

**Aus dem Pathologischen Institut der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**Direktor: Prof. Dr. H. E. Gabbert**

Analysen zur Expression und Mutation des  
Antimetastasierungsgens nm23 in humanen  
Nierenkarzinomzelllinien und epitheloiden  
Sarkomen

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

Oliver Petek

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Labisch, M.A.

Dekan

Referent: PD Dr. med. Engers

Korreferent: Prof. Dr. Dall

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	4
Einheiten	6
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2. Ziel der vorliegenden Arbeit</b>	<b>11</b>
<b>3. Material</b>	<b>12</b>
3.1. Chemikalien (Bezugsquellenverzeichnis)	12
3.2. Lösungen und Puffer	13
3.3. Kits (Inhalt und Bezugsquellenverzeichnis)	14
3.4. Oligonukleotide	15
3.4.1. Primer für nm23-H1	16
3.4.2. Primer für nm23-H2	16
3.4.3. Primer für $\beta$ -Aktin	17
<b>4. Methoden</b>	<b>18</b>
4.1. Zellkultur	18
4.2. DNA-RNA-Doppelextraktion	19
4.2.1. RNA-Aufarbeitung	20
4.2.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	21
4.2.3. Formamid/Formaldehyd RNA-Gelelektrophorese	21
4.2.4. DNA-Aufarbeitung	22
4.3. Reverse Transkription	23
4.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
4.4.1. Überprüfung der RT durch PCR für $\beta$ -Aktin	25

4.4.2.	PCR von nm23-H1 und nm23-H2	25
4.4.3.	Agarosegelelektrophorese	28
4.5.	Geextraktion von nm23-H2	29
4.6.	Aufbereitung der PCR-Produkte zur Sequenzierung	30
4.7.	Sequenzierung	30
4.8.	Sequenzvergleich zwischen humanen und nicht humanen nm23-Genen	32
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
5.1.	Gewinnung der cDNA und Nachweis der Expression von $\beta$ -Aktin mittels PCR	33
5.2.	PCR für nm23-H1 und nm23-H2	34
5.2.1.	PCR zur Amplifikation von nm23-H1	34
5.2.2.	PCR zur Amplifikation von nm23-H2	36
5.3.	Sequenzierungen von nm23-H1 und nm23-H2	38
5.3.1.	Sequenzierung von nm23-H1	38
5.3.2.	Sequenzierung von nm23-H2	41
5.3.3.	Zusammenfassung der Sequenzierungsergebnisse	44
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>50</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>51</b>

Danksagung

Lebenslauf

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
a. bidest.	aqua bidestillata (2 x destilliertes Wasser)
awd	abnormal wing discs
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
clearCa	klarzelliges Nierenzellkarzinom
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
ddNTP	2'-3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum
G	Guanin
HCl	Salzsäure
m	männlich
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Mio.	Millionen
MMLV	Moloney murine leukemia virus
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NDPK	Nukleosiddiphosphatkinase
nm23	nonmetastatic clone #23

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Template Suppression Reagent
UV	Ultraviolett
w	weiblich

## Einheiten

°C	Grad Celsius
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pM	picomolar
sec	Sekunden
U	Unit (Enzymeinheit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

## **1. Einleitung**

Die Häufigkeiten der für den Tod maßgeblichen Krankheiten werden in Deutschland durch die Todesursachenstatistik erfaßt. An erster Stelle stehen dabei mit knapp 50% aller Todesfälle die Krankheiten des Herz- und Kreislaufsystems. An zweiter Stelle stehen bereits bösartige Neubildungen, deren Häufigkeit als Todesursache ein stetes Wachstum in dieser Statistik verzeichnet.

Das Nierenzellkarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Niere und macht etwa 3% aller bösartigen Erkrankungen des Menschen aus. Das Nierenzellkarzinom tritt bei Männern häufiger auf als bei Frauen (m:w  $\approx$  2:1). In der Regel zeigt es keine Frühsymptome, sondern macht sich erst spät durch unspezifische Symptome wie Schmerzen und Abgeschlagenheit, durch Hämaturie oder durch lokale (Flankenschmerz, Organfunktionsstörung) und systemische (Tumoranämie, paraneoplastisches Syndrom) Komplikationen bemerkbar. Aufgrund dieser fehlenden Symptomatik erfolgt die Diagnosestellung häufig relativ spät, so daß bei etwa 25% der betroffenen Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits hämatogene Fernmetastasen zu finden sind (Herold, 2001). Das Nierenzellkarzinom metastasiert auf hämatogenem Weg vor allem in Lunge, Skelettsystem, Leber und Gehirn, wobei die Metastasierung bei Einbruch des Tumors in die Vena renalis früh eintreten kann. Lymphogene Metastasen zeigen sich insbesondere paracaval, paraaortal und iliacal. Den Einfluß der Metastasierung auf die Prognose der Patienten veranschaulicht die 5-Jahres-Überlebensrate: So beträgt diese bei Patienten ohne Metastasierung 65% (Müller, 2002/03), bei Patienten mit Fernmetastasierung dagegen unter 5% (Herold, 2001).

Der Therapieerfolg ist somit eng mit der Frage nach dem Vorliegen von Metastasen verknüpft. Während Tumoren ohne Metastasen in der Regel gut operabel sind, ist die Therapie metastasierter Nierenzellkarzinome wenig erfolgreich, da sich Radiatio (Aref et al., 1997) und Zytostatikatherapie (Amato, 2000) als außerordentlich ineffektiv erwiesen.

Ein weiterer maligner Tumor, der ebenfalls häufig metastasiert und dann kaum erfolgreich therapiert werden kann, ist das epitheloide Sarkom (Prat et al., 1978, Chase & Enzinger, 1985).

Das epitheloide Sarkom ist ein aggressiver Weichteiltumor, der erstmals 1970 als Tumorentität beschrieben wurde (Enzinger, 1970) und dessen Histogenese auch heute noch nicht abschließend geklärt ist. Auch gibt es bisher nur wenige experimentelle Untersuchungen zu diesem Tumor, da es bis dato nur in drei Fällen gelang, permanente Zelllinien dieses Tumors zu etablieren (Reeves et al., 1987, Gerharz et al., 1990, Sonobe et al., 1993). Eine dieser Zelllinien, die Zelllinie GRU-1, wurde von Prof. Gerharz (Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) 1990 etabliert (Gerharz et al., 1990). Aus dieser epitheloiden Sarkomzelllinie wurden drei klonale Subpopulationen isoliert (GRU-1A, GRU-1B, GRU-1C), welche sich sowohl morphologisch, als auch zellbiologisch stark voneinander unterscheiden (Engers et al., 1994). Insbesondere zeigen diese Zelllinien Unterschiede in der Expression epithelialer, mesenchymaler und neuronaler Differenzierungsmarker, Unterschiede im Invasions- und Proliferationsverhalten, sowie Unterschiede in der Sensitivität für Retinsäure und den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (Engers et al., 1994, 1996, 1999).

Das entscheidende Merkmal maligner Tumoren ist ihre Fähigkeit, Metastasen in anderen Organen zu bilden. Zellbiologisch handelt es sich dabei um einen außerordentlich komplexen Prozeß, der sich in viele Einzelschritte untergliedern läßt (Engers & Gabbert, 2000). Am Anfang dieser sogenannten Metastasierungskaskade steht das Herauslösen einzelner Tumorzellen aus dem Primärtumor und das Einwandern dieser Tumorzellen in das angrenzende Gewebe, die sogenannte Tumorinvasion. Der Tumorinvasion folgt der Einbruch der Tumorzellen in das Blut- oder Lymphgefäßsystem (Intravasation). Mit Hilfe des Blut- oder Lymphstroms werden die Tumorzellen passiv in entfernt gelegene Organe verschleppt, wo sie in der Mikrozirkulation arretiert werden. Anschließend verlassen die Tumorzellen aktiv das Gefäßsystem (Extravasation) und invadieren das Zielorgan (Invasion). Die Invasion des Zielorgans führt aber nicht notwendigerweise zur Entwicklung klinisch manifester Metastasen. So können invadierte Tumorzellen durch das Immunsystem eliminiert werden oder für mehrere Jahre in einem Ruhezustand verharren (sogenannte tumor dormancy). Allerdings ist es möglich, daß ruhende Tumorzellen nach ganz unterschiedlich langen Zeitintervallen durch distinkte Signale aus der Umgebung zur

verstärkten Proliferation veranlaßt werden und dann zu klinisch manifesten Metastasen heranwachsen können.

Auf molekularer Ebene sind viele unterschiedliche Gene und Genprodukte wie Cadherine, Integrine, Proteasen und Wachstumsfaktoren in die Regulation der Tumordinvasion und Metastasierung involviert (Engers & Gabbert, 2000).

Bei der Suche nach differentiell zwischen stark metastasierenden und schwach metastasierenden Melanomzellen der Maus exprimierten Gene wurde erstmalig das Gen nm23 beschrieben (Steeg et al., 1988). Dieses Gen war in schwach metastasierenden Melanomzellen wesentlich stärker exprimiert als in stark metastasierenden Melanomzellen.

Das humane nm23-Gen (nm23-H1) wurde 1989 von Rosengard et al. entdeckt. Daß auch nm23-H1 als Antimetastasierungs-gen wirkt, kann abgeleitet werden von Studien am Beispiel des Mammakarzinoms, in denen eine geringe Expression von nm23-H1 mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen (Bevilaqua et al., 1989) bzw. mit einer schlechten Prognose der Patientinnen (Barnes et al., 1991) assoziiert war.

Im Gegensatz hierzu existieren jedoch auch Untersuchungen, in denen eine inverse Korrelation zwischen der nm23-Expression und dem Vorliegen von Metastasen bzw. einer schlechten Prognose nicht nachweisbar war. Sowohl bei Patienten mit Neuroblastomen (Hailat et al., 1991; Leone et al., 1993) als auch bei Patienten mit Pankreas- (Nakamori et al., 1993) und Bronchialtumoren (Engel et al., 1993) war eine starke Expression von nm23 sogar mit einer schlechteren Prognose bzw. mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert.

Die funktionelle Aktivität von nm23-H1 wird bestimmt durch die Nukleosiddiphosphatkinase (NDPK)-Aktivität (Walleit et al., 1990, Munoz-Dorado et al., 1990, Teng et al., 1991) und die Serinphosphorylierung des Proteins (Mac Donald et al., 1993, Engel et al., 1995), sowie die Komplexbildung des nm23-H1-Proteins mit anderen Proteinen (Lombardi et al., 1995). Aktives nm23-H1 inhibiert sowohl die Zellproliferation (Cipollini et al., 1997), als auch die spontane (Kantor et al., 1993) oder durch Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  und PDGF induzierte (Hsu et al., 1994) Motilität von Tumorzellen. Darüber hinaus führt nm23-H1 zur Hemmung der Tumordinvasion (Lee & Lee, 1999, Khan et al., 2001) und zur Differenzierungsinduktion (Howlett et al., 1994).

Im Jahr 1991 wurde ein zweites humanes nm23-Gen von Stahl et al. entdeckt und als nm23-H2 bezeichnet (Stahl et al., 1991). Trotz einer 88%-igen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von nm23-H1 zu nm23-H2 sind die Funktionen dieser beiden Gene offenbar unterschiedlich. So stimuliert nm23-H2 die Transkription des c-myc-Protoonkogens in vitro (Postel et al., 1993), und führt hierdurch zu einer Hemmung der Differenzierung (Marcu et al., 1992). Desweiteren wurde von Okabe-Kado et al. (1992, 1995, 1998) gezeigt, daß nm23-H2 als inhibitierender Faktor der Differenzierung (I-Faktor) in leukämischen Mäusezellen auftritt.

Obwohl die Untersuchungen zu nm23-H1 und nm23-H2 in unterschiedlichen Zellsystemen durchgeführt wurden, deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß die Funktion dieser beiden Gene entgegengesetzt sein dürfte und nm23-H2 - nicht wie nm23-H1 - als Antimetastasierungs-gen anzusehen ist.

Neben Analysen zur Expression von nm23 in menschlichen Tumoren wurden auch Untersuchungen zu Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 in verschiedenen Tumortypen durchgeführt. Dabei konnten in einigen Tumorentitäten in der Tat Mutationen identifiziert werden. Eine der ersten nm23-H1-Mutationen in menschlichen Tumoren wurde bei Neuroblastomen beschrieben (Chang et al., 1994), wobei in 6 von 28 fortgeschrittenen Neuroblastomen eine Punktmutation in Kodon 122 auftrat. In allen 22 untersuchten sogenannten „limited-staged“-Neuroblastomen waren keine Mutationen gefunden worden, so daß Mutationen des nm23-H1-Gens in Neuroblastomen als Zeichen eines fortgeschrittenen Tumorstadiums gewertet wurden. Weitere Mutationen des nm23-H1-Gens wurden im kolorektalen Karzinom beobachtet (Cohn et al., 1991, Wang et al., 1993, Indinnimeo et al., 1998). Hier konnte in zwei Studien gezeigt werden, daß Mutationen des nm23-H1-Gens mit dem Vorhandensein von Metastasen assoziiert sind (Cohn et al., 1991, Wang et al., 1993).

In malignen Melanomzellen wurde eine Punktmutation von nm23-H2 entdeckt (Hamby et al., 1995), wobei diese Mutation in der Nachbarschaft der in Neuroblastomen beobachteten Mutationen (Chang et al., 1994) lokalisiert war. So betraf die Punktmutation in der malignen Melanomzelllinie Kodon 122, die Punktmutationen in den Neuroblastomzelllinien Kodon 120. Eine weitere Mutation von nm23-H2 wurde in

Ovarialkarzinomen (Mandai et al., 1995) gefunden. Dabei konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem klinischen Stadium bzw. dem Vorhandensein klinisch manifester Metastasen und dem Nachweis der Mutation im nm23-H2-Gen beobachtet werden (Mandai et al., 1995).

## **2. Ziel der vorliegenden Arbeit**

Ein Forschungsschwerpunkt am Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ist die molekulare Regulation der Tumorinvasion (Engers et al., 1999, 2000, 2001; Weber et al., 2001). Als repräsentative epitheliale und mesenchymale Tumormodelle wurden verschiedene humane Nierenkarzinomzelllinien sowie drei klonale Subpopulationen einer humanen epitheloiden Sarkomzelllinie als permanente Zelllinien etabliert (Engers et al., 1999, 2000, 2001; Weber et al., 2001). Da nm23, wie unter 1. dargestellt, offenbar eine wichtige Rolle bei der Regulation der Tumorinvasion spielt und Mutationen von nm23 in anderen Tumoren gefunden wurden, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, erstmals humane Nierenkarzinomzelllinien und humane epitheloide Sarkomzelllinien hinsichtlich des Vorliegens von Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 zu untersuchen.

