HpaII-1 bis -4 über gezielte Mutagenese (Gene EditorTM in vitro site directed mutagenesis system, Promega) erzeugt wurden. Hierbei wurde die Sequenz CCGG in CATG mutiert, wodurch weitere Schnittstellen für MaeIII entstehen. Alle Veränderungen wurden über DNA-Sequenzierung verifiziert.

Abb. 4.2.3.3a: Verwendete L1.2B-Promotorkonstrukte,
vgl. Text für Erklärung



-193 *attcaccagt tctcggagct ttttgaatga gtctttaaag ttttctaggt atacgatctt*
-133 *attataagca aacaatgaca gttttacttc ctctttacca atttggatgc ccttaatttc*
-73 *tttctcttgt ctgattgctc tggctaagac ttccagaact atgttgaaca gaagtgggtga*
-13 *aagtgggcat tct*

5' flankierend

HpaII-1

1 *gggggggagga gccaagatgg ccgaatagga acagctccgg tctacagctc ccagcgtgag*
HpaII-2

61 *cgacgcagaa gacggtgatt tctgcatttc catctgaggt accgggttca tctcactagg*

121 *gagtgccaga cagtgggcgc aggccagtgt gtgtgcgcac cgtgcgcgag ccgaagcagg*

181 *gcgaggcatt gcctcacctg ggaagcgcaa ggggtcaggg agttcccttt ctgagtcaaa*

241 *gaaaggggtg acggtcgcac ctggaaaatc gggtcactcc caccgaata ttgcgctttt*
HpaII-3

301 *cagaaccggct taagaaacgg cgcaccacga gactatatcc cacacctggc tcggagggtc*

361 *ctacgcccac ggaatctcgc tgattgctag cacagcagtc tgagatcaaa ctgcaaggcg*
SRY-Bindungselement

421 *gcaacgaggg tgggggaggg gcgcccacca ttgcccaggc ttgcttaggt aaacaaagca*
HpaII-4

481 *gccgggaagc tcgaactggg tggagcccac cacagctcaa ggaggcctgc ctgcctctgt*

SRY-Bindungselement

541 *aggctccacc tctgggggca gggcacagac aaacaaaaag acagcagtaa cctctgcaga*

601 *cttaagtgtc cctgtctgac agctttgaag agagcagtgg ttctcccagc acgcagctgg*

661 a

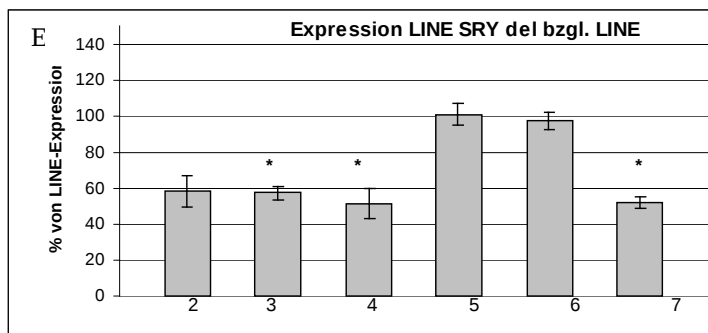
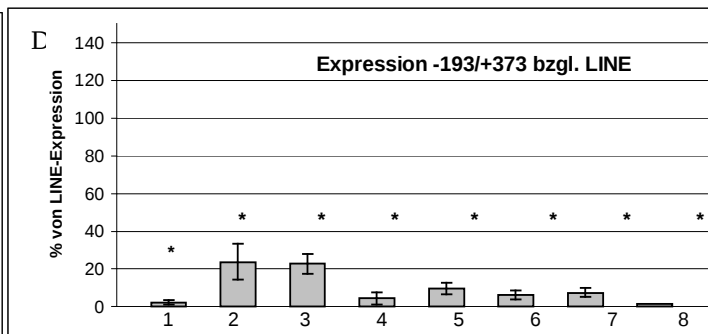
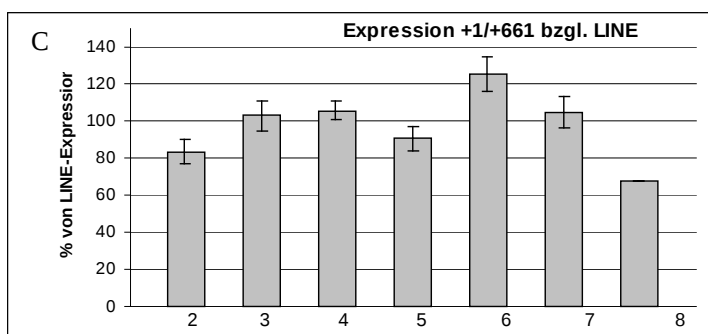
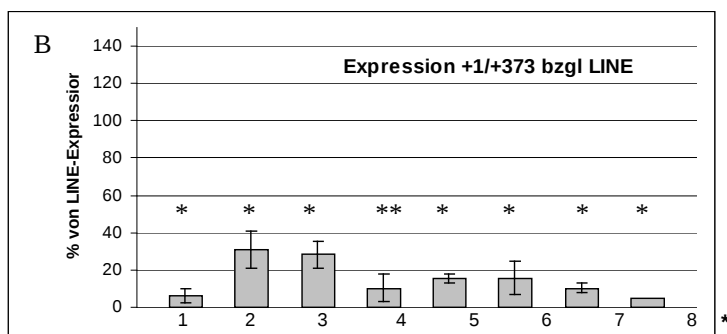
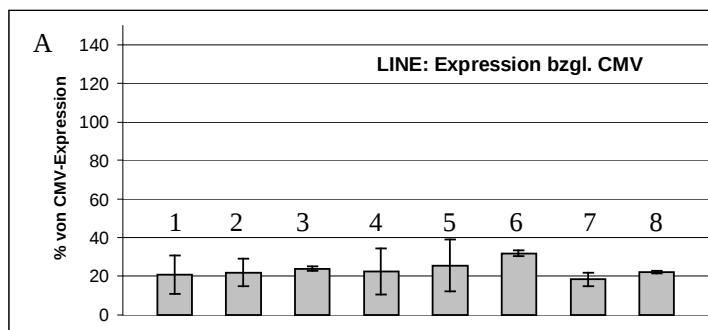


Abb. 4.2.3.3b: Relative Promotoraktivitäten von LINE-Promotor-Deletionskonstrukten
Für alle Konstrukte werden adjustierte Werte bzgl. LINE angegeben (in Prozent von LINE)

1 NUZ= Normale Uroepithiale Zellen
2 VMCub1
3 VMCub2
4 5637
5 HT1376
6 SW1710
7 SD
8 F9

Mit Sternen (*) sind signifikante Differenzen zum adjustierten Expressionswert von LINE gekennzeichnet. Diese Signifikanz spiegelt das Ergebnis der im Text beschriebenen t-Test-Statistik wider. In Abbildung A werden die Expressionswerte auf CMVluc bezogen, in Abbildung B-E auf LINE (-193/+661).

		NUZ (1)			VMCub1 (2)			VMCub2 (3)			5637 (4)			HT1376 (5)			SW1710 (6)			SD (7)			F9 (8)		
			t´	v		t´	v		t´	v		t´	v		t´	v		t´	v		t´	v		t´	v
+1/+373	adj. Wert	6,0	12,55	1	30,7	8,08	7	28,0	14,21	7	10,1	9,07	3	15,2	8,83	4	15,6	13,42	3	10,3	29,95	5	4,7	192,55	1
	SD	3,7			9,8			7,1			7,4			2,2			8,7			2,5			0,01		
-193/+373	adj. Wert	2,2	13,81	1	23,8	8,99	5	22,7	21,00	4	4,4	10,94	2	9,5	9,30	4	6,1	44,37	2	7,5	31,01	4	1,5	198,04	1
	SD	1,3			9,6			5,1			3,3			3,1			2,4			0,001					
+1/+661	adj. Wert	n.d.			83,4	2,38	5	102,8	0,50	4	105,7	0,63	2	90,5	0,90	4	125,4	3,77	2	104,8	0,75	4	67,9	46,29	1
	SD				6,8			7,8			4,8			6,5			9,4			8,3			0,1		
LINE SRY del	adj. Wert	n.d.			58,2	3,26	3	57,1	15,67	4	51,4	4,76	2	100,9	0,08	4	97,4	0,73	2	52,0	14,79	4	n.d.		
	SD				8,7			3,7			8,1			6,2			4,8			3,0					
HpaII-1	adj. Wert	n.d.			13,3	16,13	1	n.d.			n.d.			21,7	8,25	1	n.d.			n.d.			n.d.		
	SD				2,6						0,51														
HpaII-2	adj. Wert	n.d.			48,5	9,97	1	n.d.			n.d.			24,1	6,14	1	n.d.			n.d.			n.d.		
	SD				1,6						11,2														
HpaII-3	adj. Wert	n.d.			29,7	13,94	1	n.d.			n.d.			23,7	6,31	1	n.d.			n.d.			n.d.		
	SD				0,2						10,6														
HpaII-4	adj. Wert	n.d.			37,9	11,62	1	n.d.			n.d.			26,3	6,54	1	n.d.			n.d.			n.d.		
	SD				2,5						8,6														

Tabelle 4.2.3.3b: Relative Aktivitäten von LINE-Promotor-Deletionskonstrukten;

Für alle Konstrukte werden adjustierte Werte bzgl. LINE angegeben (in Prozent von LINE) sowie die entsprechende Standardabweichung. Zudem werden die kritischen Werte (t-Verteilung; t') im Vergleich zum LINE-Expressionswert und seiner Standardabweichung und die errechneten Freiheitsgrade (v) angegeben. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von 0.05 wurden grau unterlegt. NUZ= normale uroepitheliale Zellen. Die Ziffern nach der Zellbezeichnung geben die Nummerierung der Zellen in der Grafik Abb. 4.2.3.3 an.

Zur Bestimmung der Promotoraktivitäten wurden sämtliche Konstrukte unter Kotransfektion von TKRL in jede der 6 Harnblasenkarzinomzelllinien sowie in normale Uroepithelialzellen transfiziert. In einigen Experimenten wurde auch die Maus-Teratokarzinomzelllinie F9 mitgeführt. Zur Kontrolle wurde mit der Aktivität des LINE=-193/+661-Promotors und mit der des CMV-Promotors (CMV-luc Konstrukt) verglichen. Alle Transfektionen wurden in mindestens zwei unabhängigen Kulturen durchgeführt (jeweils doppelt transfiziert und je Doppelbestimmungen). Zur Bestimmung der Signifikanzen wurde eine t-Test-Statistik durchgeführt. Hierbei wurden die Expressionswerte der jeweiligen Konstrukte mit denjenigen des LINE-Konstrukts verglichen.

Die Expression der Konstrukte 0/+373 und -193/+373 war in allen Zellen signifikant niedriger als die des LINE-Konstrukts. Aus der Signifikanz dieser Expressionswerte läßt sich schließen, daß offensichtlich der Bereich +373/+661 einen erheblichen Einfluß auf die Transkriptionsaktivität des Promotors hat. Dabei ließ sich keine Zellspezifität feststellen. Da bereits beschrieben wurde, daß dieser Bereich funktionelle Transkriptionsfaktorbindungsstellen für SRY-Box-Faktoren enthielt (Tchério, 2000), wurde diejenige der beiden Stellen mit dem höheren Score (je nach verwendeter Datenbank zwischen 95.0 und 100.0) bei +471-+477 bp deletiert. In vier der sechs Harnblasenkarzinom-Zelllinien (VMCub1, VMCub2, 5637 und SD) führte dies tatsächlich zu einer signifikanten Abnahme der Promotoraktivität (Tab. 4.2.3.3b). Ebenso führte Punktmutation jeder der 4 HpaII-Bindungsstellen zu einem erheblichen Aktivitätsverlust (Tab. und Abb. 4.2.3.3b). Dabei liegen nur die HpaII-Stellen 1 und 4 in der Nähe von als funktionell nachgewiesenen Transkriptionsfaktorbindungsstellen, nämlich YY1 und SRY (SOX11) (vgl. Abb.4.2.3.3a). Deletion des 5'-flankierenden Bereichs hatte keinen Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität des Promotors. Alle Ergebnisse ließen sich bei Verwendung einer embryonalen Mauszelllinie F9 bestätigen (Tab. 4.2.3.3.b), so daß diese Effekte nicht auf Harnblasenkarzinomzelllinien beschränkt waren. Da nicht sicher überprüft werden konnte, ob normalverteilte Variablen vorliegen (vgl. Statistischer Anhang), wurden für die Harnblasenkarzinomzelllinien und Normalzellen zusätzlich ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Es ergaben sich die gleichen Signifikanzen wie im Fall des t-Test (Tab. 4.2.3.3c; statistischer Anhang).

Tab. 4.2.3.3c: LINE-Promotorkonstrukte: Zusammenfassung der statistischen Auswertung

Es wird die asymptotische Signifikanz (2-seitig) des Mann-Whitney-U-Tests für die LINE-Deletionskonstrukt-Expressionswerte angegeben. Es wurde jeweils der Unterschied in der Expression des in der linken Spalte angegeben Konstrukts im Vergleich zum LINE-Ausgangskonstrukt (-193/+661) getestet. Signifikante Ergebnisse sind grau unterlegt:

	NUZ	VMCub1	VMCub2	5637	HT1376	SW1710	SD
+1/+373	0,102	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	0,002	0,002
-193/+373	0,037	0,001	0,014	0,005	0,014	0,037	0,005
+1/+661	n.d.	0,102	0,487	0,487	0,102	0,102	0,487
LINE SRY del	n.d.	0,014	0,014	0,014	1,000	0,487	0,037

4.2.3.4 Effekt von in-vitro-DNA-Methylierung auf Promotoraktivitäten

Um die Veränderungen der Promotoraktivitäten in Abhängigkeit vom Methylierungszustand bestimmen zu können, wurden alle Deletionskonstrukte und das LINE-Ausgangskonstrukt mit HpaII-Methylase an allen CCGG-Stellen in vitro methyliert. Danach wurden jeweils methylierte oder unmethylierte Konstrukte (je unter Kotransfektion von TKRL) transfiziert und miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich, daß Methylierung zu einem dramatischen Aktivitätsverlust führt (Tab. 4.2.3.4). In fast allen Zelllinien und normalen Zellen sowie in einer Nierenzellkarzinomzelllinie, SKRC47 war die Promotoraktivität signifikant erniedrigt. Es ergaben sich keine signifikanten Differenzen zwischen Normal- und Tumorzellen. Die nicht-signifikanten Ergebnisse sind auf die geringe Versuchszahlwiederholung (2 unabhängige Versuche) zurückzuführen, die zu einem sehr hohen Schwellenwert des entsprechenden kritischen Werts führt (vgl. Statistischer Anhang). Die Repression durch in vitro-Methylierung der Plasmidsequenzen wirkte sich in gleichem Maße auf Deletionskonstrukte wie auf das Vollängenpromotor-Konstrukt LINE aus.

