

Aus der Klinik für Chirurgie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch

Charakterisierung von Promotorpolymorphismen des
proliferationsassoziierten, humanen *pKi-67* Gens

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Alexandra Wehrstedt
aus Gelsenkirchen

Lübeck 2004

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Michael Duchrow
2. Berichtstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2005
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.06.2005

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann
– Dekan der Medizinischen Fakultät –

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	1
2 MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1 Bakterienstämme.....	9
2.1.1 Verwendete Bakterienstämme.....	9
2.1.2 Kultivierung der Bakterien.....	9
2.1.2.1 Nährmedien, Antibiotika, Anzucht.....	9
2.1.2.2 Langzeitlagerung der Bakterien.....	10
2.2 Verwendete Vektoren.....	10
2.3 Verwendete Tumorproben (genomische DNA).....	11
2.4 Zellen und Zelllinien.....	11
2.4.1 Verwendete Zelllinie.....	11
2.4.2 Kultivierung von Zelllinien.....	12
2.4.2.1 Kulturbedingungen und Anzucht.....	12
2.4.2.2 Zellzahlbestimmungen (Neubauerzählkammer).....	12
2.4.2.3 Langzeitlagerung von Zelllinien.....	12
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	13
2.5.1 Isolierung von Vektor-DNA.....	13
2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	13
2.5.3 Restriktionsverdau des Vektors.....	13
2.5.4 Dephosphorylierung von restriktionsverdauten Vektoren.....	14
2.5.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren (DNA).....	14
2.5.6 Herstellung von Oligodesoxynucleotiden (Primern).....	15
2.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	15
2.5.8 Ligation und Transformation der isolierten DNA in TOPO-Vektoren (TOPO-Cloning).....	17
2.5.9 Sektorenausstrich und Mini-Prep / Purifikation von Plasmid-DNA.....	17
2.5.10 DNA-Sequenzierung der TOPO-Plasmide.....	18
2.5.10.1 Sequenzierung.....	18

2.5.10.2 Sequenzvergleich.....	20
2.5.11 Maxi-Prep / Purifikation von Plasmid-DNA	20
2.5.12 Umklonierungstechniken.....	21
2.5.12.1 Restriktionsverdau von TOPO-Plasmiden.....	21
2.5.12.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen (präp. Gel).....	21
2.5.12.3 Ligation von DNA-Fragmenten in pGL3-Basic-Vektoren.....	22
2.5.12.4 Herstellung kompetenter Zellen (<i>E. coli</i>).....	22
2.5.12.5 Transformation in <i>E. coli</i>	23
2.5.12.6 Überprüfung der Transformation.....	23
2.5.13 Transfektion von Vektor-DNA in humane Zellen.....	23
2.5.13.1 Aufbereitung der Plasmide für die Transfektion.....	23
2.5.13.2 Transiente Transfektion mittels Elektroporation.....	24
2.5.13.3 Cotransfektion.....	24
2.5.14 Dual-Luciferase Reporter Assay (DLR Assay).....	24
2.5.14.1 Zellernte und Meßvorgang.....	25
2.5.14.1.1 Passive Zellyse.....	25
2.5.14.1.2 Vorbereitung und Meßvorgang.....	25

3 ERGEBNISSE.....26

3.1 Herstellung der verschiedenen Inserts.....	26
3.2 Konstruktion der Reportergenplasmide.....	27
3.3 Einteilung der Plasmide.....	29
3.4 Aktivitätsbestimmungen der Promotorfragmente.....	32
3.5 Auswertung.....	34
3.5.1 Gruppeneinteilung nach Duchrow et al.....	36
3.5.2 Alternative Gruppeneinteilung.....	38
3.5.3 Berechnung von Promotoraktivitäten.....	40

4 DISKUSSION	43
4.1 Diskussion der Methode.....	43
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	45
4.2.1 Charakterisierung des gesamten untersuchten <i>pKi-67</i> Promotorfragmentes.....	45
4.2.1.1 Potentielle DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren an den Genloci der Polymorphismen.....	45
4.2.2 Charakterisierung des 74/DanPri-Fragmentes.....	51
4.2.2.1 Silencer.....	51
4.2.2.2 TATA-Box und Inr-Element.....	52
4.2.3 Gruppeneinteilung nach Duchrow et alteres	54
4.2.4 Alternative Gruppeneinteilung.....	55
4.2.5 Revidierte Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier.....	56
5 ZUSAMMENFASSUNG	59
6 LITERATUR	61
7 ABKÜRZUNGEN	72
8 ANHANG	76
8.1 Nährmedien, Kulturmedien und Lösungen.....	76
8.1.1 Nährmedien / Kulturmedien.....	76
8.1.2 Lösungen.....	77
8.2 Oligodesoxynucleotiden (Primer) für die Sequenzierung.....	79
8.3 Chemikalien und Geräte.....	79
8.3.1 Enzyme und Chemikalien.....	79
8.3.2 Geräte.....	79
8.3.3 Komplette Kits.....	81
8.4 Graphische Darstellung des <i>pKi-67</i> Promotor.....	82
8.5 <i>pKi-67</i> Sequenz.....	83
8.6 Potentielle DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren am <i>pKi-67</i> Promotorfragment.....	85

8.7 Weitere Polymorphismen im <i>pKi-67</i> Promotorfragment.....	89
8.8 Verwendete Tumorproben.....	91
8.9 Meßergebnisse.....	92
8.10 Danksagung.....	96
8.11 Lebenslauf.....	97

1 EINLEITUNG

Komplexe Organismen unterscheiden sich von den primitiven Einzellern insbesondere dadurch, daß ihre zahlreichen Zelltypen zu einer übergeordneten Organisationsform zusammengefaßt und durch sie koordiniert werden. Erst durch regulierende Kommunikationssysteme und effektive Kontrollmechanismen ist die Aufrechterhaltung der physiologischen Zellfunktionen und somit ein Überleben des Organismus in seiner Gesamtheit möglich. Kontrollen über die Zellvermehrung sind von essentieller Bedeutung für seine Integrität. Zellschäden, insbesondere Schäden der DNA, müssen vor ihrer Replikation erkannt und ihre Reparatur initiiert werden. Hierzu dienen die sogenannten „Checkpoints“, die Kontrollpunkte in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Durch sie soll die weitere Proliferation von Zellen mit hochgradig instabilen Genomen unterbunden werden (Hartwell und Kastan 1994). „Checkpoints“ (interne Signaltransduktionssysteme) können eine Vielzahl von zellulären Antworten einleiten, darunter auch den programmierten Zelltod (Apoptose). Ein Scheitern der Zellarretierung infolge eines Defektes in der Kontrollstelle des Zellzyklus kann zu einer atypischen Zellproliferation - einer Differenzierungsstörung - führen.

Ein Verlust des Kontrollmechanismus begünstigt die Karzinogenese, da Dysplasien und atypische Hyperplasien als morphologische Vorläuferläsionen von Malignomen gelten (Dysplasie-Karzinom-Sequenz; Böcker et al. 1997). Der Prozeß der malignen Entartung von Zellen und Geweben verläuft über mehrere Stufen. Bis zur kompletten Transformation und konsekutiver Progression sind mehrere Defekte im Genom notwendig (Mehrschritttheorie der Krebsentstehung; Böcker et al. 1997). Hierbei müssen zelluläre Onkogene (= Protoonkogene) aktiviert und Tumorsuppressorgene inaktiviert werden.

Letztlich kann nach der monoklonalen Entwicklungstheorie bei epithelialen Läsionen eine maligne Neoplasie aus einer einzigen, transformierten und jetzt stark proliferierenden Zelle ausgehen (Böcker et al. 1997).

Das Ki-67 Protein (pKi-67) als Proliferationsmarker

Ein Marker zur immunhistochemischen Beurteilung der Proliferationsaktivität von Zellen ist hinsichtlich der Bewertung von Neoplasien von klinisch-praktischem Interesse. Mit der Erstbeschreibung des monoklonalen Antikörpers „Ki-67“ gelang es 1983 Gerdes et al., einen geeigneten Marker dafür vorzustellen. Ki-67 ist gegen das Ki-67 Protein (pKi-67), ein nukleären Antigen, gerichtet (Gerdes et al. 1983). Zunächst konnte das Ki-67 Antigen nur

in Gefrierschnitten (Gerdes et al. 1983) nachgewiesen werden. Mit der Entwicklung von MIB-1 und -3 (Gerdes et al. 1991, Gerdes et al. 1992, Key et al. 1993) gelang es, weitere Antikörper gegen das Ki-67 Protein herzustellen. Deren Epitope liegen genau wie das Epitop des Ki-67 Antikörpers auf dem gleichen Antigenabschnitt, im sogenannten „Ki-67 Motiv“, einem mehrfach im Antigen vorkommenden, identischen Peptid von 20 Aminosäuren (Key et al. 1993, Schlüter et al. 1993, Kubbutat et al. 1994). Da die Epitope etlicher Antikörper gegen das Ki-67 Antigen im Ki-67 Motiv liegen (Duchrow et al. 1994a, Kubbutat et al. 1994, Duchrow et al. 1995), ist es vermutlich stark immun-dominant. Mit MIB-1 und -3 läßt sich das Ki-67 Protein erstmalig auch in formalinfixierten Paraffinschnitten nachweisen (Key et al. 1993). Der Vorteil liegt darin, daß in standard-mäßig aufbereitetem Gewebe das Ki-67 Antigen bestimmt und retrospektiv in bereits archi-viertem Material ermittelt werden kann (Cattoretti et al. 1992).