### **3. Material**

#### **3.1. Chemikalien (Bezugsquellenverzeichnis)**

a. bidest.	Apotheke der Universität Düsseldorf
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Butanol	E. Merck, Darmstadt
Borsäure	E. Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Cäsiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chloroform	E. Merck, Darmstadt
DEPC	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
DMEM	Gibco BRL, Eggenstein
EDTA	E. Merck, Darmstadt
Ethanol	E. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	E. Merck, Darmstadt
Formaldehyd	E. Merck, Darmstadt
Formamid	E. Merck, Darmstadt
Glycerol	E. Merck, Darmstadt
Guanidine Thiocyanat	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Isoamylalkohol	E. Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol (37%)	E. Merck, Darmstadt
Mineralöl (Light Weight Oil)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Molekulargewichtsstandard	Gibco BRL, Eggenstein
MOPS	E. Merck, Darmstadt
Natriumacetat	E. Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosine-Na-Salt 35% Sol.	Serva GmbH & Co., Heidelberg
Oligonukleotide	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Phenol, wassergesättigt	Appligene, Heidelberg
Salzsäure	E. Merck, Darmstadt
SDS	E. Merck, Darmstadt

tri-Natriumcitrat

E. Merck, Darmstadt

Tris

E. Merck, Darmstadt

### **3.2. Lösungen und Puffer**

Die prozentualen Konzentrationsangaben zu den folgenden Lösungen und Puffer beziehen sich bei Trockensubstanzen auf das eingewogene Gesamtgewicht pro 100 ml, bei Flüssigkeiten auf die eingesetzte Flüssigkeitsmenge pro Gesamtvolumen. Die Lösungen wurden mit a. bidest. angesetzt.

DEPC-Wasser:

1 ml DEPC (30 min bei 37°C)

ad 1 l a. bidest.

(autoklavieren: 45 min bei 121°C)

Dichtegradient:

5,7 M Cäsiumchlorid

0,1 M EDTA pH 8,0

200 µl DEPC-Wasser

Lysispuffer für RNA-Extraktion:

4 M Guanidine Thiocyanat

2 mM tri-Natriumcitrat

2,5% 30%-ige Lauroylsarcosine

0,7% 37%-iges Mercaptoethanol

10 x MOPS:

0,2 M MOPS

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA

auf pH 7,0 durch Natronlauge eingestellt

Ladepuffer für Agarosegele (Probenpuffer):

30% 87%-iges Glycerol

0,25% Bromphenolblau

RNA-Aufnahmepuffer: 10% SDS  
1 M Tris, pH 7,4  
0,5 M EDTA, pH 8,0

5 x TBE-Puffer: 446 mM Tris  
446 mM Borsäure  
10 mM EDTA, pH 8,0

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4  
1 mM EDTA

### **3.3. Kits (Inhalt und Bezugsquellenverzeichnis)**

#### **RT-PCR-Kit**

oligo(dt)primer Stratagene, La Jolla CA.,USA  
(0,1 µg/µl)  
10 x first strand Puffer  
RNAse Inhibitor (40 U/µl)  
100 mM dNTPs (25 mM jedes dNTPs)  
MMLV-Reverse Transkriptase (20 U/µl)

#### **DNA Polymerase Kit**

Biometra GmbH, Göttingen

DNA Polymerase (Thermus brockianus) (2 U/µl)  
dNTP-Mix  
Prime Zyme Puffer (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>)  
Mg-freier Puffer  
Mg-Lösung

## **Jetsorb DNA Extraktionskit**

Genomed GmbH, Bad Oeynhausen

Jetsorb Suspension

Puffer A1 (TBE, Natriumacetat)

Puffer A2 (Ethanol, NaCl, EDTA, Tris/HCl)

## **Sequenzierungskit**

Perkin-Elmer Applied Biosystems,

Foster-City CA, USA

- d-Rhod-Terminator Ready Reaction Mix:

(AmpliTaq DNA Polymerase, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl von pH 9,0)

- TSA (Template Suppression Reagent):

(Formamid, EDTA)

## **3.4. Oligonukleotide**

Die unter 3.4.1. und 3.4.2. angegebenen Positionsnummern der Basen der für die PCR als Matrize eingesetzten cDNA beziehen sich auf den Artikel von Stahl et al. (1990), „Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2“. Danach reicht der kodierende Anteil von nm23-H1 von Position 99 bis 557, der kodierende Anteil von nm23-H2 von Position 73 bis 531.

Mit Hilfe der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten spezifischen Primer für nm23-H1 und nm23-H2 (siehe 3.4.1. und 3.4.2.) wurde somit jeweils der gesamte kodierende Bereich beider Gene amplifiziert.

Bei den Primern nach Bafico et al., 1993, beziehen sich die Positionsnummern der genomischen DNA-Sequenz auf die Arbeit von Rosengard et al., 1989, „Reduced nm23/Awd protein in tumor metastasis and aberrant Drosophila development“.

### **3.4.1. Primer für nm23-H1**

Primer für cDNA:

nm23-H1: Position 17-718 (702 bp)

- 5'- CTG CGA ACC ACG TGG GT -3' sense  
- 5'- TCG GGG ATG GTA ACA CT -3' antisense

nm23-H1-I: Position 81-356 (276 bp)

- 5'- AAG CAG CTG GAA GGA A-3' sense  
- 5'- CGT CTT CAC CAC ATT CA-3' antisense

nm23-H1-II: Position 319-586 (268 bp)

- 5'- TTG CCA TGG TCT GGG AG-3' sense  
- 5'- GTG AAA AGC AAT GTG GT-3' antisense

Primer für genomische DNA:

nm23-Ex2: Position 2002-2266 (265 bp)

- 5'- GCT TTG AGA CGG ATG ACG CTG TA-3' sense  
- 5'- CAG GTT AAT CAC AGT GTT CTC C-3' antisense

### **3.4.2. Primer für nm23-H2**

Primer für cDNA:

nm23-H2: Position 53-632 (580 bp)

- 5'- CCC CTC CAG CTT CCC -3' sense  
- 5'- AAA GAA TGA TCA ATC CT -3' antisense

nested nm23-H2:Position 53-555 (503 bp)

- 5'- CCC CTC CAG CTT CCC GGA CC -3'      sense  
- 5'- GGA GAC TGC TGT TGT GTC CAC -3'      antisense

### **3.4.3. Primer für $\beta$ -Aktin**

Primer für cDNA:

$\beta$ -Aktin (423 bp)

- 5'- GAG CAA GAG AGG CAT CC -3'      sense  
- 5'- TGG TGG TGA AGC TGT AG -3'      antisense

## **4. Methoden**

### **4.1. Zellkultur**

In der vorliegenden Arbeit wurden 26 verschiedene humane Nierenkarzinomzelllinien eingesetzt, die von Gerharz et al. (1989, 1993, 1994, 1995, 1996) etabliert und charakterisiert worden waren. Von diesen Nierenkarzinomzelllinien gehörten 20 zum klarzelligen Typ, 4 zum chromophilzelligen und 2 zum chromophobzelligen Typ (Tabelle 1). Darüber hinaus wurden 3 verschiedene Klone (GRU-1A, GRU-1B, GRU-1C) der humanen epitheloidzelligen Sarkomzelllinie GRU-1 untersucht, deren Etablierung und Charakterisierung von Engers et al. (1994) beschrieben wurde.

**Tabelle 1:** Auflistung der 26 Nierenkarzinomzelllinien.

klarzellig:	clearCa-1	clearCa-3	clearCa-5
	clearCa-9	clearCa-10	clearCa-12
	clearCa-14	clearCa-16	clearCa-19
	clearCa-21	clearCa-27	clearCa-28
	clearCa-29	clearCa-31	clearCa-32
	clearCa-33	clearCa-35	clearCa-36
	clearCa-39	clearCa-43	
chromophilzellig:	chromphi-1	chromphi-2	chromphi-3
	chromphi-4		
chromophobzellig:	chrompho-A	chrompho-B	

Alle Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen auf eine Anzahl von ca. 3-5 Mio. Zellen expandiert und danach der DNA- und RNA-Aufarbeitung zugeführt. Die Zellen wurden in Dulbeccos modified eagle medium (DMEM) bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% kultiviert,

welches zweimal wöchentlich gewechselt wurde. Dem Medium wurden 10% fötales Kälberserum (FCS), die Antibiotika Penicillin und Streptomycin sowie die Aminosäure Glutamin zugesetzt. Konnte die Aufarbeitung von DNA und RNA nicht sofort erfolgen, so wurden die Zellen in einem 50 ml Falcon Reagenzröhrchen bis zur Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **4.2. DNA-RNA-Doppelextraktion**

Zur DNA/RNA-Doppelextraktion wurde die Präparation nach Chirgwin et al., 1979, durchgeführt. Nach der Lyse der Zellen wurden RNA und DNA zunächst mittels Dichtegradientenzentrifugation getrennt und anschließend getrennt voneinander weiter aufgearbeitet.

Dies bedeutete, daß den im Falconröhrchen eingefrorenen ca. 3-5 Mio. Zellen zunächst 6,3 ml Lysispuffer hinzupipettiert wurde. Daraufhin erfolgte eine sorgfältige Mischung, damit das Pellet vollkommen und schnell aufgelöst wurde und das im Lysispuffer enthaltene Guanidinisothiocyanat vorhandene RNAsen inaktivieren konnte. Der Zellyse folgte die Vorbereitung zur Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurden 3 g Cäsiumchlorid hinzugegeben und der Ansatz solange gut gemischt (Vortex), bis das Cäsiumchlorid vollständig aufgelöst war. Zur Inaktivierung von RNAsen wurde das Cäsiumchlorid vor Gebrauch für 4 h auf  $180^{\circ}\text{C}$  erhitzt und danach bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der Ansatz wurde bei 3500 bis 4000 U/min bei Raumtemperatur kurz in einer Beckman Megafuge zentrifugiert. Danach wurde das Gemisch über 3,6 ml des vorbereiteten Dichtegradienten geschichtet, welcher zuvor in ein Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen eingegeben wurde. Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden vorher für 2 h in DEPC-Wasser getaucht und anschließend für 1 h bei  $121^{\circ}\text{C}$  inkubiert, um vorhandene RNAsen zu inaktivieren. Bei der Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation wurden die Proben nach Austarierung in den Rotor der Ultrazentrifuge (Beckman Ultrazentrifuge Rotor SW 41) eingesetzt und die Ultrazentrifugation mit einer Geschwindigkeit von 35000 U/min bei  $25^{\circ}\text{C}$  für 18-20 h durchgeführt.

Aufgrund der geringen Schwebedichte befanden sich in der obersten Schicht Lysispuffer und DNA, welche mit einer Einwegpipette abgesaugt und in ein neues Falconröhrchen gegeben wurden. Das sich noch im unteren Anteil des Ultrazentrifugenröhrchens in Lösung befindliche Cäsiumchlorid wurde danach dekantiert. Anschließend wurde das Röhrchen mit dem am Boden haftenden RNA-Pellet zur Trocknung kopfüber auf eine reine Papierunterlage gestellt.

#### **4.2.1. RNA-Aufarbeitung**

Bei der sehr degradationsempfindlichen RNA muß darauf geachtet werden, daß sie direkt aufgearbeitet wird. Weiterhin muß eine große Aufmerksamkeit auf die RNase-Freiheit der Reagenzien gelegt werden.

Zur Aufarbeitung der RNA wurden 300 µl RNA-Aufnahmepuffer in das Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert und das Pellet vorsichtig unter weitgehender Vermeidung von Schaumbildung resuspendiert. Die Lösung wurde dann in ein frisches „Eppendorf-Tube“ überführt. Dieser Vorgang wurde nochmals mit 100 µl RNA-Aufnahmepuffer wiederholt, um auch die beim ersten Mal nicht resuspendierte RNA zu gewinnen. Nun wurden 500 µl Chloroform-Butanol (4:1) zur RNA-Lösung in das „Eppendorf-Tube“ hinzupipettiert und dieser Ansatz für 10 min in einer Sepatech Biofuge 13 R bei 13000 U/min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein neues „Eppendorf-Tube“ überführt.

Es folgte die Fällung der RNA, bei welcher 40 µl 3 M Natriumacetatlösung und 1 ml 100%-iges eisgekühltes Ethanol zu den 400 µl RNA im RNA-Aufnahmepuffer pipettiert wurden. Der Ansatz wurde nach kurzem Mischen für 8-10 h bei -20°C gelagert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Ansatz für 30 min bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und das sedimentierte RNA-Pellet in zwei Waschschritten mit jeweils 500 µl eisgekühltem 70%-igem Ethanol bei 4000 U/min, 4 °C, für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet getrocknet, indem das „Eppendorf-Tube“ kopfüber auf einem aufsaugbaren Tuch stand. Schließlich wurde das Pellet in 50 µl DEPC-Wasser vorsichtig resuspendiert.

#### **4.2.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA**

Die RNA-Konzentration wurde in einem Spektralphotometer der Firma Beckman gemessen. Dabei wurde zuerst der Blank-Wert (Leerwert) gemessen, indem die Quarzküvette mit 500  $\mu$ l DEPC-Wasser gefüllt wurde. Danach wurden 495  $\mu$ l DEPC-Wasser 5  $\mu$ l der jeweiligen RNA-Probe hinzugefügt und die RNA-Konzentration des Gemisches photometrisch bestimmt. Neben der errechneten RNA-Konzentration wurde auch die Reinheit der RNA überprüft. Dazu dient der als Reinheitsfaktor benannte Quotient aus Absorption bei 260 nm/Absorption bei 280 nm ( $Abs_{260}/Abs_{280}$ ). Dieser sollte mindestens 1,7-2 betragen.

Unreine Proben (Quotient  $Abs_{260}/Abs_{280} < 1,7$ ) wurden erneut mit der DNA-RNA-Doppelextraktion aufgearbeitet.

#### **4.2.3. Formamid/Formaldehyd RNA-Gelelektrophorese**

Die Nukleinsäuren-Gelelektrophorese führt zu einer Trennung von Nukleinsäuren im elektrischen Feld aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungen und Strukturen.

Der Erfolg der RNA-Aufarbeitung wurde optisch anhand der RNA-Gelelektrophorese überprüft. Dabei wurde die denaturierte RNA in einem Formamid/Formaldehyd-Milieu elektrophoretisch getrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Als Laufpuffer wurde dabei 1 x MOPS-Puffer verwendet.

Hierzu wurde ein 2%-iges Agarosegel eingesetzt, 0,96 g Agarose wurden mit 57,6 ml DEPC-Wasser in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis eine klare Lösung vorlag. Diese Lösung wurde dann zur Abkühlung in ein 60°C vorgeheiztes Wasserbad gestellt. Dabei wurden noch 8 ml 10 x MOPS-Puffer und 14,4 ml Formaldehyd hinzugefügt. Aufgrund der Toxizität des flüchtigen Formaldehyds erfolgte dies unter einer Abzugshaube. Nach 10 min wurde die Lösung dem Wasserbad entnommen und in eine vorbereitete horizontale Elektrophoresekammer gegossen.

Während das Agarosegel polymerisierte, wurden die aufzutragenden Proben vorbereitet. Dabei wurden einer RNA-Probe (4,5  $\mu$ l) 10  $\mu$ l Formamid, 2  $\mu$ l 10 x MOPS und 3,5  $\mu$ l Formaldehyd

hinzugefügt. Das Formamid dient der Siedepunkterniedrigung, das Formaldehyd führt zu der für die elektrophoretische Trennung notwendigen Denaturierung.