		NUZ		VMCub1		VMCub2		5637		HT1376		SW1710		SD		SKRC47	
			t´		t´		t´		t´		t´		t´		t´		t´
LINE	%*	66,39	5,84	29,15	6,51	18,12	22,59	2,83	73,49	23,24	62,03	29,07	7,26	15,28	13,74	2,82	269,48
	SD	8,14		15,38		5,14		1,87		1,75		13,81		8,72		0,51	
+1/+373	% *	31,70	15,02	11,65	18,37	20,81	12,46	8,59	30,13	3,77	87,80	13,15	18,06	23,09	16,50	4,18	152,26
	SD	6,43		6,802		8,993		4,29		1,55		6,80		6,59		0,89	
-193/+373	% *	9,96	53,96	5,61	38,02	18,45	11,77	20,12	45,19	6,58	48,90	24,95	35,62	9,47	13,86	n.d.	
	SD	2,36		3,51		19,8		2,50		2,7		2,98		9,24		n.d.	
+1/+661	% *	n.d.		41,16	19,81	44,26	5,19	66,03	4,58	41,77	17,16	34,15	25,94	32,17	26,95	n.d.	
	SD			4,2		15,20		10,50		4,81		3,59		3,56		n.d.	
LINE SRY del	% *	n.d.		23,29	19,23	23,97	35,84	19,26	35,79	10,10	66,91	13,83	133,92	21,09	14,44	n.d.	
	SD			5,64		3,00		3,19		1,90		0,91		7,73		n.d.	
HpaII-1	% *	n.d.		13,53		n.d.		n.d.		0,39		n.d.		n.d.		n.d.	
	SD																
HpaII-2	% *	n.d.		12,8		n.d.		n.d.		8,18		n.d.		n.d.		n.d.	
	SD																
HpaII-3	% *	n.d.		13,76		n.d.		n.d.		1,50		n.d.		n.d.		n.d.	
	SD																
HpaII-4	% *	n.d.		9,96		n.d.		n.d.		4,87		n.d.		n.d.		n.d.	
	SD																

Tab. 4.2.3.4: Promotoraktivitätsveränderung nach in-vitro-DNA Methylierung von LINE-Promotorkonstrukten

Es wird die Expressionsstärke des methylierten Konstrukts (in Prozent) von dem gleichen nichtmethylierten Konstrukt angegeben (% *). SD= Standardabweichung, bezogen auf die unabhängig durchgeführten Experimente (für die HpaII-Konstrukte wurde die Messung nur einfach mit Doppelwerten durchgeführt, daher fehlen SD-Bezeichnungen). Zudem werden die kritischen Werte (t-Verteilung; t') im Vergleich von unmethyliertem Konstrukt (100%) zu methyliertem angegeben. Signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von 0.05 und einem Freiheitsgrad von 1 sind durch Fettdruck markiert.

4.2.3.5 Effekt von in-vitro-DNA-Methylierung von Expressionsplasmiden auf Selektierbarkeit stabiler Klone

Das episomale Konstrukt LINE Rep7 trägt den -193/+661-Promotorteil des L1.2B Elements in einem episomalen Vektor, der eine Hygromycinresistenz enthält. LINE-p53 Rep7 trägt außerdem Wildtyp-p53 cDNA unter der Kontrolle des LINE-Promotors. Diese Konstrukte wurden in vitro methyliert und unmethyliert in verschiedene Zelllinien (VMCub1, HT1376) und normale Zellen transfiziert. Es war nicht möglich, Klone zu isolieren, da nach einer Woche Selektion keine lebenden Zellen mehr in Kultur wuchsen. Dies deutet darauf hin, daß die Tumorzelllinien nicht in der Lage sind, das vorhandene Resistenzgen zu entmethylieren.

5. Diskussion

Drei wesentliche Veränderungen in Urotheltumoren gegenüber normalem Urothel sind:

(1) die sehr häufige Inaktivierung der Funktion des p53 Tumorsuppressorproteins infolge von Punktmutation oder 17p-Verlust, (2) die nahezu obligate Inaktivierung des G1-S-Kontrollpunktes durch verschiedene Aberrationen im Rb-p16-CyclinD1-Pathway, (3) die fast immer über das gesamte Genom hinweg verminderte DNA-Methylierung, die u.a. die Promotorsequenzen von Retroelementen wie LINE-1 erfaßt.

Diese Veränderungen sollten für eine gezielte Gentherapie des Urothelkarzinoms ausgenutzt werden. Dazu sollte im Modell von Harnblasenkarzinom-Zelllinien und kultiviertem Normalurothel ein Promotor entwickelt werden, der tumorspezifisch ist und die Expression des für Tumorzellen stärker toxischen Wildtyp-p53-Gens steuert. Durch die Nutzung tumorselektiver Promotoren sollte der Unterschied in der Wirkung von p53 auf Normal- und Tumorgewebe weiter verstärkt, eine Schädigung des Normalgewebes vermieden und insbesondere auf Tumorzellen abgezielt werden, die sich durch besonders starke Aberrationen der Zellzyklus bzw. der DNA-Methylierung auszeichnen. Diese stellen wahrscheinlich die aggressivsten Komponenten von Harnblasenkarzinomen (Knowles, 1999), doch sicherlich auch von anderen Karzinomen dar.

5.1 Mutationsanalyse von p53

Da sich infolge von Mutationen im p53-Gen (soweit diese als Missense-Mutationen funktionale Bindungsdomänen wie die DNA-Bindungsdomäne (~Exon 4-8) betreffen), die Halbwertszeit des Proteins P53 verlängert, akkumuliert mutiertes P53 in den entsprechenden Zellen und läßt sich immunhistochemisch nachweisen. Eine immunhistochemische Färbung von p53 gilt als recht guter erster Anhaltspunkt für eine tatsächlich vorliegende Mutation (Bernardini, 1999).

Immunhistochemische Studien von p53 in Harnblasenkarzinomen zeigen in der Regel eine enge Korrelation zwischen Tumorgrad und Mutationshäufigkeit, teilweise auch zwischen Tumorstadium und Mutationshäufigkeit (Williamson, 1994; Fujimoto, 1993). Ferner wurden Korrelationen mit DNA-Ploidie, vaskulärer Invasion und Carcinoma in situ nachgewiesen (Bernardini, 1999). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein Trend, daß mit zunehmendem Tumorgrad die Häufigkeit, akkumuliertes p53 immunhistochemisch nachzuweisen, anstieg (vgl. Tab. 4.1.1). Daß keine strikte Korrelation gefunden wurde, kann damit erklärt werden, daß im vorliegenden Kollektiv im wesentlichen fortgeschrittene Tumoren untersucht ($\geq pT2/\geq G3$) wurden. Von den untersuchten Tumoren waren 24% pT2-Tumore, 54% pT3/T4-Tumore,

32% G2-Tumore, 56% G3-Tumore und 6% G4-Tumore. Die biologischen Unterschiede zwischen diesen Tumoren untereinander dürften wesentlich geringer sein als zwischen frühen Stadien, beispielsweise pTaG1 und pT1G3 Tumoren, wo meist klare Beziehungen zur p53-Akkumulation und Stadium oder Grad gefunden werden. Bei statistischer Analyse der Beziehung von Tumorgrad und p53-Akkumulation ergibt sich im Mantel-Haenszel-Test ein wesentlich niedriger p-Wert ($p=0,09$) als im exakten Test von Fisher ($p=0,261$). Dies läßt den Schluß zu, daß nicht nur ein Trend festzustellen ist, sondern auch ein gradueller Zusammenhang besteht, d.h. mit zunehmendem Tumorgrad nimmt kontinuierlich die Häufigkeit akkumulierten p53-Proteins zu.

Mittels SSCP-Analyse konnten nicht alle Mutationen nachgewiesen werden. Dabei brachten auch Veränderungen der Gelkonditionen wie Zufügen von Glycerin oder Lauf bei Raumtemperatur keine erhöhte Sensitivität. Exon 4 war für diese Methodik offensichtlich zu groß (304 bp). Ein zweites Problem, das sich bei der SSCP-Analyse von Exon 4 ergab, lag in der Tatsache, daß sich in diesem Exon mindestens zwei recht häufige Polymorphismen (vgl. Tab. 1.3c) befinden. Zur Auswertung von Exon 4 wurden nur diejenigen Proben als mutant angesehen, die ein von den Kontrollen vollkommen abweichendes Muster zeigten. Offensichtlich ließ sich keiner der Polymorphismen in Exon 4 mittels der gewählten SSCP-Methodik nachweisen; in der Sequenzierung waren die Polymorphismen dagegen gut detektierbar (vgl. Tab. 4.1.3a). Der Polymorphismus in Exon 6 (der einzige weitere bekannte in Exon 4-8) war in der SSCP ebenfalls gut nachweisbar und ließ sich in der Sequenzierung bestätigen. Betrachtet man das Gesamtkollektiv von 109 untersuchten Patienten, liegt man mit 24 Patienten mit aberranten Banden in der SSCP-Analyse (22%) unter dem in der Literatur weithin beschriebenen Prozentsatz (Sidransky, 1991; Fujimoto, 1993; Spruck, 1993). Allerdings finden auch Williamson et al (1994) in ihrer Studie, die von derselben Methodik ausgeht, eine niedrige Mutationsrate. Sie detektierten in 19 von 88 Harnblasentumoren (21,5%) und 4 von 14 (28,5%) Tumorzelllinien abweichende Banden in der SSCP-Analyse.

Die Sequenzierungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigen zum einen die Abweichungen in der SSCP als Mutationen, zum anderen waren tatsächlich in nur 37% der Proben Mutationen nachweisbar. Die Sequenzierungsergebnisse könnten auf zwei Gründe zurückzuführen sein. (1) Es könnten tatsächlich weniger Mutationen vorliegen als man nach den aus der Literatur bekannten Ergebnisse vermuten würde (Sidransky, 1991; Fujimoto, 1993; Spruck, 1993). Allerdings liegen auch Studien vor, die einen ähnlichen Prozentsatz finden, z.B. beschreiben

Bernardini et al (1999) in einer Studie, in der Immunhistochemie, SSCP und Sequenzierung von p53 in 104 Harnblasenkarzinomen vorgenommen wurde, 24 Mutationen (23%). In dieser Studie lag allerdings ein größerer Anteil an oberflächlichen Tumoren (pTa) oder pT1-Tumoren vor (61,5%). (2) Der niedrige Prozentsatz an p53-Mutationen könnte auf Kontamination durch normales Gewebe zurückzuführen sein, so daß in der Sequenzierung eine Mutation nicht mehr eindeutig zu bestimmen war. In einer Verdünnungsreihe wurde bei den vorliegenden Sequenzierungsbedingungen eine Detektionsgrenze von ca. 70% mutanter DNA gegenüber 30% Wildtyp-DNA festgestellt. Diese hängt natürlich sehr stark von der Basensequenz und dem Mutationstyp ab und gibt darum nur einen sehr groben Anhaltspunkt. Dennoch wird dieser Prozentsatz sicherlich in einer Reihe von uns vorliegenden Tumorproben nicht erreicht. Allerdings sollten im Fall starker Kontamination durch normales Gewebe aberrante Banden in der SSCP-Analyse detektierbar sein. Im Vergleich zu anderen Tumorsuppressorgen-Studien ist eine Mutationsrate dieser Größenordnung durchaus als signifikant anzusehen.

Nimmt man eine immunhistochemische Klassifikation vor (0-5%, 5-10%, 10-20%, >20%) wie in Tab. 4.1.4, so zeigt sich in der Gegenüberstellung von immunhistochemischen Daten und SSCP- und Sequenzierungsanalyse-Ergebnissen ein signifikantes Ergebnis (Chi-Quadrat-Test: $p=0,022$; Fisher-Test: $p=0,015$; Mantel-Haenszel-Test: $p=0,00385$). Im Mantel-Haenszel-Test, der innerhalb der Klassenaufteilung (Immunhistochemie) eine Graduierung zugrunde legt, erreicht das Ergebnis noch eine wesentlich höhere Signifikanz. Hieraus ist zu schließen, daß zum einen ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen "mutant" und "nicht-mutant" vorliegt, und zudem durch den wesentlich niedrigeren p-Wert im Mantel-Haenszel Test der graduelle Zusammenhang mit steigendem immunhistochemischem Klassifikationsgrad unterstrichen wird. Somit besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen immunhistochemischer Klassifikation und tatsächlich vorliegenden Mutationen.

Zusammenfassend kommen in der untersuchten Tumorkohorte p53 Mutationen etwas seltener vor als nach den meisten Literaturdaten zu erwarten. Es besteht die Möglichkeit, daß alternative Veränderungen des p53-Kontrollsystems eine bedeutende Rolle spielen, beispielsweise die vermehrte Expression von MDM2 (Schmitz-Dräger, 1997). Tatsächlich enthalten mindestens 20% der untersuchten Tumore homozygote Deletionen des CDKN2A-Locus mit Verlust von ARF1 (Florl, 2000).

5.2 Tumorspezifisches Targeting p53-induzierter Apoptose

Funktionsverlust von p53 ist eines der häufigsten molekularen Ereignisse in menschlichen Tumoren, auch in Urothelkarzinomen (Greenblatt, 1994; Knowles, 1995; Levine, 1997). Es ist daher naheliegend, daß die Reexpression von Wildtyp-p53 in malignen Zellen einen Effekt auf die Tumorzellen zeigt, der einer Tumorbildung oder Progression entgegengerichtet ist. In der Tat führt Reexpression von Wildtyp-p53, die von einem sehr starken Promotor wie CMV reguliert wird, zu schneller und effizienter Apoptose in urothelialen Tumorzelllinien (Makri, 1997 und 1998). Allerdings ist der CMV-Promotor nicht tumorspezifisch. Eine p53-Expression durch den frühen Promotor des Cytomegalie-Virus (CMV) in Normalzellen würde zu einer sehr starken p53-Überexpression führen, und es ist nicht von vornherein klar, welchen Effekt eine derartige Überexpression auf normal proliferierende Epithelialzellen haben könnte. Um dieses Problem anzugehen, sollten Promotoren, die möglichst selektiv in Tumorzellen stärker aktiv sind als in Normalzellen, gefunden werden und der Effekt der durch sie gesteuerten p53-Expression in Normal - und Tumorzellen verglichen werden. Voraussetzung dafür war die Entwicklung bzw. Charakterisierung des Modellsystems Harnblasenkarzinom-Zelllinien und normale uroepitheliale Primärkulturen.

5.2.1 Beschreibung der normalen Uroepithelialzellen und der Harnblasenkarzinomzelllinien

Mittels in vitro-Zellkultursystemen lassen sich biologische, biochemische, genetische und molekularbiologische Aspekte der Karzinogenese analysieren. Tumorzelllinien, die seit langer Zeit in Kultur sind (wie die in dieser Arbeit verwendeten) sind meist durch die Literatur gut beschrieben, charakterisiert und leicht über einen längeren Zeitraum zu kultivieren, meist transfizierbar, spiegeln in einem gewissen Rahmen tatsächlich vorkommende Aberrationen in primären Tumoren wider (Rieger, 1995; Grimm, 1995), und stellen insoweit ein adäquates Modell dar, um Karzinome molekular zu untersuchen, v.a. in Hinblick auf Mechanismen, was in menschlichen Tumoren in vivo fast unmöglich ist. Um einen Vergleich mit dem "nicht karzinogenen Normalzustand" einer Zelle anstellen zu können, mußten Kulturen normaler Uroepithelialzellen etabliert werden, die es erlauben, über einen Beobachtungszeitraum von mindestens drei Wochen Expressionsuntersuchungen, Promotorstudien, Zellzyklusuntersuchungen, Apoptose-, Proliferations- und Proteinanalysen durchführen zu können. Dabei sollten die Zellen nicht immortalisiert werden, da für die nachfolgenden, insb. zellzyklusregulatorischen Experimente davon ausgegangen werden mußte, daß die Ergebnisse

in ausreichendem Maße einen normalen, nichtmalignen Zustand uroepithelialen Gewebes widerspiegeln. Nachdem sich diese Methodik als sehr zuverlässig erwiesen hatte, wurden nach der in Southgate et al, 1994, beschriebenen Methode Uroepithelialzellen aus Harnleitern isoliert und auf Kollagen-beschichteten Platten ausgesät. Problematisch für die nachfolgenden Experimente waren kontaminierende Fibroblasten. Sie zeigten in den vorliegenden Experimenten ein etwas von den Epithelialzellen abweichendes Zellzyklusbild (vgl. Abb. 4.2.1.1d). Darum würden sie die nachfolgenden Experimente verfälschen, und es war sinnvoll, sie weitestgehend zu entfernen. Dies ließ sich durch fraktioniertes Ablösen mit Versen bei der ersten Passagierung effizient bewerkstelligen. Die Verwendung von FuGene erlaubte einen wenig zytotoxischen, recht effizienten Gentransfer in die Primärkulturen. In der Literatur sind Transfektionen in normalen Uroepithelialzellen bislang nicht beschrieben, vermutlich, weil bislang verwendete Transfektionsreagenzien zu zytotoxisch waren, so z.B. das in dieser Arbeit ebenfalls ausgetestete "Superfect"-Reagenz.