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, daß die Proliferationsaktivität von Zellen, insbesondere in Tumorgewebe, mittels Ki-67 reproduzierbar und zuverlässig nachgewiesen werden kann (Shepherd et al. 1988, Berenzi et al. 1992, McCormick et al. 1993, Sugai et al. 1999, Scholzen und Gerdes 2000, Brown und Gatter 2002). Allerdings wiesen van Dierendock et al. (1989), Littleton et al. (1991) und van Oijen et al. (1998) darauf hin, daß die durch das Ki-67 Antigen ermittelte Wachstumsfraktion bei einem Zellzyklusarrest (z. B. bei gleichzeitiger Expression des p53- oder p21-Wildtyps) zu hoch bewertet werden kann.

Zahlreiche Originalarbeiten belegen, daß die immunhistochemische Färbung des Ki-67 Antigens heute inzwischen als Ki-67 Markierungsindex ($\hat{=}$ Quotient aus Ki-67 positiv anfärbaren Tumorzellen zu allen Tumorzellen) in der Routinediagnostik etabliert ist, da hierdurch die Wachstumsfraktion von Tumoren schnell und sicher bestimmt werden kann (Brown und Gatter 1990, Hitchcock et al. 1991, Duchrow et al. 1995). Zudem ist er leichter zu ermitteln als der „Goldstandard“ der Proliferationsbestimmung, der Mitose-Index (Schwartz 1993).

In Studien zur klinisch-pathologischen Anwendung des Ki-67 Antigens zeigte sich folgendes:

Gerdes et al. fanden 1984 eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem Anteil an Ki-67 positiv anfärbaren Zellkernen und der „Kiel-Klassifikation“ von Non-Hodgkin-Lymphomen bezüglich hoch- und niedriggradiger Differenzierung. Für den Ki-67 Markierungsindex wurde eine positive Korrelation zur Prognose rezidivfreien Überlebens bei Mamma-, Lungen- und Blasen-tumoren sowie hepatozellulären Karzinomen nach-

gewiesen (Ueda et al. 1989, Tungekar et al. 1991, Wintzer et al. 1991, Fontana et al. 1992, Locker et al. 1992, Kawate et al. 1999).

Für kolorektale Adenokarzinome besteht keine eindeutig signifikante Korrelation zwischen der pKi-67 Expression und der Tumorlokalisation (Porschen et al. 1989 und 1991, Bennetti et al. 1992, Berenzi et al. 1992, Sahin et al. 1994, Jansson und Sun 1997, Kyzer et al. 1997, De Jong et al. 1998), dem Tumorstadium [Staging] (Porschen et al. 1989 und 1991, Lanza et al. 1990, Bennetti et al. 1992, Berenzi et al. 1992, Kubota et al. 1992, Sahin et al. 1994, Öfner et al. 1996, De Jong et al. 1998), der Tumorgöße (Porschen et al. 1989 und 1990, Suzuki et al. 1992, Sahin et al. 1994, Kyzer et al. 1997), der Tumordifferenzierung [Grading] (Shepherd et al. 1988, Hoang et al. 1989, Porschen et al. 1989 und 1990, Bennetti et al. 1992, Berenzi et al. 1992, Kubota et al. 1992, Sahin et al. 1994, Öfner et al. 1996, Jansson und Sun 1997, De Jong et al. 1998), dem DNA-Gehalt (Sahin et al. 1994, Jansson und Sun 1997), der S-Phase-Fraktion (Jansson und Sun 1997) sowie dem Alter (Porschen et al. 1989 und 1990, Bennetti et al. 1992, Berenzi et al. 1992, Sahin et al. 1994, Jansson und Sun 1997, Kyzer et al. 1997), Geschlecht (Porschen et al. 1989 und 1990, Bennetti et al. 1992, Berenzi et al. 1992, Öfner et al. 1996, Jansson und Sun 1997, Kyzer et al. 1997, De Jong et al. 1998) und dem Überleben (Kubota et al. 1992, Jansson und Sun 1997, Jernvall et al. 1999) der Patienten. Auch der Lymphknotenstatus (Shepherd et al. 1988, Suzuki et al. 1992, Sahin et al. 1994) sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (Shepherd et al. 1988, Hoang et al. 1989, Sahin et al. 1994) wiesen keine Korrelation mit dem Ki-67 Markierungsindex auf.

Allerdings gibt es hierzu auch konträre Studien, die eine signifikante Korrelation nachweisen konnten: Saleh et al. (1999) fanden, daß hohe Ki-67 Markierungsindices häufiger mit Lymphknotenmetastasen, einem geringeren Differenzierungsgrad und der Größe bei kolorektalen Neoplasien assoziiert waren. Der mittlere Ki-67 Markierungsindex korrelierte signifikant mit histologischen Parametern, die mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Des weiteren beschrieben sie ein inverses Verhältnis zwischen dem Onkoprotein bcl-2 und Ki-67. Eine positive Korrelation zwischen dem Ki-67 Markierungsindex und Metastasen beschrieben auch Suzuki et al. (1992) und Kyzer et al. (1997). Palmqvist et al. (1999) fanden, daß der Ki-67 Markierungsindex bei kolorektalen Karzinomen des Typs B nach der Dukes-Klassifikation am invasiven Tumorrand ermittelt ein signifikanter prognostischer Marker sei. Eine niedrige Proliferationsrate der Tumorzellen korrelierte mit einer schlechten Prognose.

Demzufolge korreliert die immunhistochemische Färbung der pKi-67 Expression bei kolorektalen Karzinomen nicht eindeutig mit klinisch-pathologisch-prognostischen Parametern. Vielmehr scheint dies eine Frage der Quantität der Ki-67 Antigenexpression zu sein. Duchrow et al. (2001a) untersuchten dieses durch quantitative RT-PCR an 25 kolorektalen Adenokarzinomen. Sie fanden eine signifikante Korrelation zwischen dem Ki-67 Markierungsindex und der mRNA-Expression und zwischen diesen beiden Daten und dem Überleben der Patienten.

Molekularbiologische Charakterisierung des Ki-67 Proteins (pKi-67)

Das Ki-67 Antigen ist als ein Nucleon-Kern-Protein (Gerdes et al. 1983, Gerdes et al. 1990a+b, Gerdes et al. 1991) beschrieben, dessen Gen auf Chromosom 10q25-ter lokalisiert ist (Fonatsch et al. 1991). Es gehört zur Familie der MPM2-Phosphoproteine, von denen einige für den zeitlichen Ablauf und die Kontrolle der Mitose verantwortlich sind (Endl und Gerdes 2000a). Es wird in allen Phasen des Zellzyklus (G_1 , S, G_2 und M) mit Ausnahme von G_0 exprimiert (Gerdes et al. 1983 und 1984, Guillaud et al. 1989, Bruno und Darzynkiewicz 1992). Der Ort der vorwiegenden Expression ist zellzyklusabhängig. So ist in der G_1 -Phase das Ki-67 Antigen besonders im Nucleolus präsent. In der S-Phase nimmt der Ki-67 Gehalt in der Nuclearmatrix zu und erreicht in der G_2 -Phase sein Maximum. Jedoch bleibt er quantitativ unter dem Ki-67 Gehalt im Nucleolus (Braun et al. 1988, Guillaud et al. 1989, Verheijen et al. 1989, du Manoir et al. 1991, Kreitz et al. 2000). Das nukleäre Ki-67 Antigen verschwindet, sobald proliferierende Zellen zu ruhenden Zellen transformieren (Gerdes et al. 1983). Das Ki-67 Protein (pKi-67) ist zum Großteil nicht mit der nukleären Matrix assoziiert, ein kleiner Teil ist jedoch matrixassoziiert (MacCallum und Hall 1999). Ferner unterliegt es der posttranslationalen Modifizierung durch Phosphorylierung (Endl und Gerdes 2000a+b).

Die Expression des Ki-67 Antigens ist für den ungestörten Ablauf des Zellzyklus zwingend notwendig (Schlüter et al. 1993). Duchrow et al. (1996) diskutierten, daß nicht ausgeschlossen werden könne, daß das Ki-67 Protein entweder ein potentielles Onkogen oder in den Regulaturmechanismus der Apoptose eingebunden sei. Schmidt et al. (2003) berichteten, daß pKi-67 für die Destruktion und Rekonstruktion des Nucleolus verantwortlich sei. Es wird vermutet, daß pKi-67 für die Transition von der G_1 - zur S-Phase des Zellzyklus sowie für die Beendigung der S-Phase eine wichtige Rolle spielt (Duchrow et al. 2001b). Ferner scheint pKi-67 bei der Initiierung der DNA-Replikation beteiligt zu sein (Schmidt

et al. 2002). Letztendlich ist die Funktion des Ki-67 Proteins bis heute nicht vollständig geklärt.