Der Ansatz wurde für 10 min bei 55°C inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl Probenpuffer wurden die Proben in die jeweiligen Geltaschen pipettiert und die elektrophoretische Auftrennung für 4 h bei 50 V und 150 mA durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 10 min in Ethidiumbromid (0,5 µg/ml in 1 x TBE) gefärbt und mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, um bei intakter RNA die beiden Banden von 18 S und 28 S zu sehen.

#### **4.2.4. DNA-Aufarbeitung**

Bei der Aufarbeitung der im Lysispuffer gelösten DNA mußte nun diese zuerst in mehreren Reinigungsschritten von anderen noch in Lösung befindlichen Zellbestandteilen getrennt werden. Hierzu wurde das Lysispuffer-DNA-Gemisch mit a. bidest. 1:2 verdünnt. Anschließend folgte eine weitere Verdünnung (1:2) dieser Lösung durch Zugabe von Chloroform-Phenol. Nach kurzem Mischen wurde der Ansatz für 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Die obere Phase wurde abpipettiert, Chloroform-Phenol hinzugefügt und diese Lösung erneut zentrifugiert. Der gleiche Vorgang wurde anschließend zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Nachdem auch hiernach die obere Phase mit der in ihr enthaltenen DNA abpipettiert und in ein neues Falconröhrchen überführt worden war, wurden langsam 40 ml eisgekühltes Ethanol (100%) hinzugegeben. Nach zweifachem Drehen des Falconröhrchens um die Längsachse wurde die nun knäueförmige DNA mit einer mittels Bunsenbrenner zum Haken geformten Pasteurpipette herausgefischt. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl eisgekühltem 70%-igem Ethanol. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das jeweilige DNA-Pellet solange bei Raumtemperatur stehen lassen, bis das Ethanol verdunstet war. Danach wurde die DNA in a. bidest. aufgelöst und die DNA-Konzentration analog zur RNA-Konzentration im Spektralphotometer bestimmt (siehe 4.2.2.). Die DNA wurde dann im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Abweichend von oben beschriebenem Verfahren wurde zur Aufarbeitung der DNA aus dem Primärtumor der Zelllinie clearCa-32 nach dem Protokoll von Herman & Frischauf (1987)

verfahren. Zuvor wurde die DNA aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Tumorgewebe mittels eines QI Amp Tissue Kits (Qiagen) gemäß Herstellerangaben extrahiert.

### **4.3. Reverse Transkription**

Die genomische DNA besteht aus einem nicht kodierenden Anteil (Introns) und einem kodierenden Anteil (Exons). Die cDNA-Sequenz eines Gens enthält zwar auch die gesamte kodierende Sequenz dieses Gens, ist aber aufgrund fehlender Introns um ein Vielfaches kleiner als die genomische Sequenz. Die cDNA entsteht dadurch, daß eine mRNA mittels des Enzyms reverse Transkriptase (RT) in ein der mRNA komplementäres DNA-Stück umgeschrieben wird. Die mRNA entsteht durch primäre Transkription der genomischen DNA in prä-mRNA und anschließendes Spleißen (Ausschneiden der Introns). Obwohl auch die Taq-Polymerase eine gewisse reverse Transkriptaseaktivität besitzt (Tse & Forget, 1990) und eine ihr verwandte DNA-Polymerase in den anschließenden PC-Reaktionen verwendet wird, ist zur Erlangung einer hohen Ausbeute an cDNA ein spezifisches RT-Enzym nötig.

Außer der RNA und der RT wurden zur Durchführung der RT-Reaktion ein oligo(dt)Primer eingesetzt, um mRNA-spezifische cDNA zu gewinnen, dNTPs als Bausteine der neu entstehenden Nukleinsäuren, ein RNase-Block zur Inaktivierung von RNAsen und schließlich ein geeignetes Puffersystem. Für die reverse Transkriptase-Reaktion wurde ein RT-PCR-Kit (Stratagene, La Jolla CA., USA) benutzt. Die RT-Reaktion und alle PC-Reaktionen wurden in einem Mini Thermocycler (MJ Research) durchgeführt. Dazu wurden 2 µg RNA einer jeden Zelllinie mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 37 µl in einem „Eppendorf-Tube“ ergänzt. Danach wurden 3 µl oligo(dt)Primer (100 ng/µl) hinzugefügt und der Ansatz vorsichtig gemischt. Das Gemisch wurde für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend langsam innerhalb von 10 min auf Raumtemperatur abgekühlt, damit die oligo(dt)Primer an die RNA binden konnten.

Danach wurden folgende Reagenzien nacheinander hinzugefügt:

- 5  $\mu$ l 10 x first strand buffer
- 1  $\mu$ l RNAse Block (40 U/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l 100 mM dNTP-Mix (25 mM jedes dNTP)
- 1  $\mu$ l RT (20 U/ $\mu$ l)

Als Negativkontrolle wurde zum Ausschluß einer Kontamination a. bidest. anstatt der RNA eingesetzt.

Nach vorsichtigem Mischen wurde die RT-Reaktion für 1 h bei 37°C durchgeführt. Anschließend folgte ein 5-minütiges Erhitzen auf 90°C, um die RT zu inaktivieren. Die so generierte cDNA wurde entweder kurzfristig bei 4°C aufbewahrt oder für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert.

#### **4.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit Hilfe der PCR. Mit diesem Verfahren, welches 1983 von Mullis erstmals beschrieben wurde, lassen sich Nukleinsäuren in einem Reaktionsansatz schnell und spezifisch vervielfältigen. Man benötigt dafür außer der DNA als Matrize dNTPs als Bausteine der zu synthetisierenden Nukleinsäuren, eine DNA-Polymerase, spezifische Oligonukleotide als Primer, welche den zu amplifizierenden Bereich flankieren, und schließlich für die Reaktion ein geeignetes Puffersystem. Die PCR besteht aus drei Teilschritten. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge aufgetrennt, damit im zweiten Schritt, dem sogenannten Annealing, die spezifischen Oligonukleotide an die Einzelstränge binden können. Im dritten und letzten Schritt, der Elongation, werden dann mittels der DNA-Polymerase die DNA-Einzelstränge komplementär zu den vorliegenden Matrizen synthetisiert.

#### **4.4.1. Überprüfung der RT durch PCR für $\beta$ -Aktin**

Zur Überprüfung des Erfolges der RT-Reaktion wurde eine PCR des ubiquitär vorkommenden Gens  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Der Ansatz für eine Reaktion bestand dabei aus einem Gesamtansatz von 50  $\mu$ l:

- 2  $\mu$ l der RT-Reaktion
- 40  $\mu$ l a. bidest.
- 1  $\mu$ l dNTP-Mix (Biometra)
- 5  $\mu$ l Prime Zyme Puffer
- 0,5  $\mu$ l 3'Primer (200 ng/ $\mu$ l)
- 0,5  $\mu$ l 5'Primer (200 ng/ $\mu$ l)
- zuletzt 1  $\mu$ l DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ l)

Der Ansatz wurde in einem „Eppendorf-Tube“ kurz gemischt. Danach wurde jeder Probe ein Tropfen Mineralöl hinzugefügt, damit beim nachfolgenden Erhitzen auf 95°C keine Flüssigkeit verdampfte. Die folgenden Schritte wurden 30 x wiederholt:

- |                  |       |      |
|------------------|-------|------|
| 1. Denaturierung | 1 min | 94°C |
| 2. Annealing     | 1 min | 50°C |
| 3. Elongation    | 1 min | 72°C |

Nach Beendigung der PCR wurden 10  $\mu$ l der unter der Ölschicht gelegenen Probe mit 2  $\mu$ l Probenpuffer in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

#### **4.4.2. PCR von nm23-H1 und nm23-H2**

Zur spezifischen Amplifikation von nm23-H1 und nm23-H2 wurden PCR mit Gen-spezifischen Primern durchgeführt.

Ein Reaktionsansatz enthielt:

- 2  $\mu$ l der RT-Reaktion
- 10  $\mu$ l Prime Zyme Puffer (Biometra)
- 0,8  $\mu$ l 100 mM dNTP-Mix (Stratagene-Kit)
- 0,8  $\mu$ l des exonspezifischen 5' Primers (200 ng/ $\mu$ l)
- 0,8  $\mu$ l des exonspezifischen 3' Primers (200 ng/ $\mu$ l)

Mit a. bidest. wurde der Reaktionsansatz auf ein Endvolumen von 99,5  $\mu$ l ergänzt. Danach folgte die Denaturierung der cDNA durch 5-minütiges Erhitzen auf 94°C sowie das primäre „Annealing“ für 5 min auf 54°C. Die Proben wurden in einer Sepatech Biofuge 13 R zentrifugiert (10 sec, 4000 U/min), 0,5  $\mu$ l DNA Polymerase (2 U/ $\mu$ l) hinzugefügt und wieder zentrifugiert (10 sec, 4000 U/min). Jeder Ansatz wurde mit einem Öltropfen als Verdampfungsschutz überschichtet.

Diese auch als „hot start“ benannte Methode, in welcher erst nach primärer Denaturierung und anschließendem „Annealing“ die DNA-Polymerase hinzugefügt wird, bewirkt eine starke Erhöhung der Spezifität und Sensivität der PCR (Chou et al., 1992). Dies basiert darauf, daß nur korrekt gepaarte Oligonukleotide verlängert werden, indem eine unspezifische Elongation vor der temperaturgesteuerten Elongation am Ende des ersten Zyklus der PCR verhindert wird.

Das nm23-H1-Gen wurde mit vier verschiedenen Primerpaaren amplifiziert. Dabei diente cDNA als Matrize für die PCR mit den Primerpaaren nm23-H1, -H1-I und -H1-II, genomische DNA als Matrize für die PCR mit dem Primerpaar nm23-Ex2.

Mit dem Primerpaar nm23-H1 wurde der gesamte kodierende Anteil des Gens nm23-H1 amplifiziert. Die Primerpaare nm23-H1-I und nm23-H1-II wurden zur Amplifikation des gesamten kodierenden Anteils von nm23-H1 in zwei Fragmenten eingesetzt, wobei nm23-H1-I den 5'-Anteil (276 bp) des kodierenden Bereiches und nm23-H1-II den 3'-Anteil (268 bp) des kodierenden Bereiches amplifizierte. Die Primerpaare nm23-H1-I und nm23-H1-II wurden zur Gewinnung von 2 sich überlappenden Fragmenten des nm23-H1-Gens gebraucht, damit die Ergebnisse der nachfolgenden Sequenzierungsreaktion eindeutig auswertbar waren.

Mit dem Primerpaar nm23-Ex2 wurde das gesamte Exon 2 von nm23-H1 amplifiziert. Wie im Ergebnisteil unter 5.3.1. dargestellt, war in einer Nierenkarzinomzelllinie (clearCa-32) eine in Exon-2 lokalisierte mutmaßliche Punktmutation von nm23 detektiert worden, so daß zur Verifizierung dieser Mutation in Primärtumor eine spezifische PCR für das Exon-2 von nm23 durchgeführt wurde.

Für die nachfolgenden PCR zur Amplifikation der verschieden langen Fragmente von nm23-H1 wurden folgende Bedingungen gewählt:

nm23-H1: Denaturierung 1 min, 94°C; Annealing 1 min, 56°C; Elongation 1,5 min, 72°C

nm23-H1-I : Denaturierung 1 min, 94°C; Annealing 1 min, 53°C; Elongation 1 min, 72°C

nm23-H1-II: Denaturierung 1 min, 94°C; Annealing 1 min, 54°C; Elongation 1 min, 72°C

nm23-Ex2: Denaturierung 1 min, 94°C; Annealing 1 min, 53°C; Elongation 1 min, 72°C

Nach 33 Zyklen erfolgte eine terminale Elongation für 10 min bei 72°C, damit alle PCR-Produkte die vollständige Produktlänge erreichten.

Für nm23-H2 wurden bei der primären Amplifikation folgende Bedingungen gewählt:

nm23-H2: Denaturierung 1 min, 94°C; Annealing 1 min, 52°C; Elongation 1,5 min, 72°C

Nach Ablauf von 25 Zyklen folgte eine 10-minütige Inkubation bei 72°C zur terminalen Elongation. Danach wurde eine sogenannte nested-PCR durchgeführt (Ohara et al., 1989). Als Ausgangsmatrize dient bei dieser Methode das bei der ersten PCR amplifizierte Genprodukt. Dabei wird durch den Einsatz mindestens eines neuen intern gelegenen Primers erreicht, daß nur spezifische Produkte der ersten PCR als Substrat für die zweite PCR dienen können. Weiterhin wird eine Erhöhung des Anteils an gewünschtem spezifischen Produkt erreicht, was in unserem Fall der Grund der Anwendung dieser Technik war.

Zur Durchführung der nested-PCR für nm23-H2 wurde das in der primären PCR für nm23-H2 erhaltene Produkt 1:1000 mit a. bidest. verdünnt. Davon wurde dann 1 µl dem üblichen Reaktionsansatz hinzugefügt. Für die anschließende nested-PCR mit dem in 3.4.2. genannten spezifischen Primerpaar wurden folgende Reaktionszeiten bzw. -temperaturen gewählt:

Denaturierung 1 min, 94°C; Annealing 1 min, 58°C; Elongation 1,5 min, 72°C

Es wurden 30 Zyklen durchlaufen und abschließend eine 10-minütige terminale Elongation durchgeführt. Weiterhin wurde zur Optimierung des PCR-Ergebnisses im Gegensatz zu allen anderen PCR in der nested-PCR die Magnesiumkonzentration des Puffers verändert, die ebenso wie die übrigen im Puffersystem enthaltenen Ionen (Kalium, Natrium, Chlorid) die katalytische Aktivität der DNA-Polymerase beeinflusst (Saiki, 1989, Williams, 1989). Hierzu wurde aus dem im DNA-Polymerase-Kit befindlichen magnesiumfreien Puffer mittels Magnesiumlösung ein Puffer mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> hergestellt.

In allen PCR konnten Kontaminationen mit Fremd-DNA vermieden werden. Hierzu wurde neben der räumlichen Trennung der PCR von anderen Reaktionen (Cimino et al., 1990, Nienhaus & Gehrman, 1991) ein Aliquotieren der Reagenzien vorgenommen, sowie bei allen PCR-Versuchsreihen jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt. Diese enthielt alle Reagenzien außer der zu verfielfältigenden DNA, an deren Stelle a. bidest. hinzugefügt wurde.

#### **4.4.3. Agarosegelelektrophorese**

Der Erfolg der PCR wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese unter Verwendung eines 2%-igen Agarosegels in 1 x TBE-Puffer überprüft. Dazu wurden 8 µl PCR-Probe mit 2 µl Probenpuffer vermischt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Außerdem wurde auch jedesmal ein Längenstandard mitgeführt, um die Richtigkeit der Amplifikationsgröße aufzuzeigen. Die optimale Auftrennung wurde bei 55 V, 150 mA und einer Laufzeit von ca. 4 h erreicht. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel für 10 min in Ethidiumbromid (0,5 µg/ml in 1 x TBE) gefärbt, unter UV-Licht betrachtet und zur Dokumentation fotografiert.