Alle Harnblasenkarzinom-Zelllinien stammten von unterschiedlichen Patienten und wiesen ein sehr unterschiedliches Spektrum an molekularen Defekten auf (Williams, 1980; Rieger, 1995; Grimm, 1996; Makri, 1997; Miyake, 1998), die verifiziert wurden. Alle p53-Mutationen in den Zelllinien lagen im Bereich der DNA-Bindungsdomäne; im Westernblot zeigten sich hohe, doch unterschiedliche p53-Mengen im Vergleich zu Normalzellen. Insbesondere die Zelllinie VMCub2, die eine Doppelmutation in Exon 5 trägt, zeigte eine sehr starke p53-Akkumulation. In allen betrachteten Zelllinien mit Ausnahme der Zelllinie 5637 war akkumuliertes p53 im Westernblot nachweisbar. In Normalzellen war kein p53 im Westernblot detektierbar, allerdings war bei Entzug von EGF und Choleratoxin eine deutliche p53-Akkumulation zu beobachten (Abb. 4.2.1.2). Aus der Literatur ist bekannt, daß Mutationen im p21^{CIP1}-Gen sehr selten auftreten (Watanabe, 1995); daher ist nicht zu erwarten, daß viele Harnblasenkarzinomzelllinien p21-Mutationen tragen. Tatsächlich ist nur in einer einzigen Zelllinie, HT1376, eine p21-Mutation berichtet, die aber - obwohl als Leserastermutation beschrieben (Makri, 1997; Miyake, 1998) - im Westernblot nicht zu einer verschobenen oder gar fehlenden Proteinbande führte (Abb. 4.2.1.2). Es ist möglich, daß den Literaturdaten ein reproduzierbarer Sequenzierungsfehler zugrundeliegt ("Basenkompression"). In allen Zelllinien lagen vergleichbare Mengen an p21-Protein vor. Dasselbe galt für p27. Erstaunlicherweise ließ sich weder für p27 noch für p21 eine Bande in Normalzellen nachweisen. Offensichtlich sind die Expressionshöhen in Normalzellen gegenüber Tumorzelllinien so gering, daß die vorliegende - auf die Zelllinien optimierte -

Methodik nicht sensitiv genug ist, die geringen Proteinmengen in den Normalzellen zu detektieren. Im Einklang damit war in einer immunhistochemischen Studie keine Expression von p21 bzw. p27 in urotheliale Normalgewebe nachweisbar, jedoch in einigen gut differenzierten Tumoren (Franke, 2000). Auch für p53 und E2F-1 war in normalen, proliferierenden Uroepithelialzellen kein Protein detektierbar. Entzog man allerdings den Normalzellen Wachstumsfaktoren und Choleratoxin, war sowohl eine p53- als auch eine E2F-Bande detektierbar. Dies spricht dafür, daß die Expression in normalen Zellen so schwach ist, daß sie im Westernblot mittels dieser Methodik nicht detektierbar sind. Entzieht man aber den normalen Zellen Wachstumsfaktoren, findet eine erhöhte Expression verschiedener Zellzyklusregulatoren - insb. p53 - statt, so daß akkumuliertes Protein im Westernblot nachweisbar ist.

Das Rb-Protein ließ sich dagegen in Uroepithelzellen in komplettem Medium nachweisen; diese Expression war aber sehr schwach im Vergleich zu den Tumorzelllinien. Dabei wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet, ein monoklonaler und ein polyklonaler. Mit beiden war deutlich der auch in der Literatur beschriebene komplette Rb-Verlust (Rieger, 1995; Grimm, 1995) in den Zelllinien HT1376 und 5637 zu erkennen (4.2.1.1.a). Mittels des monoklonalen Antikörpers ist in den übrigen Zelllinien eine deutliche Doppelbande zu erkennen, wahrscheinlich die phosphorylierte und unphosphorylierte Form von Rb, während in Normalzellen nur die untere Bande (demnach unphosphoryliert) erscheint. Außerdem erscheint wie beim polyklonalen Antikörper eine deutliche kleinere, vielleicht aber unspezifische Bande.

Die stärksten Unterschiede zwischen den Zelllinien ergaben sich bei der Westernblotanalyse von E2F-1. Der verwendete Antikörper bindet zwar vornehmlich E2F-1; es kann allerdings nach Herstellerangaben nicht sichergestellt werden, daß auch das E2F-like Protein (Accession: A45032) detektierbar ist, das fast dieselbe Größe wie E2F-1 hat. Die Hauptmenge E2F akkumuliert in der unteren Bande und zeigte massive Unterschiede zwischen den Zelllinien. In Normalzellen war E2F-1 wiederum nur in Zellen unter Entzug von EGF und Choleratoxin detektierbar, nur die untere Bande trat auf (vgl. Abb. 4.2.1.2). Die Detektion einer Doppelbande ist bereits aus der Literatur bekannt (Kusek, 2000). Wahrscheinlich handelt es sich dabei um hypophosphoryliertes E2F-1 (untere Bande) und phosphoryliertes E2F-1 (obere Bande). Demnach akkumulieren in den Zelllinien VMCub2 und SD hohe Konzentrationen von un- oder hypophosphoryliertem E2F-1, in der Zelllinie SW1710 wäre demnach nur hyperphosphoryliertes E2F-1 nachweisbar. In normalen Zellen akkumulierte hypophosphoryliertes E2F-1 unter Wachstumsfaktorentzug. Es ist auffällig, daß die

Akkumulation von E2F-1 besonders in Zelllinien mit Restaktivität von Rb beobachtet wurde. Die Vermutung liegt nahe, daß die Überexpression des Proteins die Restaktivität von Rb kompensiert. Auch einige Harnblasenkarzinome in vivo zeigen deutliche Überexpression von E2F-1 (Rabbani, 1999).

Alle verwendeten Harnblasenkarzinomzelllinien ließen sich gut transfizieren. Die Transfektionseffizienzen wurden zunächst bestimmt, indem der GFP-Expressionsvektor pEGFP C1 transient transfiziert wurde und die Zelllinien nach 48 h durchflußzytometrisch analysiert wurden. Aus späteren Apoptose-Messungen (vgl. Abb. 4.2.2.4c) wurde allerdings deutlich, daß pEGFP C1 alleine einen deutlichen apoptotischen Effekt auf die Zellen hat. Unter den transfizierten Zellen starben also überproportional viele Zellen, so daß das Verhältnis nicht transfizierter zu transfizierten Zellen nach 48 h zugunsten der nicht transfizierten verschoben wird. Darum ist anzunehmen, daß die hier gemessenen Werte sogar die tatsächliche Transfektionseffizienz noch zu niedrig angeben. Die Transfektionseffizienzen in Normalzellen waren sehr unterschiedlich und bewegten sich in einem Rahmen von nur 5% bis hin zu 30%. Diese Transfektionseffizienz ist außergewöhnlich hoch und war nur unter Verwendung des Transfektionsreagens FuGene zu erreichen. Hierzu gab es bislang keine Vergleichswerte in der Literatur.

5.2.2 Transkriptionelles Targeting in Tumorzellen durch Nutzung der Deregulation des Zellzyklus

Molekulare Veränderungen im Rb-p16-CyclinD1-Weg sind neben p53-Funktionsverlust eines der häufigsten molekularen Ereignisse am G1-S-Kontrollpunkt in Harnblasenkarzinomen (Cordon-Cardo, 1998; Knowles, 1999). Es scheint darum recht sinnvoll, eben diese Aberrationen in Hinblick auf eine tumorspezifische Gentherapie zu nutzen. Offensichtlich führt auch ein Rb-Verlust zu einem selektiven Druck dahingehend, daß das Tumorsuppressorgen p53 ebenfalls inaktiviert wird. Andernfalls würden eben diese Zellen, die nur Rb-Verlust, nicht aber p53-Verlust aufweisen, über den p53-vermittelten Kontroll- und Apoptosemechanismus eliminiert (Lundberg, 1999).

Zu erwarten war, daß aus den Defekten des Rb-Weges eine Überaktivität E2F-abhängiger Promotoren resultierte. Dies wurde auch beobachtet, allerdings mit Einschränkungen. Betrachtet man die relativen Aktivitäten der untersuchten E2F-abhängigen Promotoren in Tumorzelllinien im Vergleich zu Normalzellen, so fällt auf, daß sie im allgemeinen zwar

reproduzierbar über den Aktivitäten in Normalzellen liegen, aber nur mäßig erhöht sind (2 bis 3 fach, maximal 5 fach). Verschiedene Unterschiede sind zwar signifikant, lassen allerdings nicht unbedingt vermuten, daß sich diese Differenzen funktional ausnutzen lassen. Diejenigen Zelllinien, die Rb-Verlust aufweisen (nämlich HT1376 und 5637), zeigten konsistente und die stärksten Aktivitätssteigerungen. Dies legt die Vermutung nahe, daß p16-Verlust (also eine upstream-Veränderung der Rb-Funktion) nicht vollständig die funktionale Aktivität von Rb ausschaltet, so daß die Repression von E2F-abhängigen Promotoren zu einem gewissen Grad erhalten bleibt. Ein zweiter wichtiger Faktor war die Komplexität der Promotoren. Während die "kurzen" Promotoren (E2F, c-mycP2, cycEmin) recht klare Unterschiede ergaben, stellte sich dies bei den komplexeren, längeren Fragmenten (cycEmax, Rb) anders dar. Die Promotoren E2F, c-mycP2 und cycEmin werden im wesentlichen über die betrachtete E2F-Transkriptionsfaktorbindungsstelle reguliert (Mautner, 1995; Botz, 1996; Magnaghi-Jaulin, 1998). Für die Promotoren cycEmax und Rb spielen noch eine ganze Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren eine Rolle, die nur zum Teil charakterisiert sind (Bolz, 1996). Entsprechend fand sich nur in einem einzigen Fall eine signifikante (sehr drastische) Erhöhung in Tumorzellen, nämlich für den cycEmax-Promotor in der Zelllinie 5637. Daraus läßt sich schließen, daß die von einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren regulierten komplexeren Promotoren im allgemeinen in Karzinomzellen gegenüber proliferierenden Normalzellen nicht stärker aktiv sind. Die Aktivität komplexer Promotoren - wie des Rb-Promotors - kann sogar in Karzinomzellen geringer sein als in Normalzellen (vgl. Tab. 4.2.2.1). Somit sind komplexe Promotoren aufgrund ihrer sehr variablen Antwort auf das Zellzyklusgeschehen, Tumordefekte, externe Einflüsse usw. offenbar nicht geeignet, um ein spezifisches Tumortargeting zu erzielen.

In den diskutierten Experimenten wurden Promotoraktivitäten in normalen proliferierenden Zellen gewonnen, wie in der Versuchsanordnung einer transienten Transfektion auch anders nicht möglich. Dies spiegelt aber nicht ganz den natürlichen Fall wider, in dem nur wenige normale Zellen im Urothel proliferieren (<2% unter Standardbedingungen). Darum sollte bei verminderter Proliferation nach Wachstumsfaktorentzug die Aktivität der Promotoren beobachtet werden. Entzog man Normalzellen Wachstumsfaktoren oder sowohl Wachstumsfaktoren als auch Choleratoxin, so war folgendes zu beobachten:

- (1) Die Proliferationsrate in reduziertem Medium war signifikant erniedrigt gegenüber der Proliferationsrate in komplettem Medium.
- (2) Die Apoptoserate in reduziertem Medium war nicht signifikant erhöht gegenüber kompletter Mediumkondition.

(3) Der Proteingehalt war zwar aufgrund seiner sehr starken Schwankungsbreite nicht besonders gut zu messen, nahm aber insgesamt ab.

Für die Tumorzelllinien zeigte sich ein deutlich anderes Bild nach Serumreduktion:

(1) Die Proliferationsrate in reduziertem Medium war nicht signifikant verändert gegenüber der Proliferationsrate in vollständigem Medium.

(2) Die Apoptoserate in reduziertem Medium war signifikant erhöht gegenüber komplettem Medium.

(3) Insgesamt sank der Proteingehalt.

Dies kann man folgendermaßen interpretieren: Während normale Uroepithelialzellen ihre Proliferation einstellen, wenn man dem Kulturmedium Wachstumsfaktoren entzieht, ist die Proliferationsrate von Tumorzellen von externen Stimuli wie Serumzusatz wenig abhängig. Allerdings sterben sie in erhöhtem Maße unter Serumentzug ab. Tumorzelllinien benötigen ein Minimum an Serum zum Überleben, benötigen aber kein externes Wachstumssignal zur Zellzyklusprogression. In Hinblick auf Wachstumsfaktorstimuli unterscheiden sich also die Zelllinien deutlich von Normalzellen.

In den normalen Uroepithelialzellen wirkte sich der Serumentzug deutlich auf die Aktivität der untersuchten E2F-abhängigen Promotoren aus. Für alle Promotorkonstrukte wird die Aktivität um mindestens 50% gesenkt. Dies läßt sich mit den vorangegangenen Experimenten vereinbaren. Da die Normalzellen im wesentlichen aufhören zu proliferieren, wenn dem Medium Wachstumsfaktoren entzogen werden, ist eine Aktivierung E2F-abhängiger Promotoren nicht zu erwarten. In den Tumorzelllinien ergab sich ein etwas anderes Ergebnis. In der Zelllinie SD waren signifikante Aktivitätssteigerungen für die Promotoren E2F, cycEmin und cycEmax zu beobachten, während bei c-mycP2 eine signifikante Aktivitätssenkung auftrat. Dieses Ergebnis ist anhand der bekannten zellzyklusregulatorischen Defekte nicht zu erklären. Für alle anderen Zelllinien ergeben sich im Gegensatz zu Normalzellen schwache oder keine Aktivitätsvermindierungen, die auch nicht signifikant waren. Dies ist vereinbar mit der Beobachtung, daß in den Tumorzellen bei Serumentzug kein Proliferationsstop stattfand.

Die Reexpression von Wildtyp-p53 in Tumorzelllinien führte unabhängig von der Stärke des gewählten Promotors zu einer stark verminderten Anzahl stabiler Klone (vgl. 4.2.2.3) und zu einem raschen Zelltod in den betrachteten Tumorzelllinien (4.2.2.4) unabhängig von der Wahl des Promotors.