Das native Ki-67 Protein konnte mit einer schnellen Protein-Präparationsmethode dargestellt werden. Hierbei fand man zwei verschiedene Molekülgrößen: 345 kDa und 395 kDa (Gerdes et al. 1991, Duchrow et al. 1994a+b). Mit der Immunoscreening-Methode wurde das *pKi-67* Gen kloniert und sequenziert (Schlüter et al. 1993, Duchrow et al. 1994b, Duchrow et al. 1996). Hier konnten zwei unterschiedlich lange Isoformen (cDNAs) mit Basenlängen von 11,4 kb bzw. 12,5 kb isoliert werden. Der Unterschied entsteht durch alternatives Spleißen („Splicing“) von Exon 7 (1080 bp). Insgesamt ist das *pKi-67* Gen in 15 Exons und 14 Introns organisiert und mißt 30 kb (Schlüter et al. 1993, Duchrow et al. 1996). Das *pKi-67* Gen enthält repetitive Elemente von ca. 366 bp - sogenannte „Ki-67 Repetitionen“. In jeder dieser Repetitionen fand sich ein „hoch konserviertes Ki-67 Motiv“ (Schlüter et al. 1993, Duchrow et al. 1994b, Duchrow et al. 1996). Exon 13 enthält, als Zentrum des Gens, alle 16 Repetitionen hintereinandergereiht mit jeweils einem stark konservierten, 22 Aminosäuren (\cong 66 bp) umfassenden Ki-67 Motiv (Duchrow et al. 1996). Die Konsensus-Sequenz der Repetitionen mißt 122 Aminosäuren. Die Repetitionen mit den Ki-67 Motiven machen zwei Drittel der *pKi-67* Sequenz aus. Bei keinem anderen Protein wurde dies bisher beschrieben (Duchrow et al. 1994b). Sequenzierungsanalysen ergaben ferner, daß das Ki-67 Protein 10 starke und 40 schwache PEST-Regionen (Prolin (P)-, Glutamin (E)-, Serin (S)- und Threonin (T)-reiche Peptidsequenzen) aufweist. Nach Rogers et al. (1986) dienen sie potentiellen Proteasen als Erkennungssequenz. Ferner hat es über 200 potentielle Phosphorylierungsstellen sowie eine mögliche, C-terminale ATP/GTP-Bindungsstelle (Schlüter et al. 1993).

Der Promotor des Ki-67 Proteins (*pKi-67* Promotor)

Der Promotor eines Gens ist definiert als „derjenige DNA-Bereich [...], durch den der Initiationspunkt und die Initiationshäufigkeit der Transkription (mRNA-Synthese) festgelegt werden“ (Becker-Follmann et al. 1995). Der unmittelbare Bereich um die Transkriptionsstartstelle, welche per definitionem an Position +1 liegt, wird auch als basaler Promotor bezeichnet. Er reicht von Position -30 bis Position +10. In ihm liegen bei Eukaryoten die Bindungsstellen für die Polymerase II und für die generellen Transkriptionsfaktoren (GTF). Auffallend häufig findet sich in eukaryotischen Promotoren TATA-Boxen (Goldberg-Hogness-Boxen) sowie CCAAT-Boxen als wichtige regulatorische Sequenzele-

mente. Erstere liegen relativ genau zwischen Position –25 bis –30 (bezüglich des Transkriptionsstarts) und weisen 5'-TATAAA-3' als Konsensus-Sequenz auf. Die TATA-Box scheint den exakten Startpunkt der Transkription festzulegen, ist jedoch nicht obligatorisch. Die CCAAT-Box befindet sich zirka zwischen Position –70 und –80. Ihre Konsensus-Sequenz ist 5'-GGCCAATCT-3'. Diese Box steuert vermutlich die Effizienz der Transkription. Sie ist ebenfalls nicht obligatorisch. Darüberhinaus findet man zwischen Position –60 bis –100 eventuell GC-Boxen (Konsensus-Sequenz: 5'-GGGCGGG-3'). Ihre 5'→3'-Orientierung ist wie diejenige der CCAAT-Boxen - im Gegensatz zu TATA-Boxen - nicht festgelegt. Die GC-Boxen unterstützen wahrscheinlich die Bindung der Transkriptionsfaktoren an den Promotor. Hapgood et al. (2001) stellten die Vermutung auf, daß GC-reiche Regionen in Abwesenheit von TATA- und CCAAT-Boxen eventuell für die basale Transkription essentiell sind.

Der *pKi-67* Promotor besitzt weder eine TATA- noch eine CCAAT-Box (Duchrow et al. 1996). Allerdings weist er GC-reiche Regionen auf. Von Position –75 bis Position +654 (≅ basaler Promotor, Exon 1+2 und Intron 1) finden sich 71 CpGs (Duchrow et al. 1996). Ferner besitzt er 2 GC-Boxen (Konsensus-Sequenz: 5'-GGGCGG-3') bei Position –7 und Position +5. Interessanterweise weist die DNA des *pKi-67* Gens bei Position +471 und bei Position +495 jeweils eine TATA-Box in inverser Orientierung auf (Duchrow et al. 1996). Im zweiten Exon befinden sich zwei identische, jeweils 24 Basenpaare umfassende Repetitionen, die unmittelbar hintereinander liegen, die sogenannten Direct Repeat Boxen 1 und 2 (Duchrow et al. 1996). Durch Sequenzierungsanalysen des *pKi-67* Promotors wurden bei kolorektalen Karzinomen verschiedene Allele gefunden (Duchrow et al. 2002). Die Haplotypen unterschieden sich hauptsächlich an vier Positionen voneinander. Hierbei wurde die Position der Allele relativ zum Primer „PIP 127“ angegeben (vgl. 2.5.6), welcher per definitionem an Position +1' (≅ Position –555 bezüglich des Transkriptionsstarts) mit dem *pKi-67* Promotor hybridisiert (vgl. Tabelle 1 und graphische Darstellung in Kapitel 8.4).

<i>Position TS</i>	<i>Position 127</i>	<i>Polymorphismen</i>
-518	37'	GA; GG
-351	204'	GC; GT
ab -186	ab 369'	drei oder fünf Repetitionen; (5'-CGGG-3' $\hat{=}$ 1 Repetition)
-49	506'	GA; TA

Tabelle 1: Polymorphismen an verschiedenen Genloci im *pKi-67* Promotor: Position TS: Positionsangabe relativ zum Transkriptionsstart (TS); Position 127: Positionsangabe relativ zum Primer „PIP 127“; mit A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin

Die verschiedenen Promotor-Haplotypen waren, bedingt durch unterschiedliche Polymorphismen im Bereich der Genloci -351 und -186, vorläufigen Analysen gemäß der Kaplan-Meier-Methode (Kaplan und Meier 1958) zufolge mit statistisch signifikanten, unterschiedlichen Überlebensraten von Kolonkarzinompatienten (n = 50) assoziiert (Duchrow et al. 2002). Patienten mit der Kombination von Cytosin (C) an Position -351 und fünf Repetitionen bei Position -186 hatten hierbei die schlechteste Prognose (C5-Subtyp).

Aufgabenstellung

Basierend auf den oben genannten Polymorphismen des *pKi-67* Promotors sollte anhand von Reporterassays untersucht werden, inwieweit diese Haplotypen mit einer unterschiedlichen Aktivität des *pKi-67* Promotors verbunden sind.

Hypothese

Die gefundenen Haplotypen könnten aufgrund der unterschiedlichen Polymorphismenkombinationen an den vier Genloci eine unterschiedliche Promoteraktivität aufweisen. Da Promotoren Regulatoren für die mRNA-Synthese sind, würde man letztlich auch eine unterschiedliche *pKi-67* Proteinbildung finden. Erste Hinweise hierfür lieferte die Studie über die Proliferationsaktivität bei kolorektalen Adenokarzinomen mittels Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) von Duchrow et al. (2001a). Sie wiesen nach, daß die Gruppe mit niedrigem *pKi-67*-mRNA-Level signifikant mit einer besseren Prognose korreliert war (p=0,014).

Eine unterschiedliche Promotoraktivität der *pKi-67* Promotor-Allele könnte die in zahlreichen Studien (Shepherd et al. 1988, Hoang et al. 1989, Porschen et al. 1989 und 1991, Berenzi et al. 1992, Kubota et al. 1992, Suzuki et al. 1992, Sahin et al. 1994, Jansson und Sun 1997, Kyzer et al. 1997, Jernvall et al. 1999) beschriebene, fehlende Korrelation zwischen der Immunfärbung mit dem Ki-67 Antikörper und klinisch-pathologischen Parametern und der Überlebenswahrscheinlichkeit erklären, da in diesen Studien keine differentielle Betrachtung und Auswertung bezüglich der Promotortypen stattfinden konnte.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme

2.1.1 Verwendete Bakterienstämme

<i>Bakterienstamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Referenz</i>
<i>E. coli</i> TOP 10	F <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 rec A1 deoR</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>E. coli</i> DH5 α F' IQ	<i>endA1, hsdR17</i> (rk-, mk+), <i>supE44, thi-</i> <i>1, -, recA1, gyrA96, relA1, 80dlacZ</i> M15, (<i>lacZYAargF</i>)U169/F', <i>proAB,</i> <i>lacIq, lacZ M15, Tn5(KmR)</i>	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

Tabelle 2: Der Bakterienstamm *E. coli* TOP 10 wurde von der Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande, und *E. coli* DH5a von Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, hergestellt.

2.1.2 Kultivierung der Bakterien

2.1.2.1 Nährmedien, Antibiotika, Anzucht

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte in autoklaviertem LB-Medium (vgl. 8.1.1). Diesem wurde je nach transfiziertem Plasmid der Bakterien entweder Ampicillin (*E. coli* DH5 α mit pGL3-Basic-Plasmid) oder Kanamycin (*E. coli* TOP 10 mit TOPO-Plasmid) zugesetzt. Die Endkonzentration von Ampicillin betrug 100 μ g/ml, und die Endkonzentration von Kanamycin lag bei 50 μ g/ml.

Die Bakterien wurden bei 37°C im Wasserbad mit einer Schüttelfrequenz von ca. 250 rpm inkubiert. Hierzu wurden 15 ml-Tubes bis zu einem Gesamtvolumen von 5 ml, 100 ml-Erlenmeyerkolben bis zu 10 ml und 1000 ml-Erlenmeyerkolben bis zu 100 ml Gesamtvolumen verwendet.