#### **4.5. Gelextraktion von nm23-H2**

Die nach elektrophoretischer Trennung des primären Amplifikationsprodukts von nm23-H2 in Höhe des zu erwartenden spezifischen Produkts gelegene Bande wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mit einem Jetsorb-DNA-Extraktionskit aufgearbeitet.

Mit diesem Kit werden die Agarose aufgelöst und die DNA an Glaspulver gebunden, welches in der Jetsorb-Suspension enthalten ist. In mehreren Waschschrritten werden die Agarose und das in Puffer A1 befindliche Natriumacetat vollständig von der DNA getrennt, damit die Sequenzierungsreaktion nicht behindert wird (Gelfand, 1989, Gyllenstein, 1989). Danach liegt schließlich die DNA gebrauchsfertig für die nachfolgende Sequenzierung vor.

Die herausgeschnittenen Gelfragmente wurden gewogen und dadurch die Menge des Puffers A1 (Gewicht der Gelfragmente in mg:Puffervolumen A1 in  $\mu\text{l}$  = 1:3) und der im Kit enthaltenen Suspension (Gewicht der Gelfragmente in mg:Jetsorb Suspension = 10:1) errechnet. Nach kurzem Mischen wurde der Ansatz für 15 min bei 50°C inkubiert, wobei alle 3 min kurz gemischt wurde, um eine Sedimentation der Jetsorb Suspension, welche die DNA durch das Glaspulver bindet, zu verhindern. Der Überstand wurde nach kurzem Zentrifugieren (30 sec bei 13000 U/min) in einer Sepatech Biofuge 13 R verworfen.

Daraufhin wurden das nun am Boden des „Eppendorf-Tubes“ befindliche DNA-Pellet mittels des Puffers A1 resuspendiert, die Lösung wieder für 30 sec bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde danach noch zweimal mit dem im Kit befindlichen zweiten Puffer, Puffer A2, durchgeführt.

Das „Eppendorf-Tube“ mit dem am Boden befindlichen Pellet wurde nun kopfüber auf ein sauberes Papier gelegt und 30 min lang bei Raumtemperatur zum Trocknen stehen lassen. Nahm das Pellet eine weißliche Farbe an, war es vollkommen trocken und konnte in 20  $\mu\text{l}$  TE-Puffer resuspendiert und anschließend für 5 min auf 50°C erhitzt werden, damit eine Trennung von der Jetsorb Suspension erfolgte. Der die DNA enthaltende Überstand wurde nun in ein neues „Eppendorf-Tube“ pipettiert und war als Template für die Sequenzierung geeignet.

#### **4.6. Aufbereitung der PCR-Produkte zur Sequenzierung**

Die an der Flüssigkeitsoberfläche gelegene ölige Phase der PCR-Produkte wurde so weit als möglich mit einer Pipette aufgenommen und verworfen. Um das gesamte Öl gründlich zu entfernen, wurde jeder Probe 200 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt, die Proben anschließend vorsichtig geschüttelt und 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Die danach sich oben befindliche wässrige Phase, die das PCR-Produkt enthielt, wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Tube übertragen.

Weiterhin wurden die Proben von den noch nach der PCR vorhandenen niedermolekularen Substanzen wie Nukleotiden und Primern durch Reinigung mittels Gelchromatographie in Sephacryl S 300 HR-Säulen (Pharmacia) getrennt. Dabei wurden die PCR-Produkte in die HR-Säulen pipettiert und diese in „Eppendorf-Tubes“ hineingestellt. Nach zweiminütiger Zentrifugation passierten die PCR-Produkte vollständig das in den HR-Säulen befindliche Gel. Die nun am Boden der „Eppendorf-Tubes“ befindlichen PCR-Produkte dienten als Ausgangsmatrize der Sequenzierungsreaktion.

#### **4.7. Sequenzierung**

Die automatische Sequenzierung erfolgte mit Hilfe eines 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems) nach der Didesoxymethode (Sanger et al., 1977). Zuerst wurden die DNA-Konzentrationen der Proben mittels Photometer bestimmt (siehe 4.2.2.), damit im nächsten Schritt die für die Sequenzierungsreaktion benötigten 60 ng der Proben-cDNA titriert werden konnten. Weiterhin wurde die Konzentration des für die Sequenzierung benötigten Gen-spezifischen Primers auf 5 pM/µl titriert und 1 µl davon in den Ansatz pipettiert. Zu Template und Primer kamen noch 4 µl eines d-Rhod-Terminator Ready Reaction Mixes hinzu, und anschließend wurde das Volumen mit a. bidest. auf 20 µl aufgefüllt. Der d-Rhod-Terminator Reaction Mix der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems enthielt alle für die Kettenabbruchmethode notwendigen Reagenzien, so daß die Sequenzierungsreaktion beginnen konnte.

Grundsätzlich lagert sich nach erfolgter Hybridisierung des jeweiligen Primers an das als Matrize dienende PCR-Produkt das jeweilige dNTP in der Extensionsphase der Matrize an. Nach Bindung eines fluoreszenzmarkierten ddNTPs, welches mit dem nicht markierten dNTP konkurriert, wird das weitere Kettenwachstum durch das fehlende 3-Hydroxylende des ddNTP verhindert. Die so entstandenen Synthesefragmente unterschiedlicher Länge, welche durch ein bestimmtes fluoreszierendes ddNTP markiert sind, können dann dadurch identifiziert werden, daß sie, nach Trennung der verschieden langen Synthesefragmente in einem Polymer und Anregung durch einen Laser, Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dies kann dann durch den Ausdruck farbiger Diagramme veranschaulicht werden. Vorteil dieser Methode gegenüber der ursprünglichen von Sanger et al. (1977) beschriebenen Methode ist der Verzicht auf den Gebrauch eines radioaktiven Stoffes zur Kennzeichnung der eingebauten ddNTPs. Ein weiterer Vorteil ist, daß das Polymer anstelle der früher notwendigen Gelelektrophorese gebraucht werden kann. Neben dem Zeitgewinn entstehen somit auch keine Sequenzierungsungenauigkeiten durch Unterschiede in der elektrophoretischen Trennung zwischen den einzelnen Bahnen.

Die Sequenzierungsreaktion wurde über 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen in einem Thermocycler durchgeführt :

1. Denaturierung	30 sec	96°C
2. Annealing	15 sec	50°C
3. Elongation	4 min	60°C

Nach dieser Reaktion erfolgte die Fällung der neu entstandenen Nukleotidketten, um die bei der Sequenzierungsreaktion nicht verbrauchten Primer und fluoreszenzmarkierten ddNTPs zu entfernen, da diese die nachfolgende Auswertung der Sequenzierung störend beeinflussen würden. Zur Durchführung der Fällung wurden zuerst das Volumen mit a. bidest. auf 100 µl ergänzt und anschließend 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 5.2., und 250 µl 100%-iges Ethanol hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben für 30 min bei 13000 U/min zentrifugiert und die danach entstandenen Überstände verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit 400 µl 70%-igem Ethanol, eine 5-minütige Zentrifugation bei 13000 U/min und ein Verwerfen der jeweiligen Überstände. Nach einer 30-minütigen Lufttrocknung wurden die Proben mit 20 µl

„Template Suppression Reagent“ (TSA) resuspendiert und zur Denaturierung für 5 min auf 95°C erhitzt, bevor die Proben der automatischen Sequenzierung zugeführt wurden.

Die Sequenzierung erfolgte sowohl vom 3'-Ende als auch vom 5'-Ende. Die beiden Sequenzierungen wurden zuerst miteinander, danach mit dem Wildtyp verglichen.

Bei Ungenauigkeiten oder Unklarheiten der Sequenzierungsausdrucke wurde die Sequenzierungsreaktion nach Ausschluß anderweitiger Fehlerquellen wiederholt.

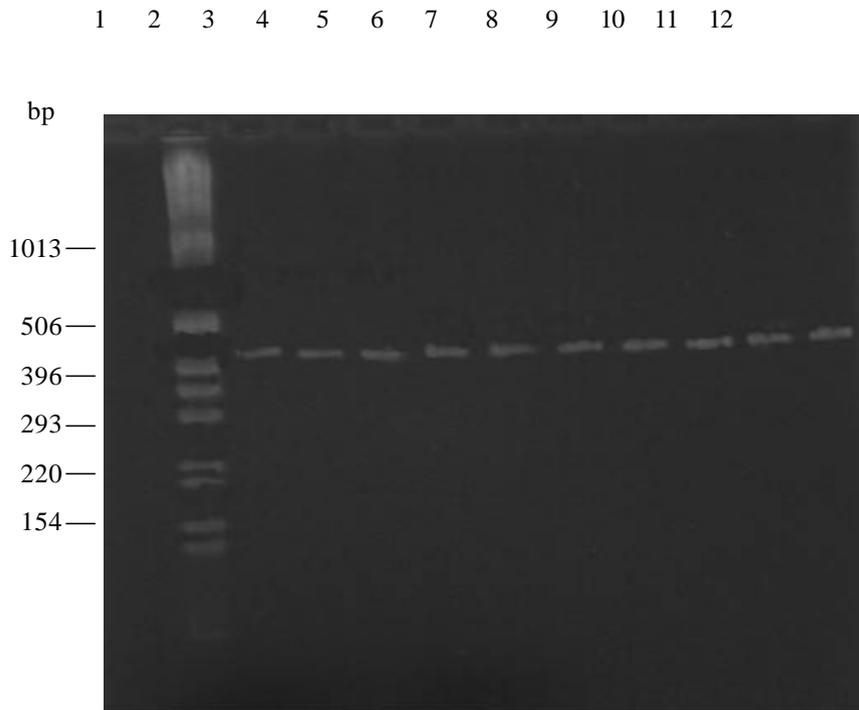
#### **4.8. Sequenzvergleich zwischen humanen und nicht humanen nm23-Genen**

Das Antimetastasierungs-gen nm23 kommt nicht nur beim Menschen, sondern auch in anderen Organismen vor (Rosengard et al., 1989, Munoz-Dorado et al., 1990, Wallet et al., 1990, Lakso et al., 1992, Ishikawa et al., 1992). Sowohl Säugetiere wie Maus und Ratte, als auch Insekten (*Drosophila melanogaster*) und Pflanzen (Erbsen, *Flaveria bidentis*) tragen das nm23-Gen in ihrem Genom. Aus der internationalen Genbank ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)) des Genominstitutes TIGR in Rockville (USA) wurden die genauen Sequenzen der nm23 Gene der verschiedenen Organismen entnommen und konnten somit hinsichtlich ihrer Basensequenz untereinander verglichen werden. Dabei wurden nur die kodierenden Genabschnitte der entsprechenden DNAs miteinander verglichen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Gewinnung der cDNA und Nachweis der Expression von $\beta$ -Aktin mittels PCR

Nachdem die RNA aufgearbeitet worden war, wurde in einer Formamid/Formaldehyd RNA-Gelelektrophorese deren Intaktheit überprüft. Mittels einer RT-Reaktion wurde danach die mRNA in cDNA umgeschrieben. Der Erfolg dieser Versuchsschritte konnte in der nachfolgend durchgeführten PCR für  $\beta$ -Aktin nachgewiesen werden (Abbildung 1). Da dies in allen zu untersuchenden Zelllinien gelang, waren die jeweiligen cDNA-Proben für die PCR der spezifischen Genabschnitte von nm23 geeignet.



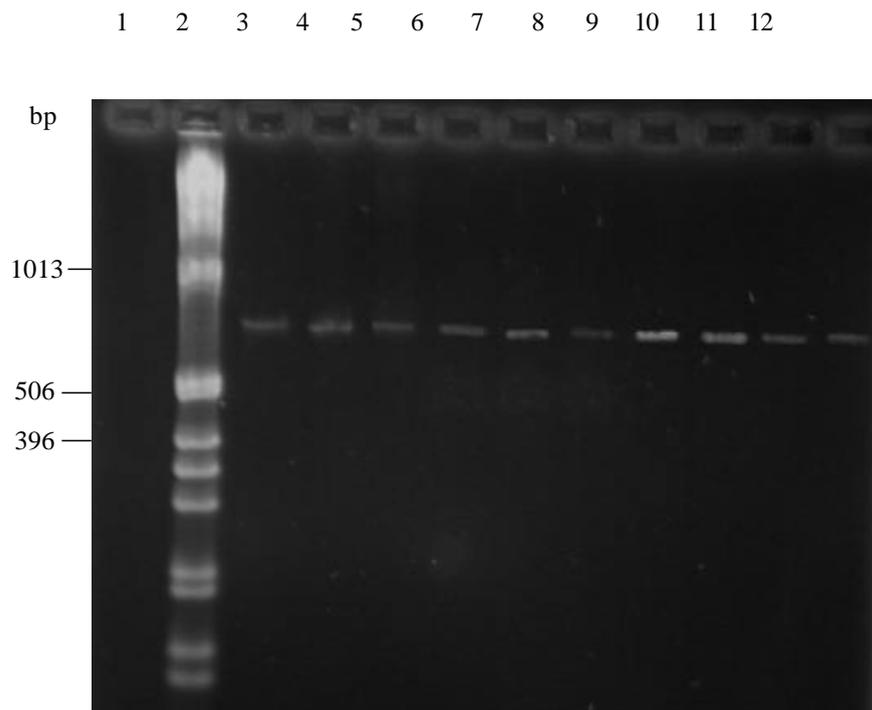
**Abbildung 1:** Repräsentative PCR für  $\beta$ -Aktin

Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2: KB-Leiter, Spur 3-12:  $\beta$ -Aktin-spezifische PCR-Produkte von 423 bp in Proben aus 10 verschiedenen humanen Nierenkarzinomzelllinien

## 5.2. PCR für nm23-H1 und nm23-H2

### 5.2.1. PCR zur Amplifikation von nm23-H1

Nach RT-Reaktion und Nachweis der  $\beta$ -Aktinexpression ist es in allen 29 Zelllinien (26 Nierenkarzinomzelllinien, 3 epitheloide Sarkomzelllinien) gelungen, nm23-H1 mittels PCR nachzuweisen. Entsprechend dem verwendeten Primerpaar (3.4.1.) betrug die Länge der amplifizierten Produkte 702 bp. In Abbildung 2 sind exemplarisch die PCR-Produkte von 10 Zelllinien in der Agarosegelelektrophorese zu sehen. Unspezifische Produkte waren nicht nachweisbar.