Dagegen wurde in Normalzellen durch p53-Reexpression ein Zelltod nur mit den starken Promotoren ausgelöst. Mittels der in dieser Arbeit verwendeten Methodik kann nicht mit Sicherheit der Zelltod auf Apoptose zurückgeführt werden. Sowohl in den p53-transfizierten Zellproben wie auch in der Positivkontrolle wurde in der FACS-Analyse ein hoher Anteil Propidiumiodid-positiver Zellen festgestellt. Dies könnte daraufhindeuten, daß es sich hier auch um Nekrose handelt. Zellpopulationen, die sowohl Propidiumiodid-positiv wie Annexin-V positiv sind, könnten nekrotische Zellen markieren oder aber sehr späte Stadien der Apoptose. Bei Beobachtung der Apoptose über einige Tage hinweg, nimmt in der Regel zunächst der Anteil der Zellen im Quadranten, der Annexin-V positive, aber Propidiumiodid-negative Zellen markiert zu. Danach wird die Population der Annexin-V und Propidiumiodid-positiven Zellen größer. Daher wurde im weiteren Verlauf davon ausgegangen, daß es sich bei den Zellpopulationen, die sowohl Propidiumiodid wie Annexin-V positiv sind um sehr späte Stadien der Apoptose handelt.

Zunächst war es erstaunlich, daß unabhängig von der Wahl des Promotors dieselbe Anzahl stabiler Tumorzelllinien-Klone zu beobachten war. Obwohl der artifizielle E2F-Promotor nur etwa 1/100 der Aktivität des viralen RSV-Promotors erreicht, wurde ungefähr die gleiche Anzahl stabiler Klone gefunden wie für die starken Promotoren, von denen nach bisherigen Befunden auch erwartet wurde, daß eine effiziente Apoptose ausgelöst werden sollte (Makri, 1998). Bislang war aber vermutet worden, daß die Verwendung von schwächeren Promotoren, die ungefähr im physiologischen Bereich der p53-Expression einer Zelle liegen, nicht zu Apoptose, sondern nur zum Proliferationsstop der Tumorzellen führt (Makri, 1998). Das kann hier nicht bestätigt werden. Offensichtlich reichen geringste Mengen Wildtyp-p53 aus, um die Tumorzelllinien mit ihren zahlreichen genomischen Defekten zu eliminieren. Ein Proliferationsstop wurde beobachtet, wenn p53 durch Aktivierung eines Metallothioneinpromotors mit Zn^{2+} -Ionen allmählich induziert wurde. Möglicherweise spielt die Kinetik der Induktion eine wichtige Rolle. Um sicherzustellen, daß die reduzierte Anzahl stabiler Klone tatsächlich auf Expression von p53 zurückzuführen ist, wurde eine p53-Mutante 273 Arginin > Histidin verwandt. Hierbei handelt es sich um eine in Tumoren sehr häufige Mutation (Greenblatt, 1994). Tatsächlich führt eine Transfektion mit mutantem p53 zu einer vergleichbaren Anzahl stabiler Klone wie die einer Promotorkontrolle, so daß man davon ausgehen kann, daß die Reduktion in der Anzahl stabiler Klone tatsächlich auf p53-Expression zurückzuführen ist.

In einer Arbeit dieses Labors (Makri, 1998) wurde bereits beschrieben, daß es unmöglich war, Klone mit stabil exprimiertem Wildtyp-p53 zu isolieren. Hier waren zunächst aber Selektionsmarker und p53-exprimierendes Plasmid auf zwei getrennten Plasmiden transfiziert worden, so daß man einen Selektionsvorteil für die Teilpopulation, die nur das Selektionsplasmid aufgenommen hatte, annehmen können, während die p53 exprimierende Population durch Apoptose eliminiert wurde. In den vorliegenden Experimenten allerdings lag der Selektionsmarker auf demselben episomalen Plasmid. Tatsächlich scheint es einen so starken Druck zu geben, p53 zu eliminieren, daß trotz weiterhin vorhandener Selektionsresistenz p53 cDNA offensichtlich in ca. 50% der Zellen eliminiert wurde. Man könnte vermuten, daß in den verbleibenden 50% der transfizierten Zellpopulationen die p53-Funktion durch Mutation abgeschaltet wurde. Dann sollte man allerdings eine Akkumulation des p53-Proteins im Westernblot sehen (es sei den, es handelt sich um Stop-Mutationen), was nicht der Fall war. Offenbar wird die Expression verhindert. Die genauen Mechanismen dieses Vorgangs wurden hier nicht analysiert, dürften aber für die Mechanismen der Resistenz beim Transfer toxischer Gene insgesamt von Interesse sein.

Sehr deutlich war eine Erhöhung der p53-Proteinmenge 24 h und 48 h nach Transfektion in den Zellen, die mit p53-Konstrukten transfiziert worden waren, nachzuweisen; somit führte das auf dem Plasmid eingeführte p53-Gen tatsächlich zu einem erhöhten Proteinspiegel. Diesen Schluß läßt der direkte Vergleich mit demjenigen Plasmid, das nur den jeweiligen Promotor, nicht aber p53 trägt, zu. Weitere zeigten die Analysen der Zellzählung und des Proteingehalts einen signifikanten Zelluntergang nach 48 h für das virale und das retrotransposale Konstrukt und nach 72 h für den schwächeren E2F-Promotor an. Der Apoptose-ELISA bestätigte zwar die Tendenzen, zeigte aber sehr große Schwankungen, weswegen im weiteren Verlauf die Apoptose mittels Annexin-V über Durchflußzytometrie verfolgt wurde. Außerdem war diese Methode auch für die sehr empfindlichen Normalzellen geeignet. Zunächst war zur Apoptosedetektion auch der Nachweis einer DNA-Nukleosomenleiter versucht worden. Da keine der transfizierten Zellpopulationen eine "DNA-Leiter" zeigten, wurden die Zellen mit Mitomycin in unterschiedlichen Konzentrationen und bis zu 24 Stunden behandelt, was sogar lichtmikroskopisch zu einem fast 100%igen Zellsterben führt. Nach DNA-Isolation (inkl. Medienüberständen) konnte auch hier keine DNA-Leiter nachgewiesen werden, so daß sich diese Methodik für die vorliegenden Zellen sehr schlecht eignet. Eine mögliche Erklärung wäre, daß hier eine DNA-Degradierung ohne DNA-Strangbrüche zwischen den Nukleosomen erfolgt (Oberhammer, 1993; Tomei, 1993). Die Behandlungen mit Fas-aktivierenden Antikörper (CH11), dem DNA quervernetzenden

Cytostatikum Mitomycin oder dem Topoisomerasehemmer Camptothecin wurden als Positiv-Kontrollen bei den weiteren Apoptosenachweisen mittels Annexin-V benutzt, auch diese Agenzien induzierten keine DNA-Leiter. Die Apoptoseanalyse mittels Annexin-V zeigte einen erstaunlich hohen Anteil sterbender Tumorzellen im Falle der Transfektion auch mit dem schwächsten Promotor, E2F. Dieser Anteil lag zu den späteren Zeitpunkten sogar über dem, der durch die starken viralen Promotoren erreicht wurde. Deren Wirkung setzte aber schneller ein. Die hohe Effizienz der p53-Expression bei der Unterdrückung der Klonbildung kommt daher wohl durch die Kombination von effizienter Apoptoseinduktion und anhaltender Wirkung durch die Expression von einem episomalen, replizierenden Plasmid zustande.

Auf der anderen Seite führt die p53-Expression, kontrolliert durch die starken Promotoren (RSV und LINE) zu einer sehr hohen Apoptose in Normalzellen, obwohl man bei diesen Zellen davon ausgehen kann, daß keine Aneuploidie vorliegt. Dies mag durch die Tatsache zu erklären sein, daß die durch diese Promotoren erreichten p53-Expressionsspiegel das physiologische Niveau weit übersteigen. Obwohl p53 ein naheliegendes therapeutisches Gen für Tumorzellen darstellt, muß der Befund, daß Normalzellen durchaus in erheblichen Maße geschädigt werden, bei der Entwicklung von Vektoren beachtet werden. Auf der anderen Seite führt offensichtlich die Expression von p53, die durch den schwachen und damit eher physiologischen Niveaus entsprechenden E2F-Promotor kontrolliert wird, nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Apoptoserate gegenüber der Promotorkontrolle. Dies ist die erwünschte Selektivität. Dabei spielt die absolute Promotorstärke wohl die größere Rolle gegenüber der differentiellen Aktivität zwischen Tumorzellen und Normalzellen, da sowohl VMCub1 als auch HT1376 gleich empfindlich waren. Der gewählte E2F-abhängige Promotor ermöglicht offenbar die Expression von p53 in einem für Normalzellen tolerierbaren Ausmaß. Die Abhängigkeit von E2F könnte allerdings in den sehr aggressiven Rb-defizienten Tumoren die Effizienz der p53-Wirkung verstärken, da etwa 5 fach mehr Protein zu erwarten ist.

Zu beachten ist, daß in allen Fällen die Transfektion an sich offensichtlich einen Streßfaktor für die Zellpopulation bedeutet. Gegenüber untransfizierten Zellen geht ein ganz beachtlicher Prozentsatz von Zellen in die Apoptose (bis zu 10%; vgl. Abb. 4.2.2.4d). Dies scheint stark abhängig zu sein von der Wahl des eingeführten Plasmids. So hat sich bei Verwendung des Plasmids pEGFP C1 gezeigt, daß gegenüber der untransfizierten Kontrolle (0% Annexin positiv) bis zu 34% der Zellen Annexin positiv waren.

Die p53-Wirkung äußerte sich nicht in einer eindeutig veränderten Zellzyklusverteilung gegenüber der Kontrolle (vgl. Abb. 4.2.2.5a). Dies könnte damit erklärt werden, daß die Gesamtzellpopulation, also transfizierte und nicht transfizierte Zellen, in die FACS-Analyse

und Auswertung eingeflossen ist. Da kein spezifischer Selektionsmarker auf den verwendeten Vektoren genutzt wurde, war es nicht möglich, nur transfizierte Zellen in die Analyse einzubeziehen. Dies verfälscht natürlich das Ergebnis der Zellzyklusanalyse. Offensichtlich ist die Apoptose so stark, daß trotz kontaminierender Zellen (bei Normalzellen >70%) ein deutlicher Effekt nachweisbar war, nicht aber in der Zellzyklusanalyse. Bei der sehr guten Transfektionseffizienz von VMCub1 und HT1376 wäre allerdings eine deutliche Akkumulation von Zellen in G1 aufgefallen. Wahrscheinlich überwiegt die apoptotische Wirkung von p53 in diesem Kontext so stark, daß kein Zellzyklusarrest nachgewiesen werden kann. Allerdings scheint dies auch für Normalzellen zu gelten, auch dort wurde kein Anhaltspunkt für Zellzyklusarrest gefunden.

Trotz der hohen Effizienz der Apoptoseinduktion reicht der hier beschriebene Effekt sicherlich nur aus, einen gentherapeutischen Effekt in vivo zu erzielen, wenn eine gute Effizienz des Gentransfers erreicht werden kann. Es wäre also sinnvoll, diesen Ansatz mit einem weiteren Targeting-Ansatz zu verbinden. Gentherapeutische Ansätze müssen wesentlich drei große Probleme beachten. Das erste beinhaltet das Problem des Vehikels, um eine effiziente Transfektion zu gewährleisten, das zweite das Problem des Targetings und das dritte die Effizienz des therapeutischen Effekts. Der in dieser Arbeit behandelte Ansatz bietet ein Konzept für die beiden letztgenannten Problemkomplexe; er nutzt p53 als therapeutisches Gen und einen tumorspezifischen Promotor als Zielrichtung (Targeting). Man könnte das tumorspezifische Targeting verschärfen, indem man den Ansatz verbindet mit Systemen wie ONYX (Khuri, 2000) - einem adenoviralen Vektor, der aufgrund von Mutation von E1B nur in p53-defizienten Zellen repliziert, und dies mit guter Effizienz.

5.2.3 Charakterisierung des humanen LINE-1 Promotors

DNA-Methylierung spielt für die transkriptionelle Regulation in Säugern eine wichtige Rolle. So werden gewebespezifische Gene in den meisten Geweben, in denen sie nicht exprimiert werden, methyliert - und unter anderen dadurch inaktiviert - während sie in den Geweben, wo sie exprimiert werden, unmodifiziert vorliegen (Yeivin, 1993). Dahingegen sind konstitutiv aktive "Housekeeping"-Gene, die eine 5'CpG-Insel tragen, in allen Geweben unmethyliert (Bird, 1986). Es gibt eine Reihe möglicher Mechanismen, auf welche Weise die Genexpression infolge von Methylierung unterdrückt werden kann. Sind z.B. die entsprechenden Transkriptionsfaktorbindungsstellen methyliert, können einige Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden, hierzu zählen: E2F, CREB, AP2, c-Myc/Myn, NF- κ B, cMyb, ETS-2 und PEA-3 (Bergman, 1998). Dahingegen wurde für die Faktoren YY1,

Sp1 und CTF methylierungsunabhängige Bindung gezeigt (Mostoslavsky, 1997). Mindestens ebenso wichtig ist allerdings der Mechanismus über MeCpG-bindende Repressionsproteine, die abhängig von der Methylierungsdichte eine Inaktivierung des Chromatins auslösen können (Bird, 1999). Dieser Mechanismus ist wahrscheinlich beteiligt bei der Inaktivierung von methylierten CpG-Inseln auf dem X-Chromosom, beim Imprinting und bei der Inaktivierung von repetitiven Elementen, wie dem LINE-1 Retrotransposon.

Das humane LINE-1-Element besitzt einen internen Promotor, der erstmals von Swergold 1990 beschrieben wurde. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß die ersten 100 bp absolut notwendig sind für eine transkriptionale Aktivierung und für die volle Aktivität die ersten 668 bp genügen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein anderes LINE-1-Element verwendet (L1.2B), das sich aber in der betrachteten Sequenz nur in 3 Basenpaaren von dem von Swergold et al (1990) verwendeten Element (L1H) unterscheidet. Aus den in dieser Arbeit weitergehenden Deletionsanalysen kann ein Einfluß der 5'-flankierenden Region ausgeschlossen werden, obwohl ein Einfluß dieser Region auf die transkriptionelle Aktivität in Swergold et al, 1990, vermutet wurde und auch andere Beispiele für die Regulation von Retroelementen durch flankierende Sequenzen existieren (Fanning, 1997). Der Promotor des humanen LINE-Elements ist offensichtlich ungewöhnlich. Er verfügt über keine der üblichen Promotorelemente wie z.B. eine TATA-Box und wird noch nicht einmal von Promotorerkennungsprogrammen, wie "PromoterInspector" (Firma Genomatix, München), als Promotor erkannt. Auch die typischen RNA-Polymerase III-Erkennungselemente fehlen. Offensichtlich belegen aber auch die Ergebnisse dieser Arbeit, daß eine erhebliche transkriptionelle Regulation von diesem Element ausgeht. Immerhin war dieser Promotor etwa 10% so stark wie der RSV-LTR oder der frühe CMV-Promotor, die zu den stärksten bekannten gehören. Aus den Ergebnisse dieser Arbeit geht außerdem hervor, daß trotz der Tatsache, daß der CG-Gehalt in dieser Promotorsequenz nicht außergewöhnlich hoch ist, eine in vitro-Methylierung zu einem radikalen Aktivitätsverlust des jeweiligen LINE-Promotorkonstrukts führt. Andererseits zeigte der Promotor - etwas entgegen den Erwartungen - keinerlei Gewebespezifität. Beispielsweise wurde von Casau et al (1999) gezeigt, daß virale HERV-K Gene in Teratokarzinomen stark exprimiert sind, während sie in anderen Geweben und anderen Tumoren gar nicht oder sehr niedrig exprimiert sind. Zusammengefasst bedeutet das, daß die Aktivität des LINE-1 Promotors wahrscheinlich in der Tat entscheidend durch Methylierung kontrolliert wird.