Mit dem gleichen Medium wurden unter Zusatz von Agarose (15 g/l) entsprechende Agar-Platten zur selektiven Anzucht der Bakterien gegossen, nachdem zuvor dem autoklavierten LB-Medium bei einer Temperatur von 55°C das jeweilige Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) zugesetzt worden war.

2.1.2.2 Langzeitlagerung der Bakterien

Zur Herstellung von Stammkulturen wurde die Kultur für 16 h bei 37°C im Wasserbad (Schüttelfrequenz 250 rpm) inkubiert. Anschließend wurde sie mit 15% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.2 Verwendete Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Lumineszenzmessung pGL3-Basic, pGL3-Control und pRL-TK verwendet (Abbildungen 1-3)

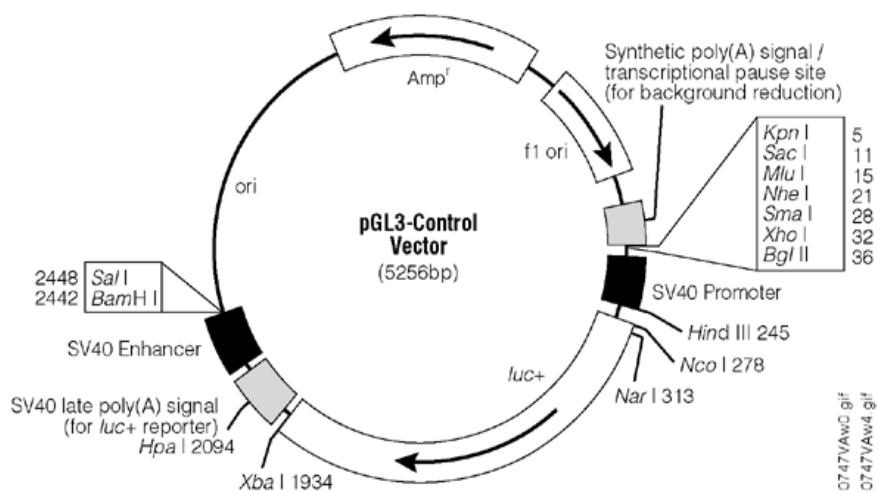


Abbildung 1: pGL3-Control-Vektor (Quelle: Promega)

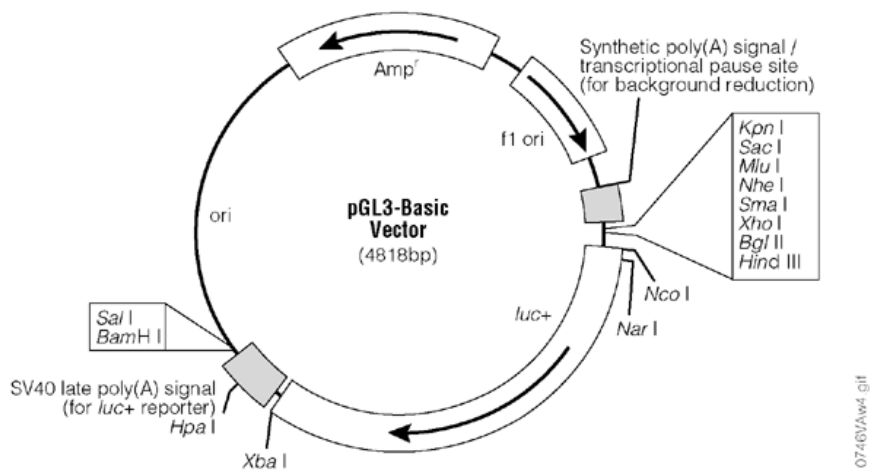


Abbildung 2: pGL3-Basic-Vektor (Quelle: Promega)

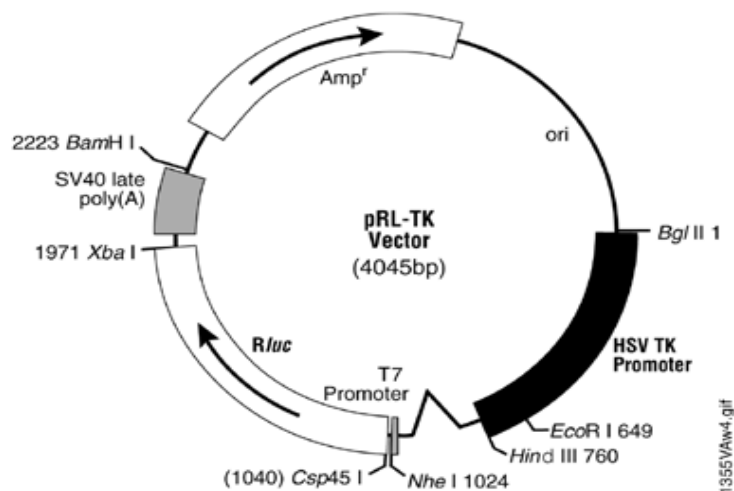


Abbildung 3: pRL-TK-Vektor (Quelle: Promega)

2.3 Verwendete Tumorproben (genomische DNA)

Die in dieser Arbeit als Template für die PCR (vgl. 2.5.7) verwendete genomische DNA (gDNA) stammt von Patienten, die in den Jahren 1995 und 1996 an einem kolorektalen Karzinom in der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck operiert worden sind. Es wurden folgende, für diese Arbeit relevanten Daten über oben genannte Patienten anonymisiert, entsprechend den Richtlinien des Datenschutzes, in der Tumorbank der Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck, gespeichert: Geburtsjahr, Geschlecht, UICC-Stadium (Sobin und Wittekind 1997), Grading, Gesamtüberlebenszeit (vgl. 8.8). Die genomische DNA wurde jeweils aus Tumorgewebe, das in flüssigem Stickstoff eingeforen wurde, gewonnen. Die aufbereiteten gDNA-Proben wurden mir freundlicherweise von Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Duchrow zur Verfügung gestellt.

2.4 Zellen und Zelllinien

2.4.1 Verwendete Zelllinie

Als Zelllinie wurde HeLa S3 (humane Zervix-Karzinom-Zelllinie) verwendet. Sie wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, bezogen.

2.4.2 Kultivierung von Zelllinien

2.4.2.1 Kulturbedingungen und Anzucht

Die HeLa-Zellen wurden adhärent als „Monolayer“ im supplementierten Dulbeccos Eagle Medium (Fa. Gibco BRL/Life Technologies, Eggenstein) [Zusätze vgl. 8.1.1] bei 37°C und 5% Kohlendioxid kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70%-80% erfolgte ein Umsetzen mit konsekutivem Ausdünnen der Zellen. Hierzu wurden die Zellen in Trypsin-Lösung (Trypsin Sol. 0,25%, Fa. Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) über 10 min bei 37°C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden mittels Zentrifugation mit PBS (Fa. Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) gewaschen. Nach dem Resuspendieren in Nährmedium wurden sie (ca. 1:10) verdünnt ausgesät. Die Kultivierung der HeLa S3-Zellen erfolgt in Kulturflaschen der Fa. Nunc, Wiesbaden.

2.4.2.2 Zellzahlbestimmungen (Neubauerzählkammer)

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels der Neubauerzählkammer (Fa. Brand, Ludwigshafen). Hierzu wurden 10 µl der in PBS suspendierten Zellen mit 90 µl Trypsin-Blau-Lösung gemischt und 10 µl in die Zählkammer gegeben. Da Trypsin-Blau nur durch defekte Membranen in die Zellen eindringt, färben sich demzufolge nur avitale Zellen, während vitale Zellen unter dem Mikroskop farblos erscheinen. Es wurden 4 Felder (à 16 Planquadraten) lichtmikroskopisch ausgezählt. Anhand des arithmetischen Mittelwertes m , welcher aus der Anzahl der vitalen Zellen in den vier Feldern gebildet worden war, wurde die absolute Zellzahl a der gesamten Suspension ermittelt:

$$a = m \cdot v \cdot 10^5 \text{ Z/ml}$$

mit a = absolute Zellzahl

m = arithmet. Mittelwert der Zellen pro Feld

v = Volumen der (gesamten) Zellsuspension

2.4.2.3 Langzeitlagerung von Zelllinien

Hierzu wurden $3 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter mit Einfriermedium (vgl. 8.1.1) versetzt und in 2ml-Cryo-Röhrchen (Fa. Greiner, Frickenhausen) aliquotiert. Diese wurden zunächst in Zellstoff gewickelt und für 24 h bei -80°C eingefroren. Die endgültige Lagerung erfolgt dann bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung von Vektor-DNA

Der pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]-Vektor wurde von Invitrogen, Groningen, Niederlande, und die pGL3- und pRL-Vektoren wurden von Promega, Mannheim hergestellt und gereinigt. Die Amplifikation der Vektor-DNA erfolgte mit der Maxi-Prep (vgl. 2.5.11). Um Vektoren in Ligationsansätzen (vgl. 2.5.12.3) einsetzen zu können, wurden diese zunächst mit Restriktionsendonukleasen geschnitten (vgl. 2.5.3) und zusätzlich dephosphoryliert (vgl. 2.5.4).