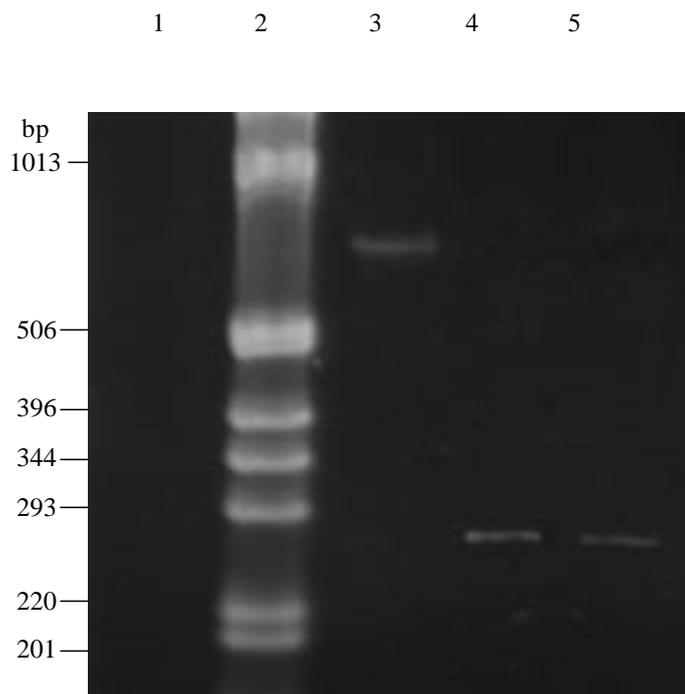


**Abbildung 2:** Repräsentative PCR für nm23-H1

Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2: KB-Leiter, Spur 3-10: nm23-H1-spezifische PCR-Produkte von 702 bp in Proben aus 10 verschiedenen humanen Tumorzelllinien.

Aufgrund der Länge des amplifizierten PCR-Produktes von 702 bp war das Sequenzierungsergebnis in den letzten vom Sequenzierungsgerät zu lesenden Basen einige Male nicht auswertbar, so daß in diesen Fällen auch eine Amplifikation von nm23-H1 in zwei kleineren, sich aber zum Teil überlappenden Abschnitten durchgeführt wurde. Dabei wurden die in Abschnitt 3.4.1. aufgeführten Primer eingesetzt, mit denen 276 (5'-Anteil) bzw. 268 bp (3'-Anteil) große Teile des Gens amplifiziert wurden. Im Gegensatz zu den zuvor nicht auswertbaren Sequenzierungsabschnitten waren die Sequenzierungsergebnisse dieser beiden Genfragmente jedesmal eindeutig.

Abbildung 3 zeigt exemplarisch am Beispiel der Zelllinie clearCa-28 die Agarosegelelektrophorese der mit den 3 verschiedenen Primerpaaren amplifizierten PCR-Produkte von nm23-H1.



**Abbildung 3:** PCR für nm23-H1 mit 3 unterschiedlichen Primerpaaren

Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2: KB-Leiter, Spur 3-5: nm23-H1-spezifische PCR-Produkte von 702 bp (3), 276 bp (4) und 268bp (5).

### **5.2.2. PCR zur Amplifikation von nm23-H2**

Eine Expression von nm23-H2 konnte in allen 29 untersuchten Zelllinien mittels PCR nachgewiesen werden. Dabei lieferte jedoch das in der Veröffentlichung von Leone et al. (1993) angegebene und von uns deshalb zuerst eingesetzte Primerpaar trotz diverser Optimierungsversuche kein spezifisches PCR-Produkt (Abbildung 4).

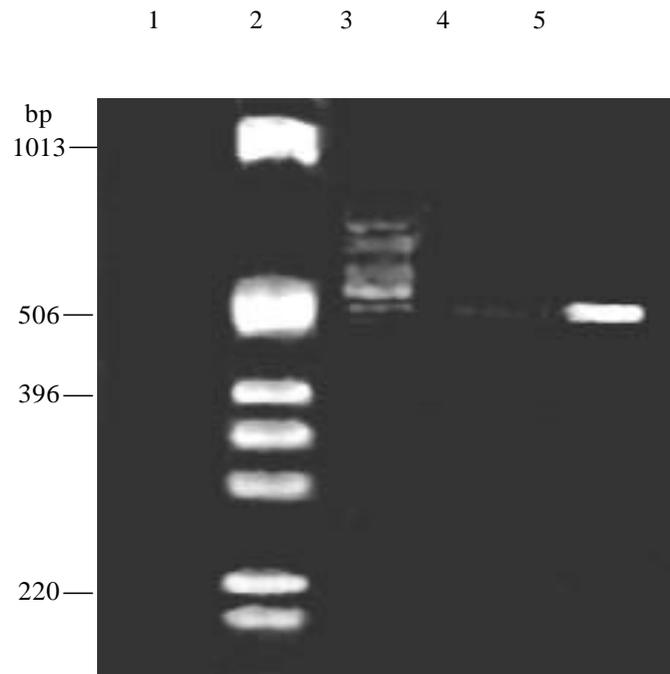
Dies lag am ehesten daran, daß die von Leone et al. (1993) verwendeten sense- und antisense-Primer große Unterschiede in ihrer Basenzusammensetzung aufwiesen. So betrug das Verhältnis der Basen Guanin und Cytosin zu Adenin und Thymin der sense-Primer 11:4, des anti-sense-Primers hingegen 5:12. Da dieses Verhältnis ganz erhebliche Auswirkungen auf die jeweils Primer-spezifischen optimalen PCR-Bedingungen hat, sollten beide Primer eine ähnliche Zusammensetzung aufweisen. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit ein Primerpaar ausgewählt, dessen sense Primer ein Verhältnis der Basen Guanin und Cytosin zu Adenin und Thymin von 15:5 und dessen anti-sense Primer ein Verhältnis von 12:9 aufwies. Außerdem wurden beide Primer am jeweiligen 3'-Ende verlängert, um auch auf diese Weise die Spezifität zu erhöhen.

Mit Hilfe dieses Primerpaares ist es zwar gelungen, das Auftreten unspezifischer PCR-Produkte zu vermeiden, jedoch reichten die Mengen der amplifizierten Produkte für eine nachfolgende Sequenzierung nicht aus. Um die Ausbeute der PCR-Produkte zu steigern, wurde daher eine Doppel- oder nested-PCR durchgeführt. Dabei wurde das in 3.4.2. aufgeführte Primerpaar verwendet. Hierdurch konnte eine deutliche Erhöhung der Produktausbeute des amplifizierten Abschnitts des nm23-H2 Gens erzielt werden (Abbildung 4).

Nachteil der nested-PCR ist die erhöhte Gefahr einer Kontamination, da zum Pipettieren des zweiten PCR-Ansatzes das Reaktionsgefäß nochmals geöffnet werden muß. Durch die bei allen PC-Reaktionen mitgeführten Negativkontrollen konnten Kontaminationen ausgeschlossen werden.

Das so erhaltene PCR-Produkt für nm23-H2 war für die Sequenzierungsreaktion optimal geeignet. Da die Amplifikationslänge mit 502 bp um ca. 200 bp geringer war als bei nm23-H1, waren auch die terminalen Sequenzabschnitte eindeutig beurteilbar.

Abbildung 4 zeigt die zum Erreichen des optimalen Sequenzierungsergebnisses notwendigen PCR in der Agarosegelelektrophorese am Beispiel der Zelllinie clearCa-35.



**Abbildung 4:** PCR für nm23-H2 mit verschiedenen Primern und PCR-Bedingungen am Beispiel der humanen Nierenkarzinomzelllinie clearCa-35  
 Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2: KB-Leiter, Spur 3: PCR-Produkt mit dem Primerpaar von Leone et al. (1993), Spur 4: PCR-Produkt mit dem modifizierten Primerpaar, Spur 5: PCR-Produkt der nested-PCR.

### **5.3. Sequenzierungen von nm23-H1 und nm23-H2**

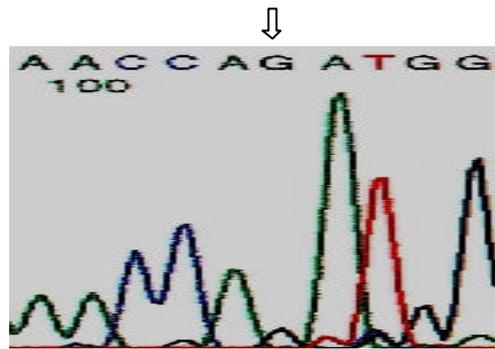
Sowohl für nm23-H1 als auch für nm23-H2 wurde jeweils der gesamte kodierende Genbereich sequenziert. Die Sequenzierungen aller PCR-Produkte erfolgten sowohl vom 3'- als auch vom 5'-Ende. Beim Nachweis mutmaßlicher Mutationen sowie bei uneindeutigen Sequenzierungsergebnissen wurden die Sequenzierungen wiederholt.

#### **5.3.1. Sequenzierung von nm 23-H1**

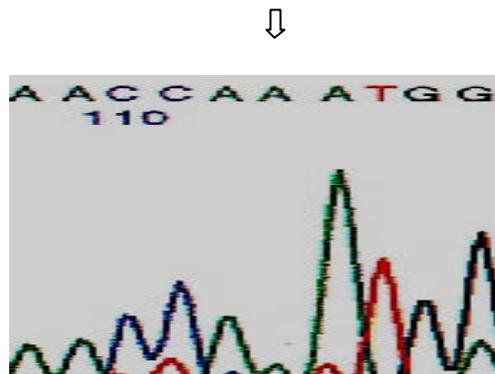
In allen 29 untersuchten Zelllinien ist eine vollständige Sequenzierung von nm23-H1 gelungen. Dabei lag in 28 Zelllinien die Wildtyp-Form von nm23-H1 vor. Lediglich in der humanen Nierenkarzinomzelllinie clearCa-32 war eine Punktmutation nachweisbar, die im Austausch der Base Guanin durch Adenin bestand (Abbildung 5). Diese Mutation betraf Kodon 15 und verursachte eine Änderung in der Aminosäuresequenz von Asparaginsäure zu Asparagin (Tabelle 2).

Sowohl die RT-PCR als auch die Sequenzierung von nm23-H1 wurden für die Zelllinie clearCa-32 zweimal wiederholt, und in allen Fällen konnte dieselbe Mutation nachgewiesen werden. Als Ausgangsmaterial in der Zellkultur dienten dabei zwei verschiedene Passagen (32 und 36) der Zelllinie clearCa-32.

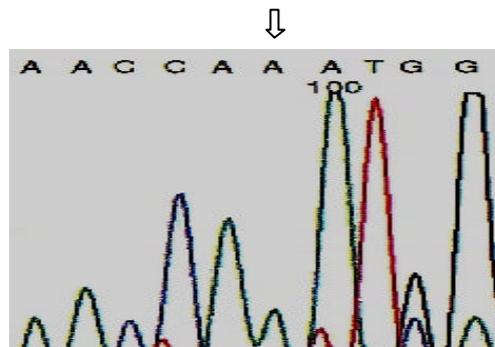
a.)



b.)



c.)



**Abbildung 5:** Nachweis einer Punktmutation von nm23-H1 in 2 Passagen der humanen Nierenkarzinomzelllinien clearCa-32

- a.) Ausschnitt aus der Wildtyp-Sequenz von nm23-H1 mit der Base Guanin an Position 104.
- b.) Ausschnitt der nm23-H1-Sequenz in clearCa-32 (Passage-Nr.32) mit der Base Adenin an Position 113.
- c.) Ausschnitt der nm23-H1-Sequenz in clearCa-32 (Passage-Nr.36) mit der Base Adenin an Position 99.

Kodon-Nr.:	5'-	13	14	15	16	17	-3'
Wildtyp:	5'-	AAA	CCA	GAT	GGG	GTC	-3'
	5'-	Lysin	Prolin	Asparaginsäure	Glycin	Valin	-3'
clearCa-32:	5'-	AAA	CCA	<b>AAT</b>	GGG	GTC	-3'
	5'-	Lysin	Prolin	<b>Asparagin</b>	Glycin	Valin	-3'

**Tabelle 2:** Ausschnitt des Sequenzvergleichs zwischen Wildtyp nm23-H1 und mutiertem nm23-H1 in der Zelllinie clearCa-32.

Im Bereich des Kodons 15 und der benachbarten Kodons ist die Sequenz wie in Abbildung 5 vom 5'-Ende aufgeführt. Unterhalb der Sequenz jedes Kodons steht die dem Kodon entsprechende Aminosäure. Die Mutation ist fettgedruckt.

Um herauszufinden, ob diese Mutation einen zwischen verschiedenen Spezies hoch konservierten Bereich von nm23-H1 betrifft und daher eine funktionelle Relevanz besitzen könnte, wurden die nm23-H1-Sequenzen von Maus (*Mus musculus*), Ratte (*Rattus norvegicus*), der gemeinen Stubenfliege (*Drosophila melanogaster*), Erbse (*Pisum sativum*) und der Pflanze *Flaveria bidentis* miteinander verglichen (Tabelle 3). Dabei zeigte sich, daß die Sequenz GAT in allen von uns verglichenen Spezies an dieser Stelle des nm23-Gens vorkommt, so daß hier ein hoch konservierter Abschnitt des nm23-Gens vorliegt.

Kodon-Nr.:	5'-	14	15	16	-3'
clearCa-32	5'-	CCA	<b>AAT</b>	GGG	-3'
Wildtyp-Mensch	5'-	CCA	GAT	GGG	-3'
Ratte	5'-	CCT	GAT	GGG	-3'
Maus	5'-	CCT	GAT	GGG	-3'
Stubenfliege	5'-	CCC	GAT	GGC	-3'
Erbse	5'-	CCT	GAT	GGT	-3'
Fl. bidentis	5'-	CCC	GAT	GGC	-3'

**Tabelle 3:** Ausschnitt des Sequenzvergleichs zwischen Wildtyp nm23-H1, mutiertem nm23-H1 in der Zelllinie clearCa-32 sowie Wildtyp-nm23 von Ratte, Maus, Stubenfliege, Erbse und der Pflanze *Flaveria bidentis*.

Die Sequenz ist vom 5'-Ende aufgeführt und zeigt Kodon 14-16.

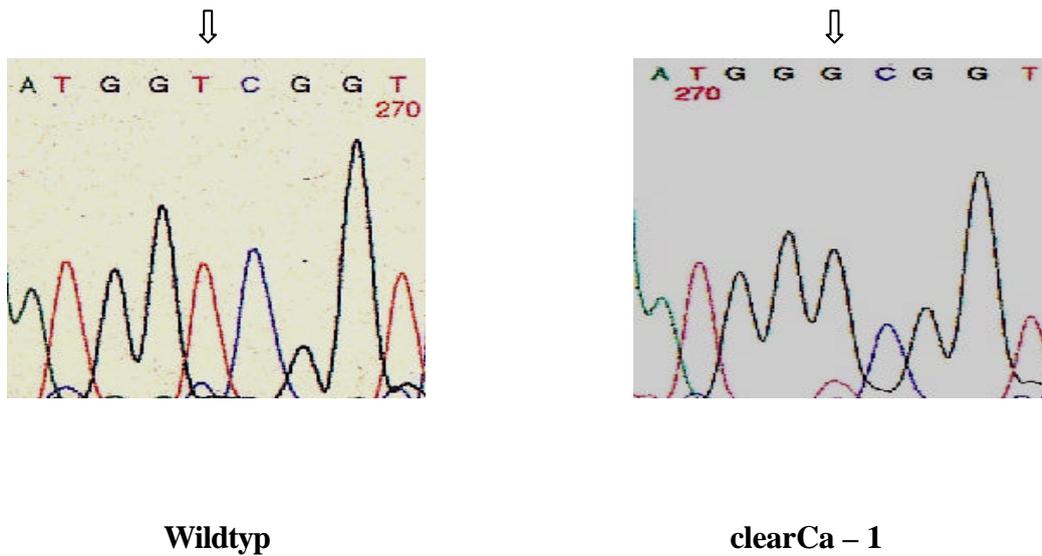
Um zu untersuchen, ob es sich bei der gefundenen nm23-H1-Mutation möglicherweise um ein Zellkulturartefakt handelt, wurden die genomische DNA aus der Passagennummer 1 der Zelllinie clearCa-32 gewonnen und anschließend PCR und Sequenzierung für nm23-H1 durchgeführt. Eine Veränderung der Sequenz für nm23-H1 gegenüber der Wildtypsequenz wurde hier jedoch nicht mehr beobachtet.