Auch die Transkriptionsfaktoranalyse des LINE-1 Promotors erweist sich als schwierig. So gibt es nur wenige Stellen, die in den diversen Transkriptionsfaktordatenbanken einen Score von über 95 zeigen. Die YY1-Bindungssequenz, die innerhalb der ersten 40 Basenpaare des 5'UTR liegt (+7/+26), wie auch zwei weitere Bindungssequenz-Motive im 5'UTR sind stark konserviert in Primaten (DeBerardinis, 1997). Die Deletion oder Veränderung der YY1-Stelle führt zu einer erheblichen Aktivitätsverminderung (Minakami, 1992; Becker, 1993). Holmes et al, 1994, haben gezeigt, daß einem nachweislich aktiven L1- Element im LRE2-Locus die ersten 21 Basenpaaren des 5'UTR fehlen. Demnach fehlt hier die YY1-Consensus-Sequenz; das Element ist aber transkriptionell aktiv. Dadurch kommen Zweifel an der Relevanz der YY1-Bindungssequenz auf. Außerdem liegt im Bereich +373-661 bp offensichtlich eine weitere wichtige Transkriptionsfaktorbindungsstelle. Diese Stelle wurde bereits als funktionale Transkriptionsfaktorbindungsstelle von Tchénio et al (2000) nachgewiesen, es binden Mitglieder der SOX-Familie, vornehmlich SOX11. Die Ergebnisse mit den in dieser Arbeit angefertigten Deletionskonstrukten passen zu diesen Daten. Auch liefern verschiedene Transkriptionsfaktordatenbanken in diesem Abschnitt außer den YY1- und SRY/SOX-Bindungsstellen keine weiteren mit einem sehr hohen Score (>93). Die Tatsache allerdings, daß eine Deletion jeglicher der 4 HpaII-Erkennungsstellen einen sehr deutlichen Aktivitätsverlust mit sich führt, obwohl außer der ersten (neben der YY1-Stelle) keine in unmittelbarer Umgebung einer Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle liegt, läßt vermuten, daß ein wesentlich komplexerer Regulationsmechanismus vorliegt als nur die Wirkung von YY1 und SOX-Faktoren.

Der 5'UTR Bereich endogener LINE-1-Elemente ist in normalen somatischen Zellen hypermethyliert (Woodcock, 1988; Crowther, 1991; Jürgens, 1996; Woodcock, 1997; Florl, 1998); Demethylierung durch den Methylase-Inhibitor 5-AzaC führte zur spezifischen Transkription der L1-Sequenzen (Woodcock, 1997). Außerdem führte in vitro Methylierung mittels Sss1-Methylase an allen CpG-Dinukleotiden des 5'UTR Bereichs in vivo und in vitro zu einer Verminderung der transkriptionellen Aktivität (Hata, 1997). Somit ist der inhibitorische Effekt der Methylierung auf die transkriptionelle Aktivität ähnlich wie bei anderen Genen (Jones, 1999). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, daß bereits in vitro Methylierung der vier HpaII-Stellen im LINE-1-Promotor zu einem starken Aktivitätsverlust führte (vgl. Tab. 4.2.3.4). Der Aktivitätsverlust lag bei 50-95%. Dabei ließ sich keine Abhängigkeit vom Zelltyp feststellen. In Normalzellen, Harnblasenkarzinomzelllinien und einer Nierenzellkarzinomzelllinie trat in gleichem Maße Aktivitätsverlust auf. Der

inhibitorische Effekt von in vitro Methylierung zeigte somit keinen Unterschied zwischen Normalzellen und Tumorzellen.

Nach den vorliegenden Ergebnissen unterscheiden sich die Aktivitäten des LINE-Promotors in Tumorzellen nicht von denen in Normalzellen. Vielmehr erwies sich die Aktivität des Promotors als so konstant, daß er hervorragend zur Standardisierung benutzt werden konnte. Die konstant hohe Aktivität von komplexen viralen Promotoren (wie des RSV-LTR oder des CMV Early Promotors) in verschiedenen Zelltypen kommt durch ihren modularen Aufbau zustande: Sie enthalten Bindungsstellen für ubiquitäre Transkriptionsfaktoren, jedoch auch Bindungsstellen für verschiedene gewebespezifische Faktoren. Wenn die konstant hohe Aktivität des LINE-1 Promotors auf einem ähnlichen Prinzip beruhte, würde man erwarten, daß bei Elimination einzelne Bereiche Unterschiede in der Aktivierung in verschiedenen Zellen zutage treten würden. Dies wurde nur in einem einzigen Fall beobachtet, nämlich bei Deletion der SRY-Bindungsstelle (+471/+477; vgl. Abb. 4.2.3.3b Bild E). Es erwies sich daher als unmöglich, aus dem Promotor Module für eine tumorspezifische Expression zu isolieren. In vitro-Methylierung hatte denselben inhibitorischen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität des Elements in Tumor- wie Normalzellen. Dies zeigt, daß es trotz der massiven Unterschiede im Ausmaß der DNA-Methylierung zwischen Normal- und Tumorzellen keinen evidenten Unterschied in der Effizienz der durch Methylierung ausgelösten Repression gibt - sicherlich nicht in einer Größenordnung, die für ein Targeting zu nutzen wäre.

In Hinblick auf einen transkriptionellen Targeting-Ansatz könnte man noch folgenden Ansatz verfolgen: Transfiziert man Tumorzelllinien und Normalzellen mit in vitro methylierten episomalen Konstrukten, die ein therapeutisches Gen tragen, so könnten die Tumorzellen die Fähigkeit besitzen, aufgrund der Aktivierung von Demethylase, aktiv die Plasmidsequenzen zu demethylieren und damit das therapeutische Gen zu aktivieren. Diese Eigenschaft haben normale somatische Zellen nicht, da Demethylase nicht exprimiert wird. Ob Tumorzellen dies tun, ist nicht bekannt, doch wäre dies eine Erklärung für die genomweite Hypomethylierung der DNA (Ehrlich, 2000). Transfiziert man in-vitro methylierte episomale Konstrukte, wie LINE-Rep7, in die Tumorzelllinien, so würde man - vorausgesetzt, Tumorzellen würden effizient die in vitro-methylierten Sequenzen demethylieren - eine Mischung von drei Zellarten erwarten:

(1) Zellen, die nicht transfiziert wurden; (2) Zellen, die sämtliche 4 HpaII-Stellen noch methyliert tragen oder einzelne, aber nicht alle Stellen demethyliert haben; (3) Zellen, die vollständig alle 4 HpaII-Stellen demethyliert haben.

Benutzt man die Promotorkontrolle (Promotor, ohne therapeutisches Gen), so sollten sich aus den letztgenannten Zellen bei Selektion stabile Klone isolieren lassen. Leider stellte sich bei diesem Experiment heraus, daß zu keinem Zeitpunkt (1 Tag bis 2 Wochen) nicht nur in p53-transfizierten Kulturen, sondern auch in Promotorkontrollen hygromycinresistenten Klone zu isolieren waren. Das könnte damit zu begründen sein, daß die Hygromycinresistenz durch die Methylierung einer Anzahl von HpaII Stellen in der Promotorregion des Hygromycinresistenzgens verloren gegangen ist.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich der humane LINE-1 Promotor zunächst nicht zum tumorspezifischen Gentargeting eignet. Er zeigt eine zelltyp- und tumorunabhängige konstante Expressionshöhe und läßt sich sogar als Standard verwenden. In vitro Methylierung der im Promotor vorhandenen 4 HpaII-Stellen führt zu einer drastischen transkriptionellen Repression, so daß mittels Methylierung das Element transkriptionell zu regulieren ist. Unterschiede in der Expression von LINE-1 Sequenzen zwischen Normal- und Tumorzellen sind daher wahrscheinlich auf Unterschiede in der DNA-Methylierung zurückzuführen.

6. Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit betrachteten Zelllinien stellen in gewisser Weise ein artifizielles System dar. Sie haben den großen Vorteil, daß sie molekular weitgehend charakterisiert sind, einfach zu handhaben sind, und Material in unbeschränktem Ausmaß zur Verfügung steht. Aufgrund dessen eignen sie sich besonders für die Etablierung eines wie hier beschriebenen therapeutischen Ansatzes. Dennoch gibt es Nachteile. Die Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit stets mit nicht immortalisierten primär kultivierten Normalzellen verglichen. Der natürliche Vergleich zu nicht immortalisierten primär kultivierten Normalzellen wäre eine Primärkultur von nicht immortalisierten Urotheltumoren. Außerdem werden die vorliegenden Zelllinien zum Teil seit vielen Jahren in Kultur gehalten; es häufen sich genetische Veränderungen an, so daß die Zelllinien unter Umständen nicht mehr den Status eines primär kultivierten Tumors widerspiegeln. Es gibt auch Hinweise darauf, daß die meisten Harnblasenkarzinomzelllinien vorzugsweise einen bestimmten Subtypus fortgeschrittener Harnblasenkarzinome repräsentieren (Bruch, 2000). Nachdem der Ansatz zur tumorspezifischen Expression von p53 nun im Modell etabliert wurde, wäre es jetzt sinnvoll, die Kultur von Tumoren zu etablieren und die Untersuchungen anhand primär kultivierter Tumoren mit definierter Histologie zu wiederholen. Wünschenswert wäre natürlich ein gleichzeitiges molekulares Profiling der verwendeten Tumore. Hierdurch könnten therapeutische Effekte mit den verschiedenen molekularen Defekten korreliert werden.

Bei gentherapeutischen Ansätzen müssen drei wesentliche Problemkomplexe beachtet werden: die Wahl eines sinnvollen Vehikels, das Problem des tumorspezifischen "Targeting" und die Wahl des therapeutischen Gens. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden letztgenannten Komplexe behandelt. Durch die Wahl eines zellzyklusabhängigen Promotors, der in Tumorzellen stärker aktiviert ist als in Normalzellen, wurde ein Lösungsansatz für tumorspezifisches Targeting beschrieben und durch die Wahl des Apoptose-regulierenden p53-Gens ein therapeutisches ebenfalls mit Tumorpräferenz Gen gewählt. Dieses Modell könnte durch die geeignete Wahl eines Vehikels weiterverfolgt werden. Denkt man an einen therapeutischen Einsatz dieses Ansatzes, so ist die Anwendung liposomaler Transfektionen aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienzen in vivo zur Zeit sicherlich nicht sinnvoll. Hier könnte man beispielsweise ONYX-Viren (Khuri, 2000) verwenden. Dadurch würde ein tumorspezifisches Targeting eventuell verschärft, da diese Viren nur in p53 defizienten Zellen replizieren.

Während der in dieser Arbeit entwickelte "zellzyklus-spezifische" Ansatz zumindest gangbar erscheint, ergaben sich aus dem "methylierungsspezifischen" Ansatz keine entsprechende Möglichkeiten. Es wurde aber evident, daß der LINE-1 Promotor eine sehr grundlegende Untersuchung verdient. Hierzu wäre sicherlich zunächst zu klären, welche Transkriptionsfaktoren tatsächlich für die Aktivierung des humanen LINE-Promotors von Bedeutung sind. Auch wäre die bislang nicht geklärte Abhängigkeit von RNA-Polymerase II oder III eingehend zu untersuchen. Der Mechanismus der Promotoraktivität scheint nach den sich aus der Arbeit ergebenden Ergebnissen durchaus wesentlich komplexer zu sein, als es bislang aus der Literatur bekannt ist. Des weiteren kann durch die spezifische Methylierung der im Promotor vorhandenen HpaII-Stellen offensichtlich eine massive Aktivitätsverminderung stattfinden. Darum müßte ein System etabliert werden, aus dem hervorgeht, welches Ausmaß an Methylierung zur Inaktivierung führt, und umgekehrt, in welchem Umfang die Tumorzellen aktiv die in vitro spezifisch methylierten Sequenzen demethylieren können. Daraus könnte sich noch ein Targeting ergeben. Die Ergebnisse der Arbeit unterstreichen in jedem Falle aber die zentrale Bedeutung der DNA-Methylierung bei der Kontrolle der Retrotransposonaktivierung in Säugetierzellen.

7. Zusammenfassung

Ein zentrales Problem der Tumorthherapie ist die Selektivität. Eine Möglichkeit, Tumorzellen selektiv zu zerstören, besteht in der Expression eines toxischen Gens mit einem tumorspezifischen Promotor. P53 ist ein Tumorsuppressor, dessen Funktionsverlust in vielen Tumoren das Entstehen von Aneuploidien erlaubt und die Apoptosefähigkeit herabsetzt. Die Wiederherstellung der p53-Funktion induziert daher in vielen Tumorzellen Apoptose.

In der vorliegenden Arbeit sollte am Modell von Harnblasenkarzinom-Zelllinien und kultiviertem Normalurothel ein Promotor entwickelt werden, der tumorspezifisch die Expression des für Tumorzellen besonders toxischen Wildtyp-p53-Gens steuern kann. Hiermit sollte der Unterschied in der Wirkung von p53 auf Normal- und Tumorgewebe weiter verstärkt und eine Schädigung des Normalgewebes vermieden werden. Bei der Entwicklung des tumorselektiven Promotors sollten weitere häufige Defekte im Harnblasenkarzinom ausgenutzt werden, nämlich die Inaktivierung des G1-S-Kontrollpunktes durch verschiedene Aberrationen im Rb-p16-CyclinD1-Pathway und die fast immer über das gesamte Genom hinweg verminderte DNA-Methylierung, die u.a. die Promotorsequenzen von Retroelementen wie LINE-1 erfasst. Auf diese Weise sollte die toxische Wirkung der Reexpression von p53 besonders auf die Tumorzellen gerichtet sein, die sich durch besonders starke Defekte in der Zellzyklusregulation bzw. der DNA-Methylierung auszeichnen.

In einer vorgeschalteten Analyse wurden insgesamt 109 Harnblasenkarzinome auf p53-Mutationen hin untersucht. In 37% der Tumorproben wurden Mutationen in der die DNA-Bindungsdomäne von p53 betreffenden Region gefunden. Diese Mutationsrate korreliert mit der Akkumulation von p53 in den Tumorzellen.