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen wurden photometrisch mit Hilfe der Gleichung nach Warburg und Christian („Warburg-Christian-Concentration“) bestimmt. Es wurde über 50 s die Extinktion der 1:100 verdünnten Probe bei $\kappa = 260 \text{ nm}$ und 280 nm gemessen. Die Konzentration c [$\mu\text{g/ml}$] wurde mit folgenden Formeln errechnet:

$$c_{\text{Protein}} = 1552 \cdot A_{280 \text{ nm}} - 757,29 \cdot A_{260 \text{ nm}}$$

$$c_{\text{Nukleinsäure}} = -36,0 \cdot A_{280 \text{ nm}} + 62,9 \cdot A_{260 \text{ nm}}$$

mit $A_{260 \text{ nm}}$: Absorption bei $\kappa = 260 \text{ nm}$

$A_{280 \text{ nm}}$: Absorption bei $\kappa = 280 \text{ nm}$

Als Reinheitskriterium der Probe sollte der Quotient $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ für DNA möglichst 1,8 betragen.

2.5.3 Restriktionsverdau des Vektors

Der Verdau von 50 μg pGL3-Basic-Vektor erfolgte mit 200 U *Hind* III (10.000 U/ml). Es wurde folgender Ansatz zugrunde gelegt:

50 μg pGL3-Basic

20 μl *Hind* III

20 μl One-Phor-All-Puffer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

ad 200 μl steriles aqua bidest.

Nach einer Inkubationszeit von 5 h bei 37°C wurde mit Ethanol gefällt:

- ad 200 µl Ansatz
- 30 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2)
- 460 µl Ethanol absolut

Anschließend wurde über 30 min bei –80°C inkubiert und mit 16.000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl sterilem aqua bidest. resuspendiert und mit Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) inkubiert.

2.5.4 Dephosphorylierung von restriktionsverdauten Vektoren

Die Dephosphorylierung wurde mit alkalischer Phosphatase (CIAP) der Fa. Boehringer Mannheim durchgeführt. Hierfür wurde folgender Ansatz gewählt:

- 10 µl restriktionsverdauter pGL3-Vektor (15 pmol / 50 µg)
 - 15 µl Phosphatase (1 U Phosphatase / 1 pmol DNA; c = 1 U/µl)
 - 20 µl 10x Dephosphorylierungspuffer ($1/_{10}$ Gesamtvolumen)
- ad 200 µl steriles aqua bidest.

Nach Inkubation von 1h bei 37°C wurde 8 µl 0,5 M EDTA ($1/_{10}$ von 200 mM) hinzugegeben und die Phosphatase durch 65°C über 10 min inaktiviert. Der Ansatz wurde mit 1:1 angesetztem Phenol-Chloroform extrahiert. Im folgenden wurde der Vektor mit Chloroform gewaschen und danach erneut mit 100%-igem Ethanol gefällt (vgl. 2.5.3). Die Konzentration wurde photometrisch ermittelt (vgl. 2.5.2).

2.5.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren (DNA)

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA erfolgte in Horizontalelektrophoresekammern (Fa. Fröbel, Wasserburg am Bodensee). Hierzu wurden 1%ige Agarosegele mit Ethidiumbromid als intercalierender Fluoreszenzfarbstoff (c = 1 µg/ml) sowie TAE-Puffer als Laufpuffer verwendet. Die Proben wurden mit Schwerer Lösung (vgl. 8.1.2) im Verhältnis 9:1 gemischt und in die Geltaschen aufgetragen. Es wurde ein DNA-Molekulargewichtsstandard (Nr. VI der Fa. Boehringer Mannheim) mit 0,25 µg pro Geltasche verwendet. Die Auftrennung erfolgte spannungskonstant bei 80 V. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Transluminator bei 312 nm fotografiert und digitalisiert.

2.5.6 Herstellung von Oligodesoxynucleotiden (Primern)

Die verwendeten Primer wurden von BioSource Europe S.A., Nivelles, Belgien, hergestellt und geliefert (vgl. Tabelle 3).

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>
PIP 127	5'-AAT-CTT-CTG-GCA-ATG-AGT-AAT-G-3'
PIP 74R	5'-GAA-GGC-CAG-AAG-CAA-ATT-TAC-3'
DanPri	5'-GGA-GAA-GCA-CCA-AGG-AAA-AGT-3'
PIP 127 <i>Hind</i>	5'-TAT-AAA-GCT-TAA-TCT-TCT-GGC-AAT-GAG-TAA-TG-3'
PIP 74R <i>Hind</i>	5'-TAT-AAA-GCT-TGA-AGG-CCA-GAA-GCA-AAT-TTA-C-3'
DanPri <i>Hind</i>	5'-TAT-AAA-GCT-TGG-AGA-AGC-ACC-AAG-GAA-AAG-T-3'

Tabelle 3: verwendete Primer: Sequenz für die *Hind* III-Schnittstelle: AAGCTT
Bei der Namensgebung der verwendeten Primer wurde die laborinterne Nomenklatur übernommen.

2.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation doppelsträngiger DNA. Sie wurde mit der *Pfu*-DNA-Polymerase von der Fa. Promega, Mannheim, durchgeführt. Als Template wurde gDNA aus Tumoren der Tumorbank von Patienten mit kolorektalen Karzinomen verwendet, die in der Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck, in den Jahren 1995 und 1996 operiert wurden (vgl. 2.3 und 8.8). Die gDNA-Proben wurden mir freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Duchrow zur Verfügung gestellt. Zwecks nachfolgendem Restriktionsverdau der DNA-Fragmente (vgl. 2.5.12.1) mußten die Primer eine zusätzliche *Hind* III-Schnittstelle aufweisen. Da die Amplifikation der DNA-Fragmente mit den *Hind* III-Primern nicht direkt aus der genomischen DNA gelang, wurde zunächst eine PCR I mit den entsprechenden Primern ohne *Hind* III-Schnittstelle durchgeführt und im Anschluß eine Sub-PCR (PCR II) mit den *Hind* III-Primern und mit vorgenanntem PCR-Produkt als Template. Hierbei wurden folgende Primerkombinationen gewählt: a) PIP 127 / PIP 74R; b) PIP 127 / DanPri bzw. entsprechende Kombination der Primer mit *Hind* III-Schnittstelle. Die PCR-Programme wurden folgendermaßen gewählt:

PCR I:

	initiale Denaturierung:	2 min / 95°C
10 Zyklen	Denaturierung :	2 min / 95°C
	Annealingphase/Bindungsphase der Primer :	1,5 min / 55°C-0,5°C
	Extension :	5 min / 72°C
35 Zyklen	Denaturierung :	2 min / 95°C
	Annealingphase/Bindungsphase der Primer :	1,5 min / 51°C
	Extension :	5 min / 72°C
	terminale Extension:	5 min / 72°C

PCR II (Sub-PCR):

	initiale Denaturierung:	2 min / 95°C
35 Zyklen	Denaturierung:	2 min / 95°C
	Annealingphase/Bindungsphase der Primer:	2 min / 52°C
	Extension:	3 min / 72°C
	terminale Extension:	7 min / 72°C

Es wurde nachfolgender Ansatz zu Grunde gelegt:

- 1,25 U *Pfu*-DNA-Polymerase
- 5 µl *Pfu*-DNA-Polymerase 10x Puffer
- 1 µl Template
- je 1,3 µl Primer (sense und antisense)
- 2,5 µl dNTP (je 20 mM; Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- ad 50 µl aqua bidest.

Als Positiv-Kontrolle wurde cDNA aus HeLa-S3 Zellen (HeLa-RT) als Template und β_2 -Mikroglobulin-Sense sowie β_2 -Mikroglobulin-Antisense als Primer entsprechend den oben genannten Mengenangaben verwendet. Die Negativ-Kontrolle enthielt kein Template.

2.5.8 Ligation und Transformation der isolierten DNA in TOPO-Vektoren (TOPO-Cloning)

Die Ligation der frisch amplifizierte DNA-Fragmente (2.5.7) in TOPO-Vektoren („blunt-end“ geschnittene und mit Topoisomerase gekoppelte Plasmide) wurde als TOPO-Cloning mit dem Zero® Blunt TOPO® Cloning Kit (Version E, Fa. Invitrogen, Groningen, Niederlande) durchgeführt. Da die DNA-Fragmente nicht wesentlich größer als 1 kb sind, wurde auf eine Reinigung verzichtet. Hierbei wurde gemäß Hersteller der Ligationsansatz wie folgt gewählt:

1 µl DNA-Fragment (PCR)
1 µl pCR-Blunt II-TOPO-Vektor
1 µl Salt Solution
ad 5 µl steriles aqua bidest.

Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 22-23°C wurde der Ansatz auf Eis gekühlt. Bei der anschließenden Transformation wurden 2 µl TOPO-Cloning-Ansatz (TOPO-Plasmide) zu den aliquotiert gelieferten TOP10-*E. coli* gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min auf Eis und dann eine Inaktivierung bei 42°C für 30 s. Nach sofortiger Inkubation auf Eis für ca. 2 min wurde bei Raumtemperatur 250 µl SOC-Medium (S.O.C Medium ultra pure, Fa. Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) hinzugegeben und für 1 h bei 37°C und 400 rpm inkubiert. Ein Ansatz wurde auf zwei vorgewärmten LB/Kanamycin-Platten zu je 50 µl ausplattiert. Die Bebrütung der LB/Kanamycin-Platten erfolgte ü.N. bei 37°C. Nach Überimpfung wurde erneut ü.N. bei 37°C inkubiert.

2.5.9 Sektorenausstrich und Mini-Prep / Purifikation von Plasmid-DNA

Von den so gewonnenen Klonen wurde eine Mini-Prep mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit (Fa. Machery-Nagel, Düren) angefertigt.