Zur Bestätigung dieses Befundes wurde auch aus dem Primärtumor genomische DNA gewonnen (siehe 4.2.4.). Aus der DNA wurde mittels neuer Primer (siehe 3.4.1.) das Exon, in welchem die nm23-H1-Mutation der beiden hohen Zellpassagen der Zelllinie clearCa-32 lag, zuerst amplifiziert und dann sequenziert. Auch in diesem Fall konnte die nm23-H1-Mutation nicht nachgewiesen werden. Somit ist die in den hohen Passagen der Zelllinie clearCa-32 beobachtete Punktmutation von nm23-H1 als ein Zellkulturartefakt zu werten.

### **5.3.2. Sequenzierung von nm23-H2**

In allen 29 untersuchten Zelllinien ist es gelungen eine vollständige Sequenzierung des nm23-H2-Gens durchzuführen. Während in 28 dieser Zelllinien die Wildtyp-Form von nm23-H2 vorlag, waren in der Zelllinie clearCa-1 zwei Basenaustausche vorhanden. Diese betrafen Kodon 58 und Kodon 108 (Abbildung 6 und 7), hatten jedoch keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz (Tabelle 4 und 5). Da somit eine funktionelle Relevanz dieser beiden Punktmutationen ausgeschlossen werden kann, wurde auf eine Aufarbeitung und Analyse des Primärtumors verzichtet. Somit ist zur Zeit unklar, ob es sich um echte, auch im Primärtumor vorhandene, aber sogenannte stumme Mutationen oder um Zellkulturartefakte handelt.

Im Sequenzvergleich dieser Nukleotidsequenzen in verschiedenen Spezies zeigte sich für beide Kodons, daß sowohl der humane Wildtyp als auch mutiertes nm23-H2 in der Zelllinie clearCa-1 für dieselbe Aminosäure kodieren wie in der Ratte, der Maus und der Stubenfliege, so daß auch hier ein hoch konservierter Bereich des nm23-Gens vorliegt.

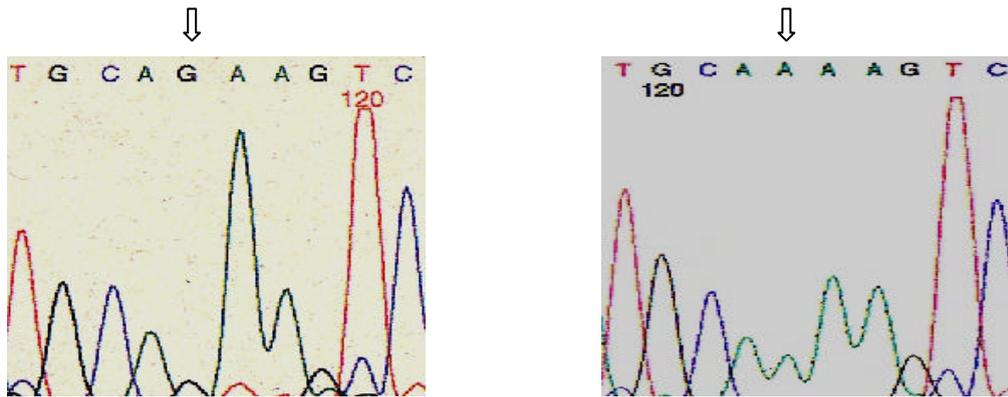


**Abbildung 6:** Nachweis einer Punktmutation von nm23-H2 (Kodon 58) in der Zelllinie clearCa-1. Links: Sequenzausdruck des Wildtyps. Rechts: Sequenzausdruck von clearCa-1.

Kodon Nr.:	3'- 60	59	58	57	56	-5'
Wildtyp:	3'-GAA	TGG	TCG	GTC	TTT	-5'
clearCa-1:	3'-GAA	TGG	<b>GCG</b>	GTC	TTT	-5'
Kodon Nr.:	5'- 56	57	58	59	60	-3'
Wildtyp:	5'-AAA	GAC	CGA	CCA	TTC	-3'
	5'-Lysin	Asparaginsäure	Arginin Prolin		Phenol	-3'
clearCa-1:	5'-AAA	GAC	<b>CGC</b>	CCA	TTC	-3'
	5'-Lysin	Asparaginsäure	Arginin Prolin		Phenol	-3'

**Tabelle 4:** Ausschnitt des Sequenzvergleichs zwischen Wildtyp nm23-H2 und mutiertem nm23-H2 in der Zelllinie clearCa-1 im Bereich des Kodons 58.

Oben: Darstellung der Sequenzen vom 3'-Ende zum 5'-Ende. Unten: Darstellung der entsprechenden reversen und komplementären Sequenz (5'-Ende → 3'-Ende). Die Mutation ist fett gedruckt.



**Wildtyp**

**clearCa - 1**

**Abbildung 7:** Nachweis einer Punktmutation von nm23-H2 (Kodon 108) in der Zelllinie clearCa-1. Links: Sequenzausdruck des Wildtyps. Rechts: Sequenzausdruck von clearCa-1.

Kodon Nr.:	3' - 110	109	108	107	106	-5'
Wildtyp:	3'-AAT	GCA	GAA	GTC	CCC	-5'
clearCa-1:	3'-AAT	GCA	<b>AAA</b>	GTC	CCC	-5'
Kodon Nr.:	5' - 106	107	108	109	110	-3'
Wildtyp:	5'-GGG	GAC	TTC	TGC	ATT	-3'
	5'-Glycin	Asparaginsäure	Phenylalanin	Cystein	Isoleucin-3'	
clearCa-1:	5'-GGG	GAC	<b>TTT</b>	TGC	ATT	-3'
	5'-Glycin	Asparaginsäure	Phenylalanin	Cystein	Isoleucin-3'	

**Tabelle 5:** Ausschnitt des Sequenzvergleichs zwischen Wildtyp nm23-H2 und mutiertem nm23-H2 in der Zelllinie clearCa-1 im Bereich des Kodons 108.

Oben: Darstellung der Sequenzen vom 3'-Ende zum 5'-Ende. Unten: Darstellung der entsprechenden reversen und komplementären Sequenz (5' → 3'). Die Mutation ist fett gedruckt.

Da Basenaustausche ihre Ursache in einem Fehler der DNA-Polymerase haben können, wurde nochmalig cDNA der Zelllinie clear-Ca-1 aufgearbeitet, sowie anschließend die PCR und Sequenzierung durchgeführt. Da sich die Ergebnisse bestätigen ließen, kann ausgeschlossen werden, daß die beiden beobachteten Basenaustausche in nm23-H2 der Zelllinie clearCa-1 auf einem Fehler der DNA-Polymerase beruhen.

### **5.3.3. Zusammenfassung der Sequenzierungsergebnisse**

Insgesamt konnte zunächst in einer von 26 Nierenkarzinomzelllinien eine Punktmutation des nm23-H1-Gens gefunden werden. Diese Mutation führte zum Austausch der zwischen verschiedenen Spezies hoch konservierten Aminosäure Asparaginsäure durch Asparagin in Kodon 15. Da diese Mutation jedoch nur in hohen Passagennummern, nicht aber in niedrigen Passagennummern bzw. im Primärtumor nachzuweisen war, handelt es sich um einen Zellkulturartefakt.

Für nm23-H2 konnten in einer der 26 untersuchten Nierenkarzinomzelllinien zwei Basenaustausche gefunden werden. Diese haben jedoch keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz und besitzen somit keine funktionelle Relevanz.

In den 3 verschiedenen Klonen der humanen epitheloidzelligen Sarkomzelllinie GRU-1 waren weder für nm23-H1 noch für nm23-H2 Mutationen nachweisbar.

## **6. Diskussion**

Nm-23 wurde ursprünglich als ein Gen identifiziert, dessen Expression invers mit dem Metastasierungspotential muriner Melanomzelllinien korrelierte (Steege et al., 1988). Nachfolgend wurde gezeigt, daß die Überexpression von nm23-H1 die Metastasierung humaner Mammakarzinomzellen und muriner Melanomzellen um bis zu 90% inhibieren kann. Analysen zur prognostischen Relevanz der Expression von nm23-H1 und nm23-H2 führten zu uneinheitlichen und eher tumortypspezifischen Ergebnissen. So konnte am Beispiel des Mammakarzinoms gezeigt werden, daß die Expression von nm23-H1 mit einer verlängerten Lebensdauer einhergeht (Tokunaga et al., 1993), während eine prognostische Relevanz von nm23-H1 für humane Prostatakarzinome nicht nachweisbar war (Fishman et al., 1994). In einer Serie von 95 Nierenzellkarzinomen erwies sich die Expression von nm23-H1 als unabhängiger prognostischer Parameter und ging mit einem längerem Überleben der Patienten einher (Nakagawa et al., 1998). In derselben Untersuchung besaß die Expression von nm23-H2 jedoch keine prognostische Relevanz.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals humane Nierenkarzinomzelllinien und humane epitheloide Sarkomzelllinien auf Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 untersucht. Dabei konnte zunächst mit Hilfe der RT-PCR gezeigt werden, daß alle untersuchten Tumorzelllinien (26 Nierenkarzinomzelllinien und 3 klonale Subpopulationen der epitheloiden Sarkomzelllinie GRU-1) nm23-H1 und nm23-H2 auf RNA-Ebene exprimieren. Hinsichtlich der Expression von nm23-H1 und nm23-H2 in humanen Nierenzellkarzinomen stimmen diese Ergebnisse überein mit einer anderen Untersuchung, in der beide nm23-Isoformen mittels Northern Blot in 54 von 54 untersuchten Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden konnten (Theisinger et al., 1998). In anderen Arbeiten hingegen waren nm23-H1 nur in 68,4% (Nakagawa et al., 1998) bzw. 78% (Ljungberg et al., 1999) und nm23-H2 in nur 50,5% (Nakagawa et al., 1998) aller untersuchten Nierenzellkarzinome nachweisbar. Diese Unterschiede dürften am ehesten darauf beruhen, daß die Expression von nm23-H1 und nm23-H2 in diesen beiden Studien mittels Immunhistochemie durchgeführt wurde, während in der vorliegenden Arbeit die wesentlich sensitivere RT-PCR als Untersuchungsmethode eingesetzt wurde.

Am Beispiel des epitheloiden Sarkoms wurden bisher noch keine Expressionsanalysen zu nm23-H1 und nm23-H2 durchgeführt.

Aus Untersuchungen an anderen Tumoren ist bekannt, daß Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 auftreten können (Cohn et al., 1991, Leone et al., 1993, Wang et al., 1993, Chang et al., 1994, Hamby et al., 1995, Mandai et al., 1995, Indinnimeo et al., 1998). Da hierzu jedoch noch keine Untersuchungen am Beispiel humaner Nierenzellkarzinome und humaner epitheloider Sarkome durchgeführt wurden, wurden in der vorliegenden Arbeit 26 Nierenzellkarzinome und 3 verschiedene klonale Subpopulationen der epitheloiden Sarkomzelllinie GRU-1 auf Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 untersucht. Dabei wurden jeweils die gesamten kodierenden Sequenzen beider Gene analysiert. Für nm23-H1 konnte zunächst in einer der 26 Nierenkarzinomzelllinien eine Punktmutation nachgewiesen werden, während in allen anderen Zelllinien die Wildtypform vorlag. Diese Punktmutation von nm23-H1 war in zwei verschiedenen Passagenummern der humanen Nierenkarzinomzelllinie clearCa-32 nachweisbar, betraf Kodon 15 und führte zu einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Asparagin. Darüber hinaus konnte durch einen Spezies-übergreifenden Sequenzvergleich gezeigt werden, daß diese nm23-H1-Mutation auf Proteinebene eine zwischen verschiedenen Spezies hochkonservierte Aminosäure betraf und somit zumindest potentiell eine funktionelle Relevanz besitzen könnte. Um zu überprüfen, ob diese Mutation auch tatsächlich im Primärtumor vorhanden war oder erst im Verlauf der Zellkultur als Zellkulturartefakt aufgetreten ist, wurden auch die Passagenummer 1 dieser Zelllinie sowie der entsprechende Primärtumor analysiert. In beiden Fällen lag nm23-H1 jedoch in seiner Wildtypsequenz vor, so daß die in den Zellkulturpassagenummern 32 und 36 nachgewiesene Mutation von nm23-H1 als ein Zellkulturartefakt zu werten ist. Da diese Mutation bei der Sequenzierung gegenüber der Wildtypform eindeutig überwog, ist davon auszugehen, daß Tumorzellen mit dieser Mutation einen Wachstumsvorteil besitzen und somit im Verlauf der Kultivierung schließlich die dominierende Zellpopulation darstellen.

Bei der Suche nach Mutationen von nm23-H2 lag in 28 Tumorzelllinien die Wildtypform vor. In der Zelllinie clearCa-1 zeigten sich zwei Basenaustausche, die jeweils die 3. Base der Kodons 58 und 108 betrafen, aber keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz hatten. Da somit eine funktionelle Relevanz dieser beiden Punktmutationen ausgeschlossen werden kann, wurde auf eine Aufarbeitung und Analyse des Primärtumors verzichtet. Eine Aussage, ob es sich um echte Mutationen oder um Zellkulturartefakte handelt, ist deshalb nicht möglich.

In der Literatur werden sowohl für nm23-H1 als auch für nm23-H2 Mutationen in verschiedenen humanen Tumoren beschrieben. So fanden Chang et al. (1994) Mutationen des nm23-H1-Gens

bei Neuroblastomen im Kindesalter. Dabei wurde in 6 von 28 Zelllinien, die sich von Neuroblastomen im fortgeschrittenen Stadium ableiteten, eine Punktmutation des Kodons 120 beobachtet, die zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Glycin führte. Im Gegensatz hierzu war diese Mutation in keiner von 22 nicht fortgeschrittenen Neuroblastomen nachweisbar.