Im Hauptteil der vorliegenden Arbeit wurde ein zellzyklusabhängiger Promotor dazu verwendet, p53 in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen Uroepithelialzellen zu reexprimieren. E2F-abhängige Promotoren zeigen in den untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien eine 2-5 fach erhöhte Aktivität gegenüber normalen Uroepithelialzellen. Die Reexpression von p53 von einem E2F-abhängigen führte zu einem sehr effizienten Zelltod von Tumorzellen, aber nicht von normalen Uroepithelialzellen. Dahingegen führt die Reexpression von p53 durch virale oder Retroposon-Promotoren zu erheblichen Apoptoseraten sowohl in Tumor- wie in Normalzellen. Nach diesen Ergebnissen erlaubt die Expression von Wildtyp-p53 von einem E2F-abhängigen, relativ schwachen Promotor eine selektive Induktion von Apoptose in Harnblasenkarzinomzellen gegenüber

normalen Urothelzellen. Diese beruht wahrscheinlich wesentlich auf dem relativ niedrigen Expressionsniveau; v.a. bei Tumoren mit vollständigem Verlust von Rb könnte jedoch auch ein deutlicher Anstieg der Promotorstärke hinzukommen.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- (1) In Tumorzelllinien mit Defekten im Rb-p16-CyclinD1-Pathway und zum Teil stark erhöhten E2F-Proteinmengen erreichten E2F-abhängige Promotoren in transienten Luziferaseexpressionsversuchen eine 2-5 fach höhere Aktivität gegenüber Normalzellen. Dieser Effekt war am stärksten in Zelllinien mit komplettem Rb-Verlust und am eindeutigsten für kürzere Promotoren, die in ihrer Aktivität wesentlich von E2F abhingen.
- (2) Ein Entzug von Wachstumsfaktoren bewirkte einen Proliferationsstop in Normalzellen und eine Verminderung der Aktivität E2F-abhängiger Promotoren um mind. 50%. Dagegen hatte bei Tumorzelllinien ein Serumentzug keinen Effekt auf die Proliferation, führte aber zu vermehrter Apoptose. Bis auf die Zelllinie SD waren E2F-abhängige Promotoren in den Tumorzelllinien weitgehend unabhängig vom Serumgehalt.
- (3) Die Reexpression von p53 durch einen E2F-abhängigen, einen Retroposon- oder einen viralen Promotor führte unabhängig von der Art des zellzyklusregulatorischen Defekts in allen Tumorzelllinien zu einer drastischen Abnahme der Anzahl stabiler Klone. Konstrukte mit mutantem p53 verminderten die Anzahl stabiler Klone nicht.
- (4) Etwa die Hälfte der nach Transfektion von p53 überlebenden Klone hatten nach PCR-Analysen das eingeführte p53-Gen verloren. Die anderen exprimierten p53 offenbar nicht, da weder p53 noch sein Zielprotein p21^{CIP1} im Westernblot vermehrt auftraten.
- (5) 24 h und 48 h nach Transfektion von p53-Konstrukten war in Karzinomzelllinien eine wesentlich stärkere p53-Expression gegenüber der Promotorkontrolle zu detektieren. Die Anzahl adhärenter Zellen und der Proteingehalt waren 48 h und 72 h nach Transfektion von p53 unter der Kontrolle eines viralen (RSV) oder retrotransposalen (LINE) Promotors signifikant vermindert. Die Wirkung von p53 unter der Kontrolle eines E2F-abhängigen Promotors war zeitlich verzögert aber ansonsten vergleichbar.
- (6) FACS-Analysen der Apoptoserate über Annexin-V Bindung demonstrierten, daß die Expression von Wildtyp-p53 durch einen E2F-abhängigen Promotor in Tumorzelllinien zu einem effizienten Zelltod führte; normale Zellen überlebten dagegen. Die Expression von Wildtyp-p53 durch die stärkeren (viralen oder retrotransposalen) Promotoren löste sowohl in Tumorzellen wie in Normalzellen effizient Zelluntergang aus.

In einem zweiten Ansatz wurde der Promotor des humanen LINE-1 Elements verwendet. Dieser zeigte weder als Ganzes noch partiell Unterschiede in der Aktivität zwischen Tumorzellen und normalen Zellen. Auch in-vitro-DNA-Methylierung führte zu keiner Differenz. In-vitro-Methylierung des Promotors führte zu einer drastischen Aktivitätsverminderung sowohl in allen Harnblasenkarzinomzelllinien als auch in normalen Uroepithelialzellen. Die früher beobachtete erhöhte Expression von LINE-1 Sequenzen in Harnblasenkarzinomzellen ist daher wahrscheinlich nicht auf Zelltypspezifität des Promotors, sondern auf unterschiedliche DNA-Methylierung zurückzuführen.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- (1) Der LINE-1 Promotor war zelltyp- und tumorunabhängig etwa 10 fach schwächer als der starke virale CMV-Promotor.
- (2) Für die volle Aktivität des humanen LINE-1 Promotors waren die ersten 660 bp des Elements notwendig. Dieser Promotor zeigte keine Tumorpräferenz. Deletion einer SRY-Bindungsstelle (+471/+477) führte in 4/6 der untersuchten Zelllinien zu einem Aktivitätsverlust. Überraschend verminderte Mutation jeder der 4 HpaII-Erkennungsstellen die Promotoraktivität.
- (3) In vitro Methylierung des LINE-1 Promotors führte zu drastischer Aktivitätsverminderung sowohl in Tumorzelllinien wie auch in normalen Zellen. Die Effizienz der Repression durch DNA-Methylierung ist demnach in Harnblasenkarzinomzellen gegenüber normalen Zellen nicht verändert.

8. Statistischer Anhang: Nichtparametrische Tests

- **Auswertung der p53-Mutationsanalyse: Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest, Fisher-Test, Mantel-Haenszel-Test**

Bei der Durchführung des Chi-Quadrat Unabhängigkeitstest wird die Nullhypothese überprüft, ob zwei oder mehr Klassifizierungen voneinander unabhängig sind. Dabei wird von einem sehr großer Stichprobenumfang ausgegangen. Außerdem wird vorausgesetzt, daß die Objekte zufällig voneinander gewählt wurden. Die Verteilung der beiden Testvariablen ist dabei ohne Bedeutung (verteilungsfreies Testverfahren). Der Chi-Quadrat-Wert errechnet sich aus

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^l [(f_{ij} - e_{ij})^2 / e_{ij}]$$

f_{ij} : beobachtete Häufigkeiten

e_{ij} : erwartete Häufigkeiten

k: Spaltenzahl in der Kreuztabelle

l: Zeilenzahl in der Kreuztabelle.

Hieraus wird ersichtlich, daß er aufgrund der beschränkten Datenmenge nur bestimmte Werte annehmen kann. Allerdings wird für die Signifikanzberechnung mit kontinuierlichen Verteilungen verglichen. Darum sind kleine Stichprobenumfänge problematisch. Für kleine Stichprobenumfänge sollte darum der Chi-Quadrat-Wert nur als Annäherung angesehen werden und entweder eine Stetigkeitskorrektur nach Yates vorgenommen werden oder der exakte Test von Fisher gerechnet werden. Dieser ist ein Permutationstest. Der Rechenaufwand dieses Tests ist wesentlich größer und läßt sich im allgemeinen nur mittels entsprechender statistischer Programmprozeduren berechnen. Eine weitere Abwandlung des Chi-Quadrat-Tests ist der Mantel-Haenszel-Test. Hier wird bei Auftreten mindestens dreier Klassen davon ausgegangen, daß eine davon die Ausprägung einer anderen beeinflussen könnte. Insbesondere bei Datenklassen, die nach einer "Graduierung" eingeteilt wurden (z.B. Tumorstadien) und bei dem man erwarten kann, daß in Abhängigkeit dieser Graduierung ein bestimmtes Merkmal auftritt (z.B. p53-Mutation), ist die Berechnung des Mantel-Haenszel-Tests sinnvoll.

- **Auswertung der Expressionsdaten: t-Test, Rangsummentests (Wilcoxon-Test, Mann-Whitney-U-Test, Kolmogorov-Smirnov-Test)**

Bei der Durchführung eines t-Tests wird die Nullhypothese, ob zwei Klassen derselben Grundgesamtheit entstammen, geprüft. Zulässig ist dieser Test aber nur dann, wenn die Meßwerte zufällig gewählt werden und normal verteilt sind. Bei nicht gepaarten Tests müssen zusätzlich die Varianzen gleich groß (homogen) sein. Die Bedingung der Normalität läßt sich in den in dieser Arbeit vorliegenden Probenumfängen nur sehr unzulänglich prüfen, und das Ergebnis wäre äußerst unzuverlässig (die Wahrscheinlichkeit, einen Fehler 2. Art zu machen, wird sehr groß). Auch für den F-Test zur Homogenität der Varianzen gilt, daß die Zuverlässigkeit bei kleinen Proben nicht sehr groß ist. Da der t-Test sehr "robust" ist, d.h. er gibt auch bei Verletzung der Voraussetzung annähernd richtige Resultate, ist es gerechtfertigt, als Annäherung diesen durchzuführen. Falls die Daten deutlich von einer Normalverteilung abweichen, kann man auf andere nichtparametrische (verteilungsunabhängige) Prüfverfahren zurückgreifen. Diese beruhen auf Permutationen der Daten, die durch Ränge ersetzt werden (Wilcoxon und Mann-Whitney-U-Test stimmen im vorliegenden Fall mathematisch überein). Beim Mann-Whitney-U-Test wird die Hypothese über die Lage der statistischen Verteilungen basierend auf Rangsummen geprüft. Außerdem wurde in einigen Fällen der Kolmogorov-Smirnov Anpassungstest durchgeführt, wobei die Nullhypothese überprüft wird, ob eine beobachtete empirische Verteilungsfunktion an eine erwartete theoretische Verteilungsfunktion angepaßt werden kann. In den vorliegenden Ergebnissen verschwinden eine ganze Reihe von Signifikanzen dadurch; die Daten sind wahrscheinlich nicht normalverteilt.

Für die t-Test-Statistik wurden kritische Werte mittels der Formel:

$$t' = [\mu_1 - \mu_2] / SD_{\mu_1 - \mu_2}$$

$$SD_{\mu_1 - \mu_2} = \sqrt{[SD_1^2/n_1 + SD_2^2/n_2]}$$

bestimmt. Die Freiheitsgrade wurden mittels der Formel:

$$v = [SD_1^2/n_1 + SD_2^2/n_2]^2 / [(SD_1^2/n_1)^2/(n_1-1) + (SD_2^2/n_2)^2/(n_2-1)]$$

berechnet, wobei μ_i = arithmetischer Mittelwert; SD_i = Standardabweichung; n_i = Anzahl der unabhängigen Versuchswiederholungen; $\{1,2\}$ $\forall i$; t' = kritischer Wert; v = Freiheitsgrad

Der Effekt der Formel besteht darin, daß bei Proben mit größerer Varianz und geringerer Anzahl von Beobachtungen weniger Freiheitsgrade erhalten werden, wodurch es schwieriger ist, eine Signifikanz zu erhalten.

Im folgenden wird die t-Verteilung für die Signifikanzniveau-Stufen $p=0,05$ und $p=0,01$ angegeben. FG= Freiheitsgrad

FG	p		Beispiel:
	0.05	0.01	
1	12,71	63,66	Die Wahrscheinlichkeit, bei 5 Freiheitsgraden einen t-Wert zu finden, dessen absoluter Betrag größer als 2,571 ist, beträgt 5%.
2	4,303	9,925	
3	3,183	5,841	
4	2,776	4,604	
5	2,571	4,032	
6	2,447	3,707	
7	2,635	3,499	
8	2,306	3,355	

9. Literaturverzeichnis

- Afford S, Randhawa S
Apoptosis
J Clin Pathol Mol Pathol 53:55-63, 2000
- Alves G, Kawamura MT, Nascimento P, Maciel C, Oliveira JA, Teixeira A, Carvalho Md
DNA release by line-1 (L1) retrotransposon. Could it be possible?
Ann N Y Acad Sci 906:129-33, 2000
- Alves G, Tatro A, Fanning T
Differential methylation of human LINE-1 retrotransposons in malignant cells
Gene 176, 39-44, 1996
- Amati B, Alevizopoulos K, Vlach J
Myc and the cell cycle
Front Biosci 15:D250-68, 1998
- Ara S, Lee PSY, Hansen MF, Saya H
Codon-72 polymorphism of the Tp53 gene
Nucl. Acids Res 18: 4961, 1991
- Asker C, Wiman KG, Selivanova G
p53- induced apoptosis as a safeguard against cancer
Biochem Biophys Res Commun 265(1):1-6, 1999
- Ballestar E, Wolffe AP.
Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression.
Eur J Biochem 268:1-6, 2001
- Becker KG, Swergold GD, Ozato K, Thayer RE
Binding of the ubiquitous nuclear transcription factor YY1 to a cis regulatory sequence in the human LINE-1 transposable element
Human Molecular Genetics 2:1697-1702, 1993
- Bender CM, Jones PA
Molecular Genetics in Carcinoma of the Bladder
Buchartikel in: Carcinomas of the Bladder, Springer-Verlag, 1998
- Bergman Y, Mostoslavsky R
DNA Demethylation: Turning Genes on
Biol Chem 379:401-407, 1998
- Bernardin S, Adesse G-L, Billerey C, Chezy E, Carbillet J-P, Bittard H
Immunohistochemical Detection of p53 protein overexpression versus gene sequencing in urinary bladder carcinomas
Urology 162:1496-1501, 1999
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M
A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA
Nature 397:579-583, 1999
- Bird AP
CpG rich islands and the function of DNA methylation
Nature 321:209-213, 1986
- Bird AP, Wolffe AP.
Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin.
Cell 24:451-4, 1999
- Bookstein R, Shew JY, Chen PL, Scully P, Lee WH
Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene
Science 247: 712-715, 1990
- Botz J, Zerfass-Thome K, Spitkovsky D, Delius H, Vogt B, Eilers M, Hatzigeorgiou A, Jansen-Durr P.
Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter
Mol Cell Biol 16:3401-9, 1996
- Bouchard C, Staller P, Eilers M
Control of cell proliferation by Myc
Trends Cell Biol 8:202-6, 1998
- Brady HJM, Salomons GS, Bobeldijk RC, Berns AJM
T cells from baxalpha transgenic mice show accelerated apoptosis in response to stimuli but do not show restored DNA damage-induced cell death in the absence of p53. gene product
EMBO J 15:1221-1230, 1996

- Bratthauer GL, Fanning TG
Active LINE-1 retrotransposons in human testicular cancer
Oncogene 7(3):507-10, 1992
- Bruch J, Schulz WA, Haussler J, Melzner I, Bruderlein S, Moller P, Kemmerling R, Vogel W, Hameister H
Delineation of the 6p22 amplification unit in urinary bladder carcinoma cell lines
Cancer Res 60:4526-30, 2000
- Cairns P, Procter, AJ, Knowles MA
Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma
Oncogene 6:2305-9 1991
- Cairns, P, Tokino, K, Eby, Y, Sidransky, D
Localization of tumor suppressor loci on chromosome 9 in primary human renal cell carcinomas
Cancer Res 55:224, 1995
- Casau AE, Vaughan JE, Lozano G, Levine AJ
Germ cell expression of an isolated human endogenous retroviral long terminal repeat of the HERV-K/HTDV family in transgenic mice
J Virol 73:9976-83, 1999
- Chang C, Simmons DT, Martin MA and Mora PT
Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells
J Virol 31 463-471, 1979
- Chaubert P, Guillou L, Kurt AM, Bertholet MM, Metthez G, Leisinger HJ, Bosman F, Shaw P
Frequent p16^{INK4a} (MTS1) gene inactivation in testicular germ cell tumors.
Am J Pathol 151: 859-865, 1997
- Christoph F, Schmidt B, Schmitz-Dräger BJ, Schulz WA
Over-expression and amplification of the c-myc gene in human urothelial carcinoma
Int J Cancer, 84(2):169-73, 1999
- Clasen S, Schulz WA, Gerharz CD, Grimm MO, Christoph F, Schmitz-Dräger BJ
Frequent and heterogenous expression of cyclin-dependent kinase inhibitor WAF1/p21 protein and mRNA in urothelial carcinoma
British J of Cancer 77: 515-521, 1998
- Cordon-Cardo C, Waringer D, Petrilak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuk SG, Reuter VE
Altered expression of the retinoblastoma gene product is a prognostic indicator in bladder cancer
J Natl Cancer Inst 84: 1251-1256, 1992
- Cordon-Cardo C.
Molecular alterations in bladder cancer
Cancer Surv 32:115-31, 1998
- Cross SM, Sanchez CA, Morgan MK, Schimke MK, Ramel S, Idzerda RL, Raskind WH, Reid BJ
A p53-dependent mouse spindle checkpoint
Science 267:1353, 1995
- Crowther PJ, Doherty JP, Linsenmeyer ME, Williamson MR, Woodcock DM
Revised genomic consensus for the hypermethylated CpG island region of the human L1 transposon and integration sites of full length L1 elements from recombinant clones made using methylation-tolerant host strains
Nuc Acids Res 19: 2395-2401, 1991
- Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Zhang Z, Sarkis AS, Fair WR, Cordon-Cardo C
Molecular genetic alterations of chromosome 17 and p53 nuclear overexpression in human bladder cancer
Diagn Mol Pathol 2:4-13, 1993
- DeBerardinis RJ, Kazazian HH, Jr
Full-length L1 elements have arisen recently in the same 1-kb region of the gorilla and human genomes
J Mol Evol 45:424-436, 1997
- DelSenno, L, Maestri, I, Piva, R, Hanau, S, Reggiani, A, Romano, A, Russo, G,
Differential hypomethylation of the c-Myc protooncogene in bladder cancers at different stages and grades
J Urol 142: 146-149 1989
- Dix BR, O'Carroll SJ, Myers CJ, Edwards SJ, Braithwaite AW
Efficient induction of cell death by adenoviruses requires binding of E1B55k and p53
Cancer Res 15:2666-72, 2000
- Dyson N
The regulation of E2F by pRB-family proteins
Genes & Development 12: 2245-2262, 1998

- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow, E
The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product
Science 243:934-937, 1989
- Ehrlich M
DNA hypomethylation and cancer
in: DNA alterations in cancer, Ehrlich M (ed)
Eaton Publishing, Natick MA, 2000
- Eid H, Institoris E, Geczi L, Bodrogi I, Bak M
mdm-2 expression in human testicular germ-cell tumors and its clinical value.
Anticancer Res 19:3485-90, 1999
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B
WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression
Cell 75(4):817-25, 1993
- Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen S-C, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA and Cote RJ:
Accumulation of Nuclear p53 and Tumor Progression in Bladder Cancer.
New Engl J Med 331:1259-1264, 1994.
- Esrig D, Spruck CH III, Nichols PW et al
p53 nuclear accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer
Am J Pathol 143:1457-1462, 1992
- Fanning T, Alves G
A family of repetitive DNA sequences in Old World primates
Gene 199:279-82, 1997
- Felix CA, Brown DL, Mitsudomi T, Ikagadi N, Wong A, Wasserman R, Womer RB, Biegel JA
Polymorphism at codon 36 of the p53 gene
Oncogene 9: 327-328, 1994
- Felley-Bosco E, Weston A, Cawley HM, Bennett WP, Harris CC
Functional studies of the germ-line polymorphism at codon-47 within the p53 gene
Am J Hum Genet 53: 752-759; 1993
- Florl AR
Diplomarbeit an der Heinrich-HeineUniversität Düsseldorf (Biologie), 1998
- Florl AR, Franke KH, Niederacher D, Gerharz CD, Seifert HH, Schulz WA
DNA methylation and the mechanisms of CDKN2A inactivation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder
Lab Invest 80:1513-22, 2000
- Florl AR, Lower R, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA
DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas
Br J Cancer. 80(9):1312-21, 1999
- Franke KH, Miklosi M, Goebell P, Clasen S, Steinhoff C, Anastasiadis AG, Gerharz C, Schulz WA
Cyclin-dependent kinase inhibitor P27(KIP1) is expressed preferentially in early stages of urothelial carcinoma
Urology 56:689-95, 2000
- Friend SH, Bernards R, Rogeli S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryta TP
A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma
Nature 323: 643-646, 1986
- Fujimoto K, Yamasa, Y, Okajima, E et al
Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer
Cancer Res 52:1393-8, 1993
- Gao X, Chen YQ, Wu N, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT, Honn KV
Somatic mutations of the WAF1/CIP1 gene in primary prostate cancer
Oncogene 22:1395-1398, 1995
- Goodrich DW, Lee WH
Abrogation by c-myc of G1 phase arrest induced by RB protein but not by p53
Nature 360:177-179, 1992
- Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY HP, Lee WH
The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle
Cell 67: 293-302, 1991

- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC
Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis
Cancer Res 54: 4855-4878, 1994
- Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B
Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma
Hum Genet. 83(2):155-8, 1989
- Grimm MO, Jurgens B, Schulz WA, Decken K, Makri D, Schmitz-Drager BJ
Inactivation of tumor suppressor genes and deregulation of the c-myc gene in urothelial cancer cell lines
Urol Res 23:293-300, 1995
- Grimm O
Rb und p53 Veränderungen in urothelialen Karzinomzelllinien
Dissertation, Medizin, HHU Düsseldorf, Deutschland, 1996
- Gruis, NA, Weaver-Feldhaus, J, Liu, Q, Frye, C, Eeles, R, Orlow, I, Lacombe, L, Ponce-Castaneda, V, Lianes, P, Latres, E, Skolnick, M, Cordon-Cardo, C, Kamb, A,
genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumor suppression
Am J Pathol 146:1199, 1995
- Habuchi T, Ogawa O, Kakehi Y, Ogura K, Koshiba M, Hamazaki S, Takahashi R, Sugiyama T, Yoshida O:
Accumulated Allelic Losses in the Development of Invasive Urothelial Cancer.
Int J Cancer 53:579-584, 1993
- Habuchi T, Ogawa O, Kakehi Y, Ogura K, Koshiba M, Sugiyama T, Yoshida O
Allelic loss of chromosome 17p in urothelial cancer: strong association with invasive phenotype
J Urol 148:1595-9, 1992
- Habuchi T, Takahashi, R, Yamada, H et al:
Influence of cigarette smoking and schistosomiasis on p53 gene mutation in urothelial cancer
Cancer Res 53:3795-9, 1993
- Hainaut P, Hernandez A, Robinson P, Rodriguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, Harris CC, Montesano R,
IARC database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools
Nucleic Acids Res 26: 205-213, 1998
- Hainaut P, Soussi T, Shomer B, Hollstein M, Greenblatt M, Hovig E, Harris CC, Montesano R
Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updates compilation and future prospects
Nucl Acids Res 25: 151-157, 1997
- Harbour JW, Dean DC
Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis
Nature Cell Biology 2: E65-E67, 2000
- Harbour JW, Dean DC
The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms
Genes Dev 14:2393-409, 2000
- Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ
Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC
Science 241: 353-357, 1988
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ
The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases
Cell 75(4):805-16, 1993
- Harris CC
p53 Tumor suppressor gene: from basic research laboratory to the clinic- an abridged historical perspective
Carcinogenesis 17: 1187-1198, 1996
- Hartwell LH
Synchronization of haploid yeast cell cycles, a prelude to conjugation;
Exp Cell Res 76:111-7, 1973
- Hata K, Sakaki Y
Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation
Gene. 189(2):227-34, 1997
- Henrikson M, Lüscher B
Proteins of the Myc Network: Essential Regulators of Cell Growth and Differentiation
Adv in Cancer Res 68,110, 1996
- Hollstein M, Moeckel G, Hergenhahn M, Spiegelhalder B, Keil M, Werle-Schneider G, Bartsch H, Brickmann J,

On the origins of tumor mutations in cancer genes: insights from the p53 gene
Mutat Res 405:145-154, 1998

- Hollstein M, Shomer B, Grenblatt M et al
 Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation
Nucl Acids Res 24: 141-146, 1996
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC
 p53 mutations in human cancers
Science 253(5015):49-53, 1991
- Holmes SE, Dombroski BA, Krebs CM, Boehm CD, Kazazian HH Jr
 A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion
Nat Genet. 7(2):143-8, 1994
- Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP
 LNCaP model of human prostatic carcinoma
Cancer Res. 43(4):1809-18, 1983
- Horowitz, J.M., et al
 Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumour cells
Proc Natl Acad Sci USA 87:2775-2779, 1990
- Hsieh CL
 Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation
Mol Cell Biol 19(1):46-56, 1999
- Hsieh CL
 In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b
Mol Cell Biol 19(12):8211-8, 1999
- Hueper, WC, Wiley FH, Wolfe HD
 Experimental production of bladder tumors in dogs by administration of beta-naphthylamine
J Ind Hyg Toxicol 20:46-84, 1938
- Hussain SP, Harris CC,
 Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes
Cancer Res 58:4023-4037, 1998
- Inoshita S, Terada Y, Nakashima O, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F
 Roles of E2F1 in mesengial cell proliferation in vitro
Kidney Int 56:2085-95, 1999
- Jahnson S, Karlsson MG
 Tumor mapping of regional immunostaining for p21, p53, and mdm2 in locally advanced bladder carcinoma
Cancer 2000 89:619-29
- Jarrad, DF, Bova, GS, Ewing, CM, Pin, SS, Nguyen, SH, Baylin, SB, Cairns, P, Sidransky, D, Herman, JG, Isaacs, WB
 Deletional, mutational, and methylation analyses of CDKN2 (P16/MTS1) in primary and metastatic prostate cancer
Genes Chromosom Cancer 19: 90-96, 1997
- Jones PA
 The DNA methylation paradox
Trends Genet 15:34-37, 1999
- Jones PL, Wolffe AP
 Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression
Semin Cancer Biol 9:339-47, 1999
- Jost JP, Bruhat A
 The formation of DNA methylation patterns and the silencing of genes
Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 57: 217-248, 1997
- Jost JP, Siegmann M, Sun LJ, Leung R
 Mechanisms of demethylation in chicken embryos-purification and properties of a 5-methylcytosine-DNA glycosylase
J Biol Chem 270: 9734-9739, 1995
- Jürgens B, Schmitz-Dräger BJ, Schulz WA
 Hypomethylation of L1 LINE sequences prevailing in human urothelial carcinoma
Cancer Res 56:5698-703, 1996
- Kawasaki T, Tomita Y, Bilim V, Takeda M, Takahashi K, Kumanishi T
 Abrogation of apoptosis induced by DNA-damaging agents in human bladder-cancer cell lines with

- p21/waf1/cip1 and /or p53 gene alterations
int J Cancer 68, 501-505, 1996
- Kazazian HH Jr
Mobile elements and disease
Curr Opin in Gen & Dev 8:343-350, 1998
 - Kazazian HH Jr, Moran JV
The impact of L1 retrotransposons on the human genome
Nat Genet 19:19-24, 1998
 - Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L et al
A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer
Nat Med 6: 879-85, 2000
 - Kimberland, ML, Divoky V, Prchal J, Schwahn U, Berger W, Kazazian HH Jr
Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells
Hum Mol Genetics 8: 1557-1560, 1999
 - Knowles MA
Molecular genetics of bladder cancer
Br J Urology 75 Suppl 1: 57-66, 1995
 - Knowles MA
The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application
BJU Int 84:412-27, 1999
 - Knowles MA, Elder PA, Williamson M et al
Allelotype of human bladder cancer
Cancer Res 54:531-8, 1994
 - Kress M, May E, Cassingena R and May P
Simian Virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 serum
J. Virol. 31: 472-483, 1979
 - Kurose K, Hata K, Hattori M, Sakaki Y
RNA polymerase III dependence of the human L1 promoter and possible participation of the RNA polymerase II factor YY1 in the RNA polymerase III transcription system
Nucl Acids Res 23: 3704-3709, 1995
 - Kusek JC, Greene RM, Nugent P, Pisano MM
Expression of E2F family of transkription factors during murine development
Int J Dev Biol 44: 267-277, 2000
 - Laird PW, Jaenisch R
The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics
Annu Rev Genet 30:441-64, 1996
 - Lane DP and Crawford LV
T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells
Nature 278: 261-263, 1979
 - Lane DP
Cancer: p53, guardian of the genome
Nature 358:15, 1992
 - Leonhardt H, Bestir TH
Structure, function and regulation of mammalian DNA methyltransferase
In: Jost PJ, Saluz HP (ed.) DNA methylation: molecular biology and biological significance
Birkhauser Verlag, Basel, Schweiz, 1993
 - Levine AJ
p53, the Cellular gatekeeper for growth and division
Cell 88:323-331, 1997
 - Li WH, Gu Z, Wang H, Nekrutenko A
Evolutionary analyses of the human genome
Nature 409: 847-849, 2001
 - Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, Xiong Y,
Cell cycle expressio n and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21
Oncogene 9:2261-2268, 1994
 - Linzer DIH and Levine AJ
Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and in infected embryonal carcinoma cells
Cell 1: 43-52, 1979

- Lipponen PK
Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value
Int J Cancer 53: 368-370, 1993
- Lloyd AC
p53: only ARF the story
Nature Cell Biology 2: E48-E50, 2000
- Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Sahin A, Orodenez N, Benedict WF
Altered expression of the retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer
J Natl Cancer Inst 84: 1256-1261, 1992
- Lohmann DR
RB1 gene mutations in retinoblastoma
Hum Mutat 14:283-8, 1999
- Ludlow JW
SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated memembr of the retinoblastoma susceptibility gene product family
Cell 56:57-65, 1989
- Lundberg AS, Weinberg RA
Control of the cell cycle and apoptosis
Eur J Cancer. 35(14):1886-94, 1999
- Macleod K
pRb and E2f-1 in mouse development and tumorigenesis
Current Op Gen & Dev 9:31-39, 1999
- Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I, Robin P, Lorain S, Le Villain JP, Troalen F, Trouche D, Harel-Bellan A
Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase
Nature. 391(6667):601-5, 1998
- Makri D
Zellzyklusregulation durch p53 und WAF1/p21 bei urothelialen Karzinomzelllinien
Dissertation (MatNat), Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Deutschland, 1997
- Makri D, Schulz WA, Grimm MO, Clasen S, Bojar H, Schmitz-Dräger BJ
WAF1/p21 regulates proliferation, but does not mediate p53-dependent apoptosis in urothelial carcinoma cell lines
Int J Oncol 12: 621-628, 1998
- Malkowicz SB, Tomaszewski JE, Linnenbach AJ, Cangiano TA, Maruta Y, McGarvey TW
Novel p21WAF1/CIP1 mutations in superficial and invasive transitional cell carcinomas
Oncogene, 3(9):1831-7, 1997
- Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellegrini S, Bertacca G, Chella A, Merlo G, Angeletti CA, Palma PD, Bevilacqua G
P21 RNA and protein expression in non-small cell lung carcinomas: Evidence of p53-independent expression and association with tumoral differentiation
Oncogene 12:1319-1324, 1995
- Mautner J, Joos S, Werner T, Eick D, Bornkamm GW, Polack A
Identification of two enhancer elements downstream of the human c-myc gene
Nucleic Acids Res. 23(1):72-80, 1995
- Mazar GR, Jeantur P, Lynch HT Lenoir G, Theillet C
Nucleotid Sequence polymorphism in a hotspot mutation region of the p53 gene
Oncogene 7: 781-782; 1992
- Melero JA, Stitt DT, Mangel WF and Carroll RB
Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in simian virus 40-infected and transformed cells
J. Virol 93: 466-480, 1979
- Merlo A, Gabrielson E, Mabry M, Vollmer R, Baylin, SB, Sidransky D
Homozygous deletion on chromosome 9p and loss of heterozygosity on 9p, 6p and 6q in primary human small cell lung cancer,
Cancer Res 54:2322-2325, 1994
- Miki Y, Nishisho I, Horii A, Miyoshi Y, Utsunomiya J, Kinzler KW, Vogelstein B, Nakamura Y
Disruption of the APC gene by retrotransposon insertion of L1 sequence in a colon cancer
Cancer Res 52: 643-645, 1992
- Minakami R, Kurose K, Etoh K, Furuhashi Y, Hattori M, Sakaki Y
Identification of an internal cis-element essential for the human L1 transcription and a nuclear factor(s)