Prinzip:

Durch Bindung der Plasmid-DNA an die Kieselgel-Membran der NucleoSpin-Säule wird eine Reinigung der Plasmid-DNA von Zelldebris und anderem ermöglicht.

Durchführung:

Als Ansatz wurde 5 ml LB-Medium, 10 µl Kanamycin und eine einzelne, mittelgroße Kolonie der transformierten TOP10-*E. coli* gewählt. Dieser wurde für 16 h (ü.N.) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min mit 4500 U/min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl A1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl A2-Puffer zur Zellyse wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 300 µl A3-Puffer als Bindungspuffer hinzugegeben wurde. Anschließend wurde für 5 min auf Eis inkubiert und für 12 min mit 12.300 U/min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine NucleoSpin-Säule aufgetragen und für 1 min mit 17.000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Nachdem der Durchfluß verworfen und 700 µl A4-Puffer als Waschpuffer auf die NucleoSpin-Säule aufgetragen worden sind, wurde erneut mit 17.000 U/min bei 4°C für 1 min zentrifugiert. Damit das Ethanol, welches im Puffer A4 enthalten ist, komplett ausgewaschen wird, wurde die letzte Zentrifugation wiederholt. Mit 50 µl AE-Puffer wurde die Plasmid-DNA aus der NucleoSpin-Säule eluiert.

Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung (vgl. 2.5.2) und gelelektrophoretischer Auftrennung (vgl. 2.5.5) wurden die Plasmide zur Identifizierung von erfolgreich klonierten Plasmiden sequenziert.

2.5.10 DNA-Sequenzierung der TOPO-Plasmide

2.5.10.1 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde routinemäßig von Fr. Regina Kaatz, MTA im Chirurgischen Forschungslabor, Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck, durchgeführt. Hierzu wurde das Thermosequenase-Kit RPN 2438 der Firma Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden) nach Vorgabe des Herstellers verwendet. Für die Sequenzierung der TOPO-Plasmide wurde M13 Reverse als Primer benutzt. Die Sequenzierung wurde nach der enzymatischen, nichtradioaktiven Basenterminationsmethode von Sanger (Sanger und Coulson 1975) ausgeführt. Zum Auffinden von Klonen, die sowohl das erwünschte Insert als auch jeweils zwei *Hind* III-Schnittstellen aufweisen, genügte die Sequenzierung M13 Reverse als Primer (Sequenz vgl. 8.2), denn der TOPO-Vektor besitzt vor der Umklonierungsstelle bereits eine *Hind* III-Schnittstelle, so daß das Insert nur eine zusätzliche Schnittstelle stromabwärts - hinter der Umklonierungsstelle - aufzuweisen braucht.

Durchführung:

Bei der Cycle-Sequenzierung werden die verschieden langen DNA-Stränge mittels PCR gewonnen. Anschließend werden sie in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. Für die PCR wurde 1 µg DNA-Probe eingesetzt. Nach Zugabe von je 2 pmol fluoreszenzmarkierten Primern, 0,5 µl DMSO wurde ad 13 µl mit aqua bidest. aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde zu gleichen Teilen auf die Cups mit den vorgelegten Didesoxyribonucleosidtriphosphaten (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) und dNTP aufgeteilt und mit 20 µl „Chill-out Liquid Wax“ überschichtet. Die PCR wurde mit folgendem Zyklenaufbau durchgeführt: 1 min 45 s bei 95°C, 12 Zyklen mit jeweils 15 s bei 95°C, bei 50°C und 70°C, 13 Zyklen mit jeweils 20 s bei 95°C, bei 50°C und bei 70°C, 40 s bei 95°C. Es wurde anschließend 3 µl Stop-Lösung hinzugegeben und auf Eis gekühlt.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden Polyacrylamidgele (Gelmatrix: RapidGel XL sol 40%) folgender Zusammensetzung verwendet:

6,5 ml Long Ranger Lösung (Fa. BMA, Rockland, USA)
21 g Harnstoff
5 ml 10x TBE-Puffer
30 ml Aqua bidest.
500 µl DMSO
350 µl 10% APS
50 µl TEMED

Mittels einer 50ml-Spritze wurde die Mischung durch einen 0,2 µm Membran-Filter zwischen zwei Glasplatten (Abstand 0,25 mm) gebracht und eventuell vorhandene Luftblasen per Drahtschlinge entfernt. Nachdem das Gel über 2 h ausgehärtet war, wurde es in das Sequenziergerät (vgl. 8.3.2) eingebaut und jeweils oben und unten mit der Pufferkammer verbunden. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer benutzt. Bevor die Proben aufgetragen wurden, wurde zum Entfernen von eventuellen Verunreinigungen ein Gelvorlauf über 30 min durchgeführt sowie der Laser und der Detektor kalibriert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 50°C, 37 mA, 1500 V und 50 W über ca. 12 h. Die Auswertung wurde automatisch (Programm: Fa. LI-COR, Lincoln, USA) durchgeführt. Gegebenenfalls wurde die Spaltenbreite der einzelnen Banden manuell geändert.

2.5.10.2 Sequenzvergleich

Die so ermittelte Basensequenz wurde mit der *pKi-67* Sequenz der EMBL-Datenbank, Heidelberg (Accession-Nr. X94762), verglichen. Hierzu wurde der BLAST-Algorithmus als Plugin vom Programm BioEdit 4 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) verwendet.

2.5.11 Maxi-Prep / Purifikation von Plasmid-DNA

Die Maxi-Prep wurde mit dem Plasmid Purification Kit der Fa. Qiagen, Hilden, als Anionenaustauschchromatographie durchgeführt.

Die Qiagen-Säulen enthalten ein Anionenaustauschharz, das aus Kieselerde-Körnern mit hydrophiler Oberflächenummantelung besteht. Dieses Harz besitzt positiv geladene DEAE-Gruppen, die mit den negativ geladenen Phosphaten des DNA-Gerüsts interferieren. Die Plasmid-DNA wird abhängig von der Salzkonzentration an DEAE-Gruppen gebunden und so von anderen zellulären Bestandteilen (RNA, Proteine etc.) gereinigt (Qiagen Plasmid Purification Handbook 09/2000).

Durchführung:

Die Klone wurden über 22 Stunden in LB-Medium (200 ml) mit Kanamycin ($c = 0,05 \text{ mg/ml}$) als Antibiotikum für TOPO-Plasmide bzw. mit Ampicillin ($c = 0,1 \text{ mg/ml}$) für pGL3-Plasmide im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Schüttelfrequenz lag bei 250 rpm. Die Zellen der Ansätze wurden über 15 min bei 4500 U/min sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml P1-Puffer resuspendiert und anschließend mit 10 ml P2-Puffer lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde 10 ml P3-Puffer (4°C) als Bindungspuffer hinzugegeben. Die Zentrifugation über 45 min bei 4500 U/min erfolgte nach 20 minütiger Inkubation auf Eis. Bevor der Überstand auf Chromatographie-Säulen (Qiagen-tip 500) aufgetragen wurde, ist diese mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert worden. Anschließend wurde das in der Säulenmembran an Kieselgel gebundene Plasmid mit 60 ml QC-Puffer gewaschen. Mittels 15 ml QF-Puffer, der auf ca. 50°C erwärmt wurde, wurde das Plasmid eluiert. Das Eluat wurde mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol (2-Propanol) versetzt und mit 4500 U/min für 45 min zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 5 ml 70% unvergälltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (30 min bei 4500 U/min). Das getrocknete Pellet wurde in 100 μl sterilem TE-Puffer resuspendiert. Die Konzentration wurde photometrisch ermittelt und das Plasmid bei -20°C gelagert.

2.5.12 Umklonierungstechniken

2.5.12.1 Restriktionsverdau von TOPO-Plasmiden

Als Restriktionsendonuklease wurde *Hind* III von der Fa. Roche, Mannheim, gewählt. Es wurden 20 µg DNA mit 200 Einheiten *Hind* III unter Zugabe von 40 µl SuRE/Cut Puffer B in 200 µl Gesamtvolumen angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über 5 Stunden. Es folgte eine Hitzeinaktivierung bei 65°C über 15 min. Anschließend wurde die verdaute DNA bei -20°C gelagert.

2.5.12.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen (präp. Gel)

Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem Prep-A-Gene DNA Purification Kit (Fa. Bio-Rad, München).

Für die aus dem Agarosegel ausgeschnittenen Bande wird nach Abschätzen des Gelvolumens (1 mg \cong 1 µl) die entsprechende Menge Prep-A-Gene-Matrix mit 1 µl Matrix / 0,2 µg DNA als Matrixvolumen ermittelt. Das Gesamtvolumen entspricht der Summe aus dem Gel- und Matrixvolumen. Es wurde die dreifache Menge des Gesamtvolumens an Prep-A-Gene-Bindungspuffer hinzugefügt und für 5 min bei 50°C mit 1400 rpm in einem Thermomixer inkubiert. Nach Zugabe der zuvor ermittelten Menge an Prep-A-Gene-Matrix wurde für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde 30 s lang an zentrifugiert und das Sediment mit gebrauchsfertigem Waschpuffer (25x des Volumens an Prep-A-Gene-Matrix) zweimal gewaschen. Der Waschpuffer wurde unmittelbar vorher 1:1 mit unvergälltem, absolutem Ethanol angesetzt. Anschließend wurde an zentrifugiert und das Sediment in 20-50 µl Prep-A-Gene Eluationspuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei 50°C wurde erneut mit 1.000 rpm an zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert.