Hamby et al. (1995) beschrieben erstmalig eine Punktmutation von nm23-H2 in malignen Melanomzellen, die das Kodon 122 betraf und mit einem Aminosäureaustausch von Serin zu Prolin einherging. In dieser Untersuchung wurden zwei humane Melanomzelllinien miteinander verglichen, und interessanterweise war diese Mutation nur in der stark metastasierenden Melanomzelllinie, nicht aber in der nicht metastasierenden Zelllinie nachweisbar.

Die von Chang et al. (1994) und Hamby et al. (1995) beschriebenen nm23-Mutationen betreffen einen Proteinabschnitt, der im Spezies-übergreifenden Sequenzvergleich der nm23-Familie hochkonserviert ist und für den sogenannten B-Kanal kodiert (Gouaux et al., 1990), der das allosterische Zentrum der NDPK darstellt (Dumas et al., 1992).

Die NDPK wurden 1990 von Wallet et al. als Produkt von nm23 beschrieben. 1991 konnten Gilles et al. die Produkte von nm23-H1 und H2 als Untereinheiten der NDPK identifizieren. Biochemisch katalysiert dieses Enzym unspezifisch den Transfer eines  $\gamma$ -Phosphats auf ein Nucleosiddiphosphat, so daß aus diesem ein Nucleosidtriphosphat entsteht. Die zellbiologischen Funktionen der NDPK sind bislang noch wenig erforscht. Theorien, daß diese ein Gleichgewicht der verschiedenen Nucleosidtriphosphate bewirkt, wurden ebenso widerlegt (Parks & Agarwal, 1973) wie die Theorie, daß NDPK spezifisch GTP zur Aktivierung von G-Proteinen liefern (Randazzo et al., 1992). Außerdem ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt, ob und wenn ja, wie die NDPK in den Metastasierungsprozeß eingreift. Daß die NDPK überhaupt eine Rolle bei der Metastasierung spielt, wird dadurch in Frage gestellt, daß die NDPK-Aktivität in Mäusemelanomzellen durch Überexpression von nm23-H1 nicht beeinflußt wird (Golden et al., 1993). Da die Überexpression von nm23-H1 in Mäusemelanomzellen jedoch zu einer Inhibition der Metastasierung führte, kann man schlußfolgern, daß der metastasierungshemmende Effekt von nm23-H1 weniger auf einer Aktivierung der NDPK als vielmehr einen anderen molekularen Mechanismus beruht.

Weitere Mutationen von nm23-H1 wurden am Beispiel des humanen Rektumkarzinoms gefunden und waren in 10 von 18 Rektumkarzinomen nachweisbar (Indinnimeo et al., 1998).

Interessanterweise zeigten alle Rektumkarzinome mit defekten DNA-Reparaturgenen auch Mutationen von nm23-H1, während solche Mutationen lediglich in 5 von 13 Rektumkarzinomen mit funktionsfähigen DNA-Reparaturgenen auftraten. In einer weiteren Studie von Cohn et al. (1991) wurde in einem Kolonkarzinom eine Deletion von 64 Basenpaaren entdeckt.

In einer weiteren Arbeit (Mandai et al., 1995) wurden 41 Ovarialtumoren, von denen 3 Tumoren benigne waren, auf Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 untersucht. Dabei fand sich lediglich in einem Tumor eine einzige Punktmutation von nm23-H2 in Kodon 133, während für nm23-H1 keine Mutationen nachweisbar waren. Eine Korrelation zwischen dem klinischen Stadium oder dem Vorhandensein klinisch manifester Metastasen und dem Nachweis der nm23-H2-Mutation lag nicht vor. Eine weitere Mutation von nm23-H2 wurde in Neuroblastomen detektiert und betraf das Kodon 48 (Leone et al., 1993). Im Gegensatz hierzu wurden in 12 untersuchten Leberzellkarzinomen keine nm23-Mutationen gefunden werden (Fujimoto et al., 1998).

Auch in der vorliegenden Arbeit, in der neben 3 klonalen epithelialen Sarkomzelllinien 26 Nierenzellkarzinome untersucht wurden, haben sich keine relevanten Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 nachweisen lassen. Dies deutet darauf hin, daß Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 wahrscheinlich keine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Progression humaner Nierenzellkarzinome spielen. Dies schließt aber eine grundsätzliche funktionelle Bedeutung von nm23-H1 und nm23-H2 für die Regulation des biologischen Verhaltens humaner Nierenzellkarzinome nicht aus. So wurde unlängst gezeigt, daß nm23-H1 die Aktivitäten von Tiam1 und Rac beeinflusst (Otsuki et al., 2001), die ihrerseits wiederum eine wichtige Rolle für die Regulation des Invasionsverhaltens humaner Nierenzellkarzinome spielen (Engers et al., 2000, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, daß auch epitheloide Sarkome nm23-H1 und nm23-H2 exprimieren. Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 wurden jedoch in den drei untersuchten Klonen der epitheloiden Sarkomzelllinie GRU-1 nicht gefunden. Aufgrund des sehr kleinen Kollektivs lassen sich jedoch keine generellen Aussagen über die Häufigkeit und funktionelle Bedeutung von nm23-Mutationen im epitheloiden Sarkom machen.

Neben nm23-H1 und nm23-H2 wurden in den letzten Jahren 6 weitere Gene der humanen nm23 Familie entdeckt. Dabei konnte außer für nm23-H1 und nm23-H2 auch für Dr-nm23 eine

NDPK-Aktivität nachgewiesen werden (Erent et al., 2001). Allerdings ist bislang noch völlig unklar, ob diese 6 Gene eine ähnliche metastasierungsinhibierende Funktion wie nm23-H1 besitzen.

## **7. Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurden 26 humane Nierenkarzinomzelllinien und 3 verschiedene klonale Subpopulationen der humanen epitheloiden Sarkomzelllinie GRU-1 auf das Vorliegen von Mutationen der Gene nm23-H1 und nm23-H2 untersucht. Hierzu wurde jeweils die gesamten kodierenden Bereiche beider Gene sequenziert. Lediglich in einer Nierenkarzinomzelllinie konnte eine Punktmutation von nm23-H1 nachgewiesen werden, die mit einem Aminosäureaustausch einherging und eine evolutionär hoch konservierte Aminosäure betraf. Da diese Mutation jedoch weder in einer niedrigen Passagenummer der Zelllinie noch im entsprechendem Primärtumor vorlag, handelte es sich um einen Zellkulturartefakt.

In einer weiteren Nierenkarzinomzelllinie waren 2 Punktmutationen von nm23-H2 nachweisbar, die allerdings zu keinem Aminosäureaustausch führten und daher keine funktionelle Relevanz besaßen.

Somit sind Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 im humanen Nierenzellkarzinom ein offenbar sehr seltenes Ereignis und dürften für die Entstehung und Progression dieser Tumoren von eher untergeordneter Bedeutung sein.

Am Beispiel dreier klonaler Subpopulationen der humanen epitheloiden Sarkomzelllinie GRU-1 konnte erstmalig gezeigt werden, daß auch epitheloide Sarkome nm23-H1 und nm23-H2 exprimieren. Allerdings haben sich keine Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 in diesen Zelllinien nachweisen lassen, so daß sich die bekannten Unterschiede dieser Zelllinien im Invasions-, Migrations-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten nicht durch Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 erklären lassen.

## **8. Literaturverzeichnis**

**Amato, R.J. (2000).** Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Sem. Oncol.* **27**, 177-186.

**Aref, I., Bociak, R.G., Salhani, D. (1997).** Is postoperative radiation for renal cell carcinoma justified ? *Radiother Oncol.* **43**, 155-157.

**Bafico, A., Varesco, L., de Benedetti, L., Caligo, M.A., Gismondi, V., Sciallero, S., Aste, H., Ferrara, G.B., Bevilacqua, G. (1993).** Genomic PCR-SSCP analysis of the metastatic associated nm23-H1 (nme1) gene: a study on colorectal cancer. *Anticancer Research* **13**, 2149-2154.

**Barnes, R., Masood, S., Barker, E., Rosengard, A.M., Coggin, D.L., Crowell, T., King, C.R., Porter-Jordan, K., Wargotz, E.S., Liotta, L.A. (1991).** Low nm23 protein expression in infiltrating ductal breast carcinomas correlates with reduced patient survival. *Am. J. Pathol.* **139**, 245-250.

**Bevilacqua, G., Sobel, M.E., Liotta, L.A., Steeg, P.S. (1989).** Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res.* **49**, 5185-5190.

**Chang, C.L., Zhu, X.X., Thoraval, D.H., Ungar, D., Rawwas, J., Hora, N., Strahler, J.R., Hanash, S., Radany, E. (1994).** Nm23-H1 mutation in neuroblastoma. *Nature* **370**, 335-6.

**Chase, D.R., Enzinger, F.M. (1985).** Epitheloid sarcoma: diagnosis, prognostic indicators, and treatment. *Am. J. Surg. Pathol.* **9**, 241-263.

**Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Mac Donald, R.J., Rutter, W.J. (1979).** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **24**, 5294-5299.

**Chou, Q., Russell, M., Birch, D.E., Raymond, J., Bloch, W. (1992).** Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucl. Acids Res.* **20**, 1717-1723.

**Cimino, G.D., Metchette, K., Issacs, S.T., Zhu, Y.S. (1990).** More false positive Problems. *Nature* **345**, 773-774.

**Cipollini, G., Berti, A., Fiore, L., Rainaldi, G., Basolo, F., Merlo, G., Bevilacqua, G., Caligo, M.A. (1997).** Down-regulation of the nm23-H1 gene inhibits cell proliferation. *Int. J. Cancer* **73**, 297-302.

**Cohn, K.H., Wang, F., DeSoto-LaPaix, F., Solomen, W.B., Paterson, L.G., Arnold, M.R., Weimar, J., Feldman, J.G., Levy, A., Leone, A., Steeg, P.S. (1991).** Association of nm23-H1 allelic deletions with distant metastases in colorectal carcinoma. *Lancet*, **338**, 722-724.

**Dumas, C., Lascu, I., Morera, S., Glaser, P., Fourme, R., Wallet, V., Lacombe M.L., Veron, M., Janin, J. (1992).** X-ray structure of nucleoside diphosphate kinase. *EMBO J.* **11**, 3203-3208.

**Engel, M., Theisinger, B., Seib, T., Seitz, G., Huwer, H., Zang, K.D., Welter, C., Dooley, S. (1993).** High levels of nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA in human squamous-cell lung carcinoma are associated with poor differentiation and advanced tumor stages. *Int. J. Cancer* **55**, 375-379.

**Engel, M., Veron, M., Theisinger, B., Lacombe, M.L., Seib, T., Dooley, S., Welter, C. (1995).** A novel serine/threonine-specific protein phosphotransferase activity of Nm23/nucleoside diphosphate kinase. *Eur. J. Biochem.* **234**, 200-207.

**Engers, R., Gerharz, C.D., Moll, R., Pohl, A., Sarbia, M., Gabbert, H.E. (1994).** Interclonal heterogeneity in a human epitheloid-sarcoma cell line (GRU-1). *Int. J. Cancer.* **59**, 548-553.

**Engers, R., van Roy, F., Heymer, T., Ramp, U., Moll, R., Dienst, M., Friebe, U., Pohl, A., Gabbert, H.E., Gerharz, C.D. (1996).** Growth inhibition in clonal subpopulations of a human epitheloid sarcoma cell line by retionic acid and TNF- $\alpha$ . *Brit. J. Cancer* **73**, 491-498.

**Engers, R., Gerharz, C.D., Donner, A., Mrzyk, S., Krause-Paulus, R., Petek, O., Gabbert, H.E. (1999).** In vitro invasiveness of human epitheloid sarcoma: interclonal heterogeneity and association with tumor cell motility. *Int. J. Cancer* **80**, 406-412.

**Engers, R., Zwaka, T.P., Gohr, L., Weber, A., Gerharz, C.D., Gabbert, H.E. (2000).** Tiam 1 mutations in human renal-cell carcinomas. *Int. J. Cancer* **88**, 369-376.

**Engers, R., Gabbert, H.E. (2000).** Mechanisms of tumor metastases: cell biological aspects and clinical implications. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **126**, 682-692.

**Engers, R., Springer, E., Michiels, F., Collard, J.G., Gabbert, H.E. (2001).** Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 41889-41897.

**Enzinger, F.M. (1970).** Epitheloid sarcoma. A sarcoma stimulating a granuloma or a carcinoma. *Cancer* **26**, 1029-1041.

**Erent, M., Gonin, P., Cherfils, J., Tissier, P., Raschella, G., Giartosio, A, Agou, F., Sarger, C., L, M.L., Konrad, M., Lascu, I., (2001).** Structural and catalytic properties and homology modelling of the human diphosphate kinase C, product of the Drnm23 gene. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1972-1981.

**Fishman, J.R., Gumerlock, P.H., Meyers, F.J., deVere White, R.W. (1994).** Quantitation of nm23 expression in human prostate tissues. *J. Urology* **152**, 202-207.

**Fujimoto, Y., Ohtake, T., Nishimori, H., Ikuta, K., Ohhira, M., Ono, M., Kohgo, Y. (1998).** Reduced expression and rare genomic alteration of nm23-H1 in human hepatocellular carcinoma and hepatoma cell lines. *J. Gastroenterol.* **33**, 368-375.

**Gelfand, D.H. (1989).** PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplifikation. H.A. Erlich, Stockton Press, New York, 17-22.

**Gerharz, C.D., Gabbert, H.E., Störkel, S., Moll, R., Mellin, W., Ramp, U., Thoenes, W. (1989).** Establishment and characterization of phenotypically distinct cell lines from a single chromophilic renal cell carcinoma. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **73**, 396-399.

**Gerharz, C.D., Moll, R., Ramp, U., Mellin, W., Gabbert, H.E. (1990).** Multidirectional differentiation in a newly established human epithelioid sarcoma cell line (GRU-1) with co-expression of vimentin, cytokeratins and neurofilaments. *Int. J. Cancer.* **45**, 143-152.

**Gerharz, C.D., Moll, R., Storkel, S., Ramp, U., Thoenes, W., Gabbert, H.E. (1993).** Ultrastructural appearance and cytoskeletal architecture of the clear, chromophilic, and chromophobe types of human renal cell carcinoma in vitro. *Am. J. Pathol.* **142**, 851-859.

**Gerharz, C.D., Ramp, U., Olert, J., Moll, R., Storkel, S., Marx, N., Gabbert, H.E. (1994).** Cytomorphological, cytogenetic, and molecular biological characterization renal carcinoma cell lines of the clear cell type. *Virchows Arch.* **424**, 403-409.

**Gerharz, C.D., Moll, R., Storkel, S., Ramp, U., Hildebrandt, B., Molsberger, G., Koldovsky, P., Gabbert, H.E. (1995).** Establishment and characterization of two divergent cell lines derived from chromophobe renal cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **146**, 953-962.

**Gerharz, C.D., Hildebrandt, B., Moll, R., Ramp, U., Sarbia, M., Storkel, S., Koldowsky, P., Gabbert, H.E. (1996).** Chromophilic renal cell carcinoma: cytomorphological and cytogenetic characterisation of four permanent cell lines. *Br. J. Cancer* **74**, 1605-1614.