binding to the element

Nuc Acids Res 20: 3139-3145, 1992

- Miyake H, Hara I, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S
The significance of lymphadenectomy in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract
Br J Urol. 82(4):494-8, 1998
- Miyake H, Hara I, Gohji K, Yamanaka K, Arakawa S, Kamidono S.
Enhancement of chemosensitivity in human bladder cancer cells by adenoviral-mediated p53 gene transfer
Anticancer Res. 18(4C):3087-92, 1998
- Miyamoto H, Shuin T, Iwasaki Y, Kubota Y
Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer
Br J Cancer 71:831, 1995
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewski M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC
Oncogene 9: 1799-1805, 1994
- Moran JV, Holmes SE, Naas TP, DeBerardinis RJ, Boeke JD, Kazazian HH
High Frequency Retrotransposition in Cultured Mammalian Cells
Cell 87: 917-927, 1996
- Morgan RJ, Newcomb PV, Hardwick RH, Alderson D
Amplification of cyclin D1 and MDM-2 in oesophageal carcinoma
Eur J Surg Oncol 25:364-7, 1999
- Morse B, Rothberg PG, South VJ, Spandorfer JM, Astrin SM
Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma
Nature 355: 87-90, 1988
- Mostoslavsky R, Bergman Y
DNA methylation: regulation of gene expression and role in the immune system
Biochimica et Biophys Acta 1333, F29-F50, 1997
- Mowat MRA
p53 in tumor progression: life, death, and everything
Adv Cancer Res 74:25-48, 1998
- Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau J, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Maples P, Romel L, Randlev B, Reid T, Kaye S, Kim D
Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial
Cancer Res 60:6359-66, 2000
- Nielsen LL, Maneval DC
p53 tumor suppressor gene therapy for cancer
Cancer Gene Therapy 5: 52-63, 1998
- Nordeen SK
Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers
Biotechniques. 6(5):454-8, 1988
- Obaya AJ, Mateyak MK, Sedivy JM
Mysterious liaisons: The relationship between c-Myc and the cell cycle
Oncogene 18, 2934-2941, 1999
- Oberhammer F, Fritsch G, Schmied M, Pavelka M, Printz D, Purchio T, Lassmann H, Schulte hermann R
Condensation of chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease
J Cell Sci 104: 317-326, 1993
- Oltvai ZN, Milliman CL, Kormeyer SJ
Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.
Cell 74:609-619, 1993
- Orntoft TF, Wolf H
Molecular alterations in bladder cancer
Urol Res 26: 223-33, 1998
- Owen-Schaub L, Chan H, Cusack JC, Roth J, Hill LL.
Fas and Fas ligand interactions in malignant disease
Int J Oncol 17:5-12, 2000
- Pardee AB
A restriction point for control of normal animal cell proliferation;
Proc Natl Acad Sci U S A 71:1286-90, 1974

- Pellegrini M, Strasser A
A portrait of the Bcl-2 protein family: life, death, and the whole picture
J Clin Immunol 19:365-77, 1999
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B
A model for p53-induced apoptosis
Nature 389: 300-305, 1997
- Presti JC, Reuter VE, Galan T, Fair WR, Cardon-Cardo C
Molecular genetic alterations in superficially and locally advanced human bladder cancer
Cancer Res 51: 5405-5409, 1991
- Prives C, Hall PA
The p53 Pathway
J Path 187:112-126, 1999
- Pucci B, Kasten M, Giordano A
Cell cycle and apoptosis
Neoplasia 2:291-9, 2000
- Quinn AG, Sikkink S, Rees JL
Delineation of two distinct deleted regions on chromosome 9 in human nonmelanoma skin cancers
Genes Chromosomes Cancer 1:222-126, 1994
- Rabbani F, Cordon-Cardo C
Mutation of cell cycle regulators and their impact on superficial bladder cancer
Urol Clin North Am 27:83-102, 2000
- Rabbani F, Richon VM, Orlow I, Lu ML, Drobnjak M, Dudas M, Charytonowicz E, Dalbagni G, Cordon-Cardo C
Prognostic significance of transcription factor E2F-1 in bladder cancer: genotypic and phenotypic characterization
J Natl Cancer Inst 91:874-81, 1999
- Razin A
Replacement of 5-methylcytosine by cytosine: a possible mechanism for transient DNA methylation during differentiation
Proc Natl Acad Sci USA 83:2827-2831, 1986
- Reed JC, Zha H, Aime-Sempe C, Takayama S, Wang HG,
Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death
Adv Exp Med Biol 406, 99-112, 1996
- Rehn L
Blasengeschwülste bei Fuchsinarbeitern
Arch Klin Chir 50: 588-600, 1895
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH
Defying death after DNA damage
Nature 407:777-83, 2000
- Rieger KM, Little AF, Swart JM, Kastrinakis WV, Fitzgerald JM, Hess DT, Libertino JA, Summerhayes IC
Human bladder carcinoma cell lines as indicators of oncogenic change relevant to urothelial neoplastic progression
Br J Cancer. 1995 Sep;72(3):683-90
- Riggs AD
DNA methylation and cell memory
Cell Biophys. 15(1-2):1-13, 1989
- Roy B, Beamon J, Balint E, Reisman D
Transactivation of the human p53 tumor suppressor gene by c-Myc/Max contributes to elevated mutant p53 expression in some tumors.
Mol. Cell Biol 14:7805-7815, 1994
- Ruas M, Peters G
The p16^{INK4a}/CDKN2A tumor suppressor and its relatives
Biochimica et Biophys Acta 1378: F115-F177, 1998
- Sardi I, Dal Canto M, Bartoletti R, Guazzelli R, Travaglini F, Montali E
Molecular genetic alterations of c-myc oncogene in superficial and locally advanced bladder cancer
Eur Urol 33:424-30, 1998
- Sardi I, Dal Canto M, Bartoletti R, Montali E
Abnormal c-myc oncogene DNA methylation in human bladder cancer: possible role in tumor progression
Eur Urol 31:224-230 1997

- Sarkis AS, Dalbagni, G, Cordon-Cardo
Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cells bladder carcinoma: a marker for disease progression
J Natl Cancer Inst 85:53-9, 1993
- Sauter G, Carroll P, Moch H, Kallioniemi A, Kerschmann R, Narayan P, Mihatsch MJ, Waldman FM
c-myc copy number gains in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization
Am J Pathol 146:1131-9, 1995
- Schmitz-Drager BJ, Kushima M, Goebell P, Jax TW, Gerharz CD, Bultel H, Schulz WA, Ebert T, Ackermann R
p53 and MDM2 in the development and progression of bladder cancer
Eur Urol 32:487-93, 1997
- Schultz, DC, Vanderveer, L, Buetow, KH, Boente, MP, Ozols, RF, Hamilton, TC, Godwin, AK
Characterization of chromosome 9 in human ovarian neoplasia identifies frequent genetic imbalance on 9q and rare alterations involving 9q including CDKN2
Cancer Res 55:2250, 1995
- Schulz WA
DNA methylation in urological malignancies
Int J Oncol 13: 151-167, 1998
- Schulz WA, Ebling B, Hasse A, Zenke F, Breunig K
Highly efficient transactivation by the yeast Kluyveromyces lactis transcription factor LAC9 and its inhibition by the negative regulator GAL80 in mammalian cells
Biol Chem Hoppe Seyler 374:313-8, 1993
- Sheen F, Sherry ST, Risch GM, Robichaux M, Nasidze I, Stoneking M, Batzer MA, Swergold GD
Reading between the LINEs: Human Genomic Variation Induced by LINE-1 Retrotransposition
Genome Res 10: 1496-1508, 2000
- Sherr CJ
The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited
Cancer Res 60:3689-3695, 2000
- Shiohara, M, El Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, Chen DL, Vogelstein B, Koeffler HP
Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies
Blood 84: 3781-3784, 1994
- Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P
Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples.
Science 252:706-9, 1991
- Siegfried Z, Eden S, Mendelsohn M, Feng X, Tsuberi BZ, Cedar H
DNA methylation represses transcription in vivo
nature genetics 22: 203-206, 1999
- Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T, Kamel D
p53 immunohistochemistry in transitional cell carcinoma and dysplasia of the urinary bladder correlates with disease progression
J Natl Cancer Inst 85:1029-1035, 1993
- Southgate J, Hutton KAR, Thomas DFM, Trejdosiewicz LK
Normal Human Urothelial Cells in vitro: Proliferation and Induction of Stratification
Lab Invest 71: 583-594, 1994
- Spruck III, CH, Rideout, III WM, Olumi AF
Distinct pattern of p53 mutations in bladder cancer: relationship to tobacco usage
Cancer Res 53:1162-6, 1993
- Swergold GD
Identification, Characterization, and Cell Specificity of Human LINE-1 Promoter
Mol Cell Biol 10: 6718-6729, 1990
- Swisher JA, Rand E, Cedar H, Pyle AM
Analysis of putative RNase sensitivity and protease insensitivity of demethylation activity in extracts from rat myoblasts
Nucleic Acids Res 26: 5573-5580, 1998
- T'Ang A, Varley JM, Chakraborty S, Murphree AL, Fung YKT
Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma
Science 242: 263-266, 1988

- Taschenbuch der Statistik
Hrsg. W. Voß
Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, München, Wien
- Tchénio T, Casella JF, Heidmann T
Members of the SRY family regulate the human LINE retrotransposons
Nuc Acids Res 28: 411-415, 2000
- Thayer RE, Singer MF, Fanning TG
Undermethylation of specific LINE-1 sequences in human cells producing a LINE-1-encoded protein
Gene 133:273-7, 1993
- TNM Classification of Malignant Tumours
UICC International Union Against Cancer
Springer Verlag, New York, 1997
- Tomei LD, Shapiro JP, Cope FO
Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage
Proc Natl Acad Sci USA 90: 853-857, 1993
- Uroonkologie
Herausgeber: E. Rübber
Springer Verlag 2000
- Vairapandi M, Duker NJ
Enzymic removal of 5-methylcytosine from DNA by a human glycosylase
Nuc Acids Res 21:5323-5327, 1993
- Venkatachalam S, Yu-Ping Shi, Stephen N. Jones, Hannes Vogel, Allan Bradley, Dan Pinkel, and Lawrence A. Donehower
Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation
EMBO J 17: 4657-4667, 1998
- Wada T, Louhelainen J, Hemminki K, Adolfsson J, Wijkstrom H, Norming U, Borgstrom E, Hansson J, Sandstedt B, Steineck G
Bladder cancer: allelic deletions at and around the retinoblastoma tumor suppressor gene in relation to stage and grade
Clin Cancer Res 6:610-5, 2000
- Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP
Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation
Nat Genet 23:62-6, 1999
- Wagner HP
Cell cycle control and cancer
Indian J Pediatr 65:805-14, 1998
- Wagner P, Simanis V, Maimets T, Keenan E, Addison C, Brain R, Grimaldi M, Sturzbecher HW, Jenkins J
A human tumour-derived mutant p53 protein induces a p34cdc2 reversible growth arrest in fission yeast
Oncogene. 6(9):1539-47, 1991
- Watanabe H, Fukuchi K, Takagi Y, Tomoyasu S, Tsuruoka N, Gomi K
Molecular analysis of the Cip1/Waf1 (P21) gene in diverse types of human tumors
Biochim Biophys Acta 1263: 275-280, 1995
- Weinberg RA
The retinoblastoma protein and cell cycle control
Cell 81: 323, 1995
- Weiss A, Keshet I, Razin A, Cedar H
DNA methylation in vitro: involvement of RNA
Cell 86: 709-718, 1996
- Whyte P
Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins binds to the retinoblastoma gene product
Nature 334:124-129, 1988
- Williams RD
Human urologic cancer cell lines
Inv Urology 17: 359-363, 1980
- Williamson MP, Elder PA, Knowles MA
The Spectrum of TP53 Mutations in Bladder Carcinoma
Genes, Chromosomes & Cancer 9:108-118, 1994

- Williamson, MP, Elder, PA, Shaw, ME, Devin J, Knowles, MA, p16 /CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer Hum Mol Genet 4:1569, 1995
- Wolffe AP, Jones PL, Wade PA. DNA demethylation. Proc Natl Acad Sci U S A 96:5894-6, 1999
- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. Science 286:481-6, 1999
- Woodcock DM, Lawler CB, Linsenmeyer ME, Doherty JP, Warren WD Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon J Biol Chem 272: 7810-7816, 1997
- Woodcock DM, Williamson MR Doherty JP A sensitive RNase Protection Assay to detect transcripts from potentially functional human endogenous L1 retrotransposons Biochem Biophys Res Comm 222: 460-465, 1996
- Xu H, Cairns P, Hu S, Knowles MA, Benedict WF Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression Int J Cancer 53: 781-784, 1993
- Yeager, T, Stadler W, Belair, C, Puthenveetil, J, Olopade, O, Reznikoff, C, Increased p16 levels correlate with pRb alterations in human urothelial cells Cancer Res 55:493, 1995
- Yeivin A, Razin A Gene methylation patterns and expression in DNA methylation in: Molecular Biology and Biological Significance, JP Jost; HP Saluz (eds); Basel, Schweiz: Birkhäuser Verlag: 524-568
- Yoder, JA, Walsh, CP, Bestor, TH Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites Trends Genet 13:335-340, 1997
- Zhan Q, Fan S, Bae I, Guillouf C, Liebermann DA, O'Connor PM, Fornace AJ Jr Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis Oncogene 9: 3743-3751, 1994

10. Abkürzungen

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BPE	Bovine Pituitary Extract
BSA	Rinder-Serum-Albumin
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CMV	Cytomegalievirus
del	Deletion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Flow associated cell sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GFP	Green Fluorescent Protein
IPTG	Isopropyl-beta-D1-thiogalactopyranosid
KSFM	Keratinozyten Serum Freies Medium
LB	Luria- Bertani- Medium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfoxid-Flourid
Pol II bzw. III	RNA-Polymerase II bzw. -III
RSV	Rous Sarcoma Virus
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SDS	Natriumdodecylsulphat
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TBE	Tris-Borat-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TK	Thymin Kinase
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

11. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W.A. Schulz für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. E. Knust danke ich für die Übernahme des Koreferats, für die Unterstützung und Diskussionen.

Prof. Dr. R. Ackermann möchte ich für den Einsatz für das wissenschaftliche Forschungslabor der Urologischen Klinik, sowie sein Interesse und verschiedene Unterstützungen danken und Prof. Dr. B.J. Schmitz-Dräger für die immunhistochemischen Auswertungen und das Überlassen der Zelllinien. Den Kolleginnen und Kollegen der urologischen Klinik danke ich für die Bereitstellung von Gewebe- und Blutproben.

Für die Einführung in die FACS-Analyse und Hilfe bei den Auswertungen gilt mein Dank Frau Dr. G. Reichmann aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie.

Desweiteren bedanke ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen aus der Urologie, Kinderklinik und Statistik für Hilfestellungen und Diskussionen:

Frau Dr. U. Brosius, Frau A. Prior, Frau C. Hader, Herrn Dr. S. Santourlidis, Frau S. Swiatkowski, Frau Dr. B. Schmidt, Herrn Dr. F. Kimura, Frau Dipl.-Biol. A.R. Florl, Frau Dipl.-Biol. M. Biermanns, Herrn Dipl.-Biol. T. Dehmel, Herrn Dr. P. Roehrig, Herrn Dr. J. Rahmenführer, Herrn Dr. C-D. Meyer, Frau Dipl.-Psych. J. Illian, Herrn K.H. Franke, Herrn Dr. H.H. Seifert, Herrn A. Radzewitz

Herrn Dr. D. Burde danke ich für die stete und aufmunternde Unterstützung während der Arbeit.

Meinen Eltern (Frau R. Steinhoff, Herr G. Steinhoff) und Schwestern (A. und B. Steinhoff) möchte ich besonders für den familiären Rückhalt danken und meinen Eltern für die stete Unterstützung und Förderung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Die Durchführung der Arbeit wurde unterstützt durch die Stiftung VERUM und die Studienstiftung des Deutschen Volkes.