2.5.12.3 Ligation von DNA-Fragmenten in pGL3-Basic-Vektoren

Nach Reinigung und Aufbereitung der DNA-Fragmente sowie Inkubation mit Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP; Boehringer Mannheim) der pGL3-Basic-Vektoren wurde mit T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim) ligiert. Folgender Ligationsansatz wurde zugrunde gelegt:

50 ng DNA-Fragment/DNA-Insert
100 ng pGL3-Basic-Vektor
1 µl 10x-Ligationspuffer
0,5 µl T4-DNA-Ligase
ad 10 µl aqua bidest

Hierbei wurde die T4-DNA-Ligase unmittelbar vor der Inkubation, d.h. als letztes hinzugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C wurde bei 4°C über 2 h nachinkubiert. Alternativ wurde über 16 h im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Die Anfangstemperatur lag hier bei 14°C. Die Langzeitlagerung des Ligationsproduktes, des klonierten Vektors, erfolgte bei -20°C.

2.5.12.4 Herstellung kompetenter Zellen (*E. coli*)

Es wurde am Vortag eine Vorkultur von 10 ml YT-Medium (vgl. 8.1.1) mit *E. coli* DH5α angeimpft und ü.N. bei 37°C und 170 rpm inkubiert. Nach Animpfen der Hauptkultur (100 ml) wurde bis zu einer $OD_{550} = 0,3$ weiter bei 37°C und 170 rpm inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (5 min / 2400 U_{\min} / 4°C), das Pellet kurz getrocknet und die Zellen in 15 ml TfbI (vgl. 8.1.2) pro 50 ml Kultur aufgenommen. Die gevortexte Suspension wurde für 8 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden erneut mit 2400 U_{\min} bei 4°C für 5 min zentrifugiert, bevor sie in 4 ml TfbII (vgl. 8.1.2) pro 100 ml Kultur aufgenommen wurden. Nach vorsichtigem Schütteln wurden sie 20 min im Eiswasser geschwenkt. Die Suspension wurde aliquotiert und in vorgekühlten Schraubdeckelgefäßen bei -80°C eingefroren. Die so hergestellten kompetenten *E. coli* DH5α wurden mir freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Duchrow zur Verfügung gestellt.

2.5.12.5 Transformation in *E. coli*

Zu 50 µl kompetenter *E. coli*-Bakterien (DH5α) wurden 0,5 µl ligierte Plasmide zugegeben und über 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz für 90-100 s bei 42°C erwärmt. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 2 min und Zugabe von 450 µl SOC-Medium (S.O.C Medium ultra pure, Fa. Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) erfolgte wiederum eine Inkubation von 1 h bei 37°C und 400 rpm. Die transformierten *E. coli* wurden auf vorgewärmten LB/amp-Platten ausplattiert. Die Platten wurden ü.N. bei 37°C bebrütet.

2.5.12.6 Überprüfung der Transformation

Das Screening hinsichtlich der sense-Orientierung des Inserts im Vektor erfolgte durch eine Mini-Prep (vgl. 2.5.9).

Mittels eines Agarosegels wurden die Insert-tragenden Klone ermittelt. Als Standard diente ein pGL3-Basic-Vektor ohne Insert. Die selektierten Klone wurden nachfolgend sequenziert. Die Sequenzierung der pGL3-Klone erfolgte mit RV3 und GL2 als Primer (vgl. 2.5.10.1). Verglichen wurde die gefundene Basensequenz mit der *pKi-67* Sequenz der EMBL-Datenbank (vgl. 2.5.10.2). Es wurden pro Klon jeweils ein Sense- und ein Antisense-Subklon ausgewählt, wobei der Sense-Subklon das Insert gemäß dem Leseraster (d.h. stromabwärts) enthält, während im Antisense-Subklon das Insert entgegen dem Leseraster (d.h. stromaufwärts) eingebaut ist (vgl. auch 2.5.10).

2.5.13 Transfektion von Vektor-DNA in humane Zellen

2.5.13.1 Aufbereitung der Plasmide für die Transfektion

Die gefundenen Plasmide wurden per Maxi-Prep (vgl. 2.5.11) angereichert und anschließend gefällt. Hierbei wurden 50 µg Plasmid mit 15% Natriumacetat (3 M; pH 5,2) und 2 Vol absolutem Ethanol versetzt und für 30 min bei -80°C inkubiert (bzw. alternativ ü.N. bei -20°C). Nach Zentrifugation mit 16.000 g wurde das Pellet in TE-Puffer resuspendiert. Die photometrisch bestimmte Konzentration sollte möglichst 2,5 µg/µl betragen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.5.13.2 Transiente Transfektion mittels Elektroporation

Die transiente Transfektion erfolgte mit HeLa S3-Zellen, welche wie unter 2.4.2.1 beschrieben kultiviert wurden. Als Vorbereitung zur Transfektion wurden diese Zellen trypsiniert und zweimal mit PBS gewaschen. Zur Transfektion wurden 5 µg Plasmid ($c = 2,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) sowie 250 µl Zellsuspension verwendet, welche zuvor aus HeLa-Zellen und Medium auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml Medium eingestellt worden ist.

Die Elektroporation erfolgt in 4 mm-Küvetten (Fa. Bio-Rad, München) bei einer Spannung von 260 V und einer elektrischen Kapazität von 950 µF. Anschließend wurden die Ansätze in 5 ml Medium für 48 h bei 37°C inkubiert (Porationsgerät der Fa. Bio-Rad, München).

2.5.13.3 Cotransfektion

Ziel der Cotransfektion ist es, einen internen Maßstab zur Beurteilung der Quantität der Transfektion des experimentellen Vektors zu erhalten. Hierzu diente das Plasmid pGL3-TK, welches mit einer Verdünnung von 1:20 dem Elektroporationsansatz ($\cong 0,25 \mu\text{g}$ Plasmid pro Ansatz) hinzugegeben wurde.

2.5.14 Dual-Luciferase Reporter Assay (DLR Assay)

Das Dual-Luciferase Reporter Assay-Kit wurde von der Fa. Promega, Mannheim, bezogen.

Prinzip:

Im Vergleich mit dem „Dual Luminescence-Based Gene Assay“, bei dem der Kontrollvektor für β -Galaktosidase (Chemilumineszenz) kodiert, liegt der Vorteil des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems in der simultanen Biolumineszenzmessung von Probe und Standard.

Prinzip des Dual-Luciferase Reporter Assays ist es, durch Transfektion von zwei Luciferasevektoren die experimentelle Genauigkeit zu optimieren. Somit werden Variabilitäten zwischen den Ansätzen (Vitalität der Zellen etc.) und der variierenden Elektroporationseffizienz relativiert und normalisiert.

Es werden die Firefly-Luciferase (*Photinus pyralis*) als experimenteller Vektor und die Renilla-Luciferase (*Renilla reniformis*) als interner Kontrollvektor verwendet. Bedingt durch ihren unterschiedlichen evolutionären Ursprung weisen sie verschiedene Enzymstrukturen und Substratanforderungen auf. Dadurch ist es möglich, die jeweilige Enzymreaktion selektiv zu starten bzw. zu stoppen und die Biolumineszenz zu messen (Dual-Luciferase

Reporter™ Assay System Technical Manual; Promega S.2 ff). Beide Luciferasevektoren bedürfen keiner posttranslationalen Modifizierung.

Die in jeder Zellsuspension vorhandene Autolumineszenz wird durch das Ernten der Zellen mittels der passiven Zellyse (PLB-Methode; vgl. 2.5.14.1.1) minimiert.

Gemäß dem Hersteller Promega, Mannheim, wird mit einer Verzögerung von 2 s jeweils über 10 s die Photonenemission gemessen.

2.5.14.1 Zellernte und Meßvorgang

2.5.14.1.1 Passive Zellyse

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Nach vollständiger Entfernung des PBS-Puffers wurden sie mit PLB (Passive Lysis Buffer) komplett bedeckt. Für 20 min wurden sie mit 150 rpm geschüttelt. Das Zellysate wurde in ein Schraubdeckelgefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt und auf Eis gekühlt.

2.5.14.1.2 Vorbereitung und Meßvorgang

'Luciferase Assay Reagenz II' (LAR II) wurde durch Resuspendieren des Luciferase Assay Substrates in 10 ml Luciferase Assay Puffer II angesetzt und gemäß Herstellerangaben aliquotiert. Die Langzeitlagerung (bis zu einem Jahr) erfolgte bei -80°C . Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurde es durch Invertieren gemischt.

Das 'Stop & Glo™ Reagenz' wurde frisch mit 1 Volumenanteil '50x S&G Reagenz' (Lagerung bei -80°C) und 50 Volumenanteilen 'S&G Puffer' (Lagerung bei -20°C) in lichtgeschützten Luminometerröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) angesetzt. Es wurde bis zu 6 h bei Raumtemperatur gelagert.