**Gilles, A.M., Presecan, E., Vonica, A., Lascu, I. (1991).** Nucleoside diphosphonate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains responsible for heterogeneity of the hexameric enzyme. *J. Biol. Chem.* **266**, 8784-8789.

**Golden, A., Benedict, M., Shearn, A., Kimura, N., Leone, A., Liotta, L.A., Steeg, P.S. (1993).** *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Human Malignancies.* Boston: Kluwer Academic Publishers, 345-357.

**Gouaux, J.E., Stevens R.C., Lipscomb, W.N. (1990).** Crystal structures of aspartate carbamoyltransferase ligated with phosphonoacetamide, malonate, and CTP or ATP at 2.8-Å resolution and neutral pH. *Biochemistry* **29**, 7702-7715.

**Gyllenstein, U. (1989).** *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplifikation.* H.A. Erlich, Stockton Press, New York, 45-60.

**Hailat, N., Keim, D.R., Melhem, R.F., Zhu, X.X., Eckerskorn, C., Brodeur, G.M., Reynolds, C.P., Seeger, R.C., Lottspeich, F., Strahler, J.R. (1991).** High levels of p19/nm23 protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and with N-myc gene amplification. *J. Clin. Invest.* **88**, 341-345.

**Hamby, C.V., Mendola, C.E., Potla, L., Stafford, G., Backer, M. (1995).** Differential expression and mutation of NME genes in autologues cultured human melanoma cells with different metastatic potentials. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **211**, 578-585.

**Herman, B.G., Frischauf, A.M. (1987).** Isolation of chromosomal DNA. *Meth. Enzymol.* **152**, 180-183.

**Herold, G. und Mitarbeiter (2001).** Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Gerd Herold, Köln, 528-529.

**Howlett, A., Petersen, O., Steeg, P.S., Bissell, M. (1994).** A novel function for Nm23: Overexpression in human breast carcinoma cells leads to the formation of basement membrane and growth arrest. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 1838-1844.

**Hsu, S., Huang, F., Wang, L., Banerjee, S., Winawer, S., Friedmann, E. (1994).** The Role of nm23 in Transforming Growth Factor  $\beta$ 1-mediated Adherence and Growth Arrest. *Cell Growth & Differentiation* **5**, 909-917.

**Indinnimeo, M., Cicchini, C., Stazi, A., Mingazzini, P., Caligo, M.A., Ghimenti, C., Bevilacqua, G. (1998).** Genetic instability, p53 and nm23 mutation and clinicopathological features in rectal carcinoma. *Anticancer Res.* **18**, 989-993.

**Ishikawa, N., Shimada, N., Munakaata, Y., Watanabe, K., Kimura, N. (1992).** Isolation and characterization of a gene encoding rat nucleoside diphosphate kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 14366-14372.

**Kantor, J.D., Mc Cormick, B., Steeg, P.S., Zetter, B.R. (1993).** Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Res.* **53**, 1971-1973.

**Khan, M.H., Yasuda, M., Higashino, F., Haque, S., Kohgo, T., Nakamura, M., Shindoh, M. (2001).** nm23-H1 suppresses invasion of oral squamous cell carcinoma-derived cell lines without modifying matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression. *Am. J. Pathol.* **158**, 1785-1791.

**Lakso, M., Steeg, P.S., Westphal, H. (1992).** Embryonic expression of Nm23 during mouse organogenesis. *Cell growth Differ.* **3**, 873-879.

**Lee, H.Y., Lee, H. (1999).** Inhibitory activity of nm23-H1 on invasion and colonization of human prostate carcinoma cells is not mediated by its NDP kinase activity. *Cancer Lett.* **145**, 93-99.

**Leone, A., Seeger, R.C., Hong, C.M., Hu, Y.Y., Arboleda, M.J., Brodeur, G.M., Stram, D., Slamon, D.J., Steeg, P.S. (1993).** Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene* **8**, 855-865

**Ljungberg, B., Osterdahl, B., Mehle, C. (1999).** Clinical significance of nm23 expression in renal cell carcinoma. *Urol. Res.* **27**, 103-107.

**Lombardi, D., Sacchi, A., D'Agostino, G., Tibursi, G. (1995).** The association of the Nm23-M1 Protein and  $\beta$ -Tubulin correlates with cell differentiation. *Exp. Cell Res.* **217**, 267-271.

**MacDonald, N.J., De La Rosa, A., Benedict, M., Perez-Freije, J.M., Krutsch, H., Steeg, P.S. (1993).** A novel phosphorylation of Nm23, and not its nucleotidic diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastasis. *J. Biol. Chem.* **269**, 25780-25789.

**Mandai, M., Konishi, I., Komatsu, T., Mori, T., Arao, S., Nomura, H., Kanda, Y., Hiai, H., Fukumoto, M. (1995).** Mutation of the nm23 gene, loss of heterozygosity at the nm23 locus and K-ras mutation in ovarian carcinoma: correlation with tumour progression and nm23 gene expression. *Br. J. Cancer* **72**, 691-695.

**Marcu, K.B., Bossone, S.A., Patel, A.J. (1992).** Myc function and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 809.

**Müller, M. und Mitarbeiter (2002/03).** *Chirurgie. Für Studium und Praxis. Med. Verlags- und Informationsdienste, Breisach, 6. Auflage, 263.*

**Munoz-Dorado, J., Inoue, M., Inoue, S. (1990).** Nucleoside diphosphate kinase from *Myxococcus xanthus*. *J. Biol. Chem.* **265**, 2702-2706.

**Nakagawa, Y., Tsumatani, K., Kurumatani, N., Cho, M., Kitahori, Y., Konishi, N., Ozono, S., Okajima, E., Hirao, Y., Hiasa, Y. (1998).** Prognostic value of nm23 protein expression in renal cell carcinomas. *Oncology* **55**, 370-376.

**Nakamori, S., Ishikawa, O., Ohhigashi, H., Kameyama, M., Furukawa, H., Sasaki, Y., Inaji, H., Higashiyama M., Imaoka, S., Iwanaga T. (1993).** Expression of nucleoside diphosphate kinase/nm23 gene product in human pancreatic cancer: an association with lymph node metastasis and tumor invasion. *Clin. exp. Metast.* **11**, 151-158.

**Nienhaus, C., Gehrman, P. (1991).** PCR: Kontaminationen und deren Vermeidung. *Biotechniques* **2**, 48-50.

**Ohara, O., Dorit, R.L., Gilbert, W. (1989).** One-sided polymerase chain reaction: The amplification of cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5673-5677.

**Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y., Hayashi, M., Henzel, W.J., Hozumi, M. (1992).** Identity of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with Nm23/nucleoside diphosphate kinase. *Biochem. biophys. Res. Comm.* **182**, 987-994.

**Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Hozumi, M., Honma, Y., Kimura, N., Baba, H., Urano, T., Shiku, H. (1995).** A new function of Nm23/NDP kinase as a differentiation inhibitory factor, which does not require its kinase activity. *FEBS Letters* **363**, 311-315.

**Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y. (1998).** Differentiation inhibitory factor Nm23 as a prognostic factor for acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **32**, 19-28.

**Otsuki, Y., Tanaka, M., Yoshii, S., Kawazoe, N., Nakaya, K., Sugimura, H. (2001).** Tumor metastasis suppressor nm23-H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 4385-4390.

**Parks, R.E., Agarwal, R.P. (1973).** The enzymes. New York: Academic Press. Vol. **8**, 307-333.

**Postel, E., Berberich, S., Flint, S., Ferrone, C. (1993).** Human c-myc transcription factor PuF identified as Nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science* **261**, 478-480.

**Prat, J., Woodruff, J.M., Marcove, R.C. (1978).** Epithelioid sarcoma: an analysis of 22 cases indicating the prognostic significance of vascular invasion and regional lymphnode metastasis. *Cancer* **41**, 1472-1487.

**Randazzo, P., Northup, J.K., Kahn, R.A. (1991).** Activation of a small GTP-binding protein by nucleoside diphosphate kinase. *Science* **254**, 850-853.

**Reeves, B.R., Fisher, C., Smith, S., Courtenay, V.D., Robertson, D. (1987).** Ultrastructural, immunocytochemical, and cytogenetic characterization of a human epithelioid sarcoma cell line (RM-HS1). *J. Natl. Cancer Inst.* **78**, 7-18.

**Rosengard, A.M., Krutzsch, H.C., Shearn, A., Biggs, J.R., Barker, E., Margulies, I.M., King, C.R., Liotta, L.A., Steeg, P.S. (1989).** Reduced nm23/Awd protein in tumor metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* **342**, 177-180.

**Saiki, R.K. (1989).** PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplifikation. H.A. Erlich, Stockton Press, New York, 7-16.

**Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* **74**, 5463-5467.

**Sonobe, H., Furihata, M., Iwata, J., Oka, T., Ohtsuki, Y., Hamasato, S., Fujimoto, S. (1993).** Morphological characterization of a new human epithelioid sarcoma cell line, ES020488, in vitro and in vivo. *Virchows Arch. B.* **63**, 219-225.

**Stahl, J.A., Leone, A., Rosengard, A.M., Porter, L., King, C.R. and Steeg, P.S. (1991).** Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res.* **51**, 445-449.

**Steeg, P.S., Bevilacqua, G., Kopper, L. Thorgeirsson, U.P., Talmadge, J.E., Liotta, L.A. and Sobel, M.E. (1988).** Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**, 200-204.

**Teng, D.H., Bender, L.B., Engele, C.M., Tsubota, S., Ventkatesh, T. (1991).** Isolation and characterization of the prune locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **128**, 373-380.

**Theisinger, B., Engel, M., Seifert, M., Seitz, G., Welter, C. (1998).** NM23-H1 and NM23-H2 gene expression in human renal tumors. *Anticancer Res.* **18**, 1185-1189.

**Tokunaga, Y., Urano, T., Furukawa, K., Kondo, H., Kanematsu, T, Shiku, H. (1993).** Reduced expression of nm23-H1, but not of nm23-H2, is concordant with the frequency of lymph-node metastasis of human breast cancer. *Int. J. Cancer* **55**, 66-71.

**Tse, W.T., Forget, B.G. (1990).** Reverse Transcription and direct amplification of cellular RNA transcripts by Taq polymerase. *Gene* **88**, 293-296.

**Wallet, V., Mutzel, R., Troll, H., Barzu, O., Wurster, B., Véron, M., Lacombe, M.L. (1990).** Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous to Nm23 and Awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and *Drosophila* development. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1199-1201.

**Wang, L., Patel, U., Ghosh, L. and Banerjee, S. (1993).** Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res.* **53**, 717-720.

**Weber, A., Engers, R., Nockemann, S., Gohr, L.L., zur Hausen, A., Gabbert, H.E. (2001).** Differentially expressed genes in association with in vitro invasiveness of human epitheloid sarcoma. *Mol. Pathol.* **54**, 324-330.

**Williams, J.F. (1989).** Optimizations strategies for the PCR. *Biotechniques* **7**, 762-768.

## Danksagung

Mein herzlicher Dank richtet sich an Herrn PD Dr. Engers, der durch intensive Betreuung und stetige Diskussionsbereitschaft maßgebend zum guten Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Ferner gilt mein Dank auch den anderen Ärzten, Doktoranden und technischen Assistenten des Pathologischen Institutes, die mir die Einarbeitung in die verschiedensten Bereiche der Molekulargenetik erleichterten und bei Schwierigkeiten mit Rat und Tat zur Seite standen.

## Lebenslauf

**Name:** Petek  
**Vorname:** Oliver  
**Geburtsdatum/-ort:** 27.09.1971 in Düsseldorf  
**Familienstand:** ledig  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

1978-1982 Schulausbildung an der Grundschule Walder Straße in Hilden  
1982-1991 Schulausbildung mit Abitur am Helmholtz-Gymnasium Hilden  
1991-1992 Wehrdienst in Itzehoe (Sanitätssoldat)  
10/92-10/98 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
01/99-06/00 Arzt im Praktikum im Universitätsklinikum Aachen (Kardiologie)  
seit 07/00 Assistenzarzt FNK Kaiserswerth-Düsseldorf (Innere Medizin)

Düsseldorf, den 26.11.2002

---

(Oliver Petek)

Analysen zur Expression und Mutation des Antimetastasierungsgens nm23 in humanen Nierenkarzinomzelllinien und epitheloiden Sarkomen (Oliver Petek)

Das entscheidende Charakteristikum maligner Tumoren ist ihre Fähigkeit zu metastasieren. Auf molekularer Ebene sind viele unterschiedliche Gene und Genprodukte in die Regulation der Metastasierung involviert. Eines dieser Gene ist nm23, das ursprünglich in malignen Melanomzellen als Metastasierungsinhibitor beschrieben wurde und von dem verschiedene Isoformen existieren. Außerdem wurde gezeigt, dass sowohl für nm23-H1 als auch für nm23-H2 Mutationen in humanen Tumoren auftreten können. Da bislang noch sehr wenig über die Funktion von nm23-H1 und nm23-H2 in humanen Nierenzellkarzinomen und humanen epitheloiden Sarkomen bekannt ist und Mutationsanalysen zu beiden Genen in diesen Tumoren noch nicht durchgeführt wurden, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, humane Nierenzellkarzinome und epitheloide Sarkome auf die Expression und das Vorliegen von Mutationen der Gene nm23-H1 und nm23-H2 hin zu untersuchen.

Hierzu wurden 26 humane Nierenkarzinomzelllinien und 3 klonale Subpopulationen der humanen epitheloiden Sarkomzelllinien GRU-1 mittels nm23-H1- und nm23-H2-spezifischer RT-PCR analysiert und anschließend jeweils der komplette offene Leserahmen von nm23-H1 und nm23-H2 sequenziert. In allen 26 Nierenkarzinomzelllinien waren nm23-H1 und nm23-H2 auf RNA-Ebene nachweisbar. Bei der Sequenzierung beider Gene fand sich zunächst in einer Nierenkarzinomzelllinie eine potentiell relevante Punktmutation von nm23-H1. Durch Analyse unterschiedlicher Passagenummern dieser Zelllinie und des Primärtumors konnte jedoch gezeigt werden, dass die beobachtete nm23-H1-Mutation einem Zellkulturartefakt entsprach. Für nm23-H2 konnten in einer Nierenkarzinomzelllinie 2 verschiedene Punktmutationen nachgewiesen werden. Da diese jedoch nicht mit einem Aminosäureaustausch einhergingen, kann eine funktionelle Relevanz dieser Mutationen ausgeschlossen werden. Somit sind Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 im humanen Nierenzellkarzinom ein offenbar sehr seltenes Ereignis und dürften für die Entstehung und Progression dieser Tumoren von eher untergeordneter Bedeutung sein. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt, dass auch humane epitheloide Sarkome nm23-H1 und nm23-H2 exprimieren. Mutationen beider Gene haben sich in den untersuchten Zelllinien jedoch nicht nachweisen lassen, so dass sich die bekannten Unterschiede dieser Zelllinien im biologischen Verhalten nicht durch Mutationen von nm23-H1 und nm23-H2 erklären lassen.