Die Luciferasemessungen erfolgten halbautomatisch. 100 µl LAR II wurden in Luminometerröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) vorgelegt und mit 20 µl Probenansatz (PLB-Lysat) per Pipette gemischt. Im Luminometer (Lumat LB 9507, Fa. EG&G Berthold, Bad Wildbad) erfolgte sofort die erste Messung (Firefly). Über den Autoinjektor des Luminometers wurde 100 µl Stop & Glo™ Reagenz unter Lichtschutz injiziert und die zweite Messung (Renilla) gestartet. Pro Experimentalansatz wurden mindestens zwei Messungen durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

Zur Bestimmung der Aktivität von Fragmenten des mutmaßlichen *pKi-67* Promotors wurden diese mittels PCR amplifiziert und in Reportergenplasmide kloniert. Pro Typ des Promotors (vgl. Einleitung, S. 7; Tabelle 1) wurden zwei verschieden lange Fragmente untersucht: 127/74 und 127/DanPri - benannt nach den verwendeten Primern PIP 127, PIP 74 bzw. DanPri (vgl. 2.5.6) jeweils in sense- und antisense-Orientierung. Die in antisense-Orientierung klonierten Fragmente sollten keine Promotoraktivität aufweisen und dienten der Kontrolle der Ergebnisse. Nach Aufbereitung der Plasmide wurden HeLa-Zellansätze jeweils mit einem Reportergenplasmid (sense- oder antisense-Orientierung) zusammen mit einem internen Kontrollplasmid (pRL-TK) cotransfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation im CO₂-Brutschrank wurden die Zellen geerntet. Die Aktivität der Reporterplasmide mit den Promotorfragmenten wurde mittels DLR-Assay (vgl. 2.5.14) bestimmt.

Das Fragment 127/74 umfaßt 1033 Basenpaare bei drei Repetitionen in Position -186 und reicht von Position -555 bis Position +479 (bzgl. Transkriptionsstart). Es umfaßt somit das erste Exon (+1/+106) und das erste Intron (+107/+448) sowie das zweite Exon zu Teilen (ab +449), ferner den basalen Promotor (-30/+10 bzgl. Transkriptionsstart). Das Fragment 127/DanPri mißt 1308 bp. Es erstreckt sich von Position -555 bis Position +754. In ihm liegen Exon 1, Intron 1, Exon 2 (+449/+629) und Intron 2 teilweise (ab +630) sowie ebenfalls der basale Promotor (Positionsangaben jeweils bezüglich Transkriptionsstart).

3.1 Herstellung der verschiedenen Inserts

Zur Amplifikation der Promorteilstücke der DNA-Extrakte wurde zunächst eine „Touch-Down-PCR“ mit 45 Zyklen durchgeführt (vgl. 2.5.7). Die verwendeten Primer sind in Kapitel 2.5.6 aufgeführt. Als Template wurde gDNA aus der Tumorbank von Patienten mit kolorektalen Karzinomen verwendet, die in der Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck, in den Jahren 1995 und 1996 operiert wurden (vgl. 8.8). Die gDNA-Proben wurden mir freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Duchrow zur Verfügung gestellt. Anschließend wurde eine Sub-PCR angeschlossen, bei der Primer verwendet wurden, die jeweils eine zusätzliche

Hind III-Schnittstelle aufwiesen (vgl. 2.5.7). Dies war für das Umklonieren in Reporterengenvektoren notwendig. Als Template wurde 1 µl Substrat der vorangegangenen, entsprechenden PCR genommen. Eine normale PCR (ohne Sub-PCR) mit direkter Zugabe von *Hind* III-Primern erwies sich im Rahmen von Vorversuchen als ungeeignet. Der *Hind* III-Überhang der Primer stellte vermutlich ein zu großes Hybridisierungshindernis dar, so daß im Agarosegel die PCR-Produkte nur sehr schwach bis gar nicht nachweisbar waren. Zudem waren die photometrisch ermittelten Konzentrationen für die sich anschließende Ligation zu gering. Als DNA-Polymerase wurde die *Pfu*-Polymerase, welche der *Taq*-Polymerase aufgrund ihrer Korrekturlesefähigkeit vorgezogen wurde, verwendet. Schließlich wurde eine fehlerfreie Übereinstimmung zwischen den Inserts und der *pKi-67* Sequenz der EMBL-Datenbank benötigt, da sich die untersuchten Haplotypen größtenteils lediglich in Punktmutationen unterscheiden (vgl. 2.5.10.2 und S. 7, Tabelle 1).

3.2 Konstruktion der Reportergenplasmide

Zunächst wurde für das Klonieren der *pKi-67* Promotorteilstücke pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]-Vektoren gewählt, da diese wesentlich leichter das Insert aufnehmen (vgl. 2.5.8). Versuche mit direktem Klonieren in den „Zielvektor“ pGL3-Basic wiesen bei der Überprüfung durch Sequenzierung ungleich mehr Fehler (bis zum Fehlen ganzer Abschnitte) auf. Ebenso war die Effizienz der Ligation deutlich geringer (ca. 30-40% der Topo-Ligation). Die Topo-Plasmide (= Topo-Vektoren mit einkloniertem Insert) wurden in zweierlei Hinsicht überprüft: Zum einen mußte jeweils eine *Hind* III-Schnittstelle (5'-AAGCTT-3') stromauf- und stromabwärts eindeutig identifizierbar sein. Zum anderen wurde auf Fehlerfreiheit der Insert-Sequenz geachtet (vgl. 2.5.10.2). Hierfür wurden solche Klone ausgewählt, deren Homologie zur entsprechenden *pKi-67* Sequenz mindestens 90% betrug. Eine vollständige Homologie (= 100%) wurde hierbei nicht erreicht. Dies hatte ausschließlich sequenziertechnische Gründe, da die verwendeten Mini-Preps (vgl. 2.5.9) eine begrenzte Qualität und Quantität aufwiesen. Die pGL3-Basic-Vektoren wurden zunächst mit alkalischer Phosphatase behandelt, um ein Schließen des Promotors vor Aufnahme des Inserts zu verhindern (vgl. 2.5.4). Danach wurden die Inserts der selektierten Klone in den pGL3-Basic-Vektor kloniert (vgl. 2.5.12). Zur Erfolgskontrolle wurden die Proben der Klone mit einem pGL3-Basic-Vektor ohne Insert („leerer“ pGL3-Basic) zum Vergleich auf einem 1-%igen Agarosegel aufgetragen (vgl. 2.5.5 und Abbildung 4).

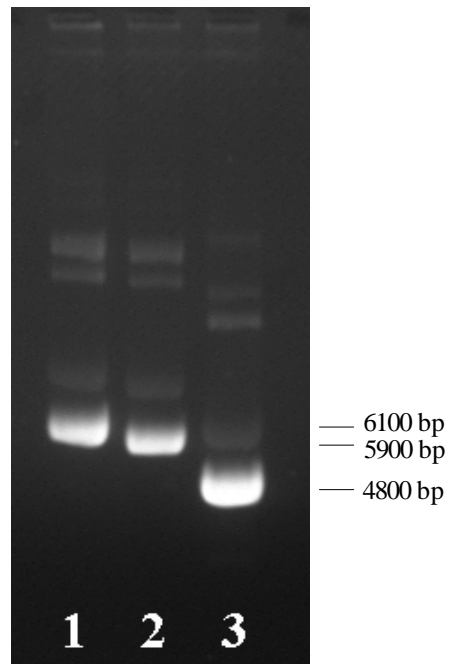


Abbildung 4: Agarose-gelelektrophorese von Plasmid-Präparaten nach Mini-Prep: 1) pGL3-Basic mit 127/DanPri-Insert; 2) pGL3-Basic mit 127/74-Insert; 3) pGL3-Basic ohne Insert

Des Weiteren wurden die in Frage kommenden Klone nach oben genannten Kriterien mittels Sequenzierung einer Maxi-Prep (vgl. 2.5.11) genau überprüft. Alle verwendeten Inserts waren mit Ausnahme der Polymorphismen (vgl. Tabelle 1 und 8.7) zu 100% mit der Genbank-Sequenz identisch. Die Reporter-genplasmide, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

<i>Name des Inserts</i>	<i>Herkunft des Inserts/ Templates</i>	<i>Primer</i>	<i>Position in pKi-67 Sequenz (EMBL-Datenbank)</i>	<i>Position bzgl. des Transkriptionsstarts</i>
137T k	137T	127/74	4695-5727	-524 bis +508
137T l		127/DanPri	4695-6002	-524 bis +783
144T k	144T	127/74	4695-5727	-524 bis +508
144T l		127/DanPri	4695-6002	-524 bis +783
145T k	145T	127/74	4695-5727	-524 bis +508
145T l		127/DanPri	4695-6002	-524 bis +783
154T k	154T	127/74	4695-5727	-524 bis +508
154T l		127/DanPri	4695-6002	-524 bis +783
158T k	158T	127/74	4695-5727	-524 bis +508
158T l		127/DanPri	4695-6002	-524 bis +783
160T k	160T	127/74	4695-5727	-524 bis +508
160T l		127/DanPri	4695-6002	-524 bis +783
Standard k	Standard	127/74	4695-5727	-524 bis +508
Standard l		127/DanPri	4695-6002	-524 bis +783

Tabelle 4: Verwendete Inserts für Reporterplasmide: k: 127/74-Insert; l: 127/DanPri-Insert; als „Standard“ diente das entsprechende Promotorfragment aus HeLa S3-Zellen. Die verwendeten Templates (gDNA) wurden der Tumorbank der Chirurgischen Klinik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck, entnommen (vgl. 3.1). Die Namensgebung entspricht der laborinternen Nomenklatur.

3.3 Einteilung der Plasmide

Auf Grundlage der Typeneinteilung nach Duchrow et al. (2002) wurde festgestellt, welcher genomischen Subgruppe die hergestellten Plasmide angehören (vgl. Tabelle 5). Die Einteilung nach Duchrow et al. (2002) basiert auf nachfolgend aufgeführten Polymorphismen an vier Genloci (vgl. Einleitung Tabelle 1; Positionsangabe bezüglich Transkriptionsstart):

Position -518: 1 \cong GA
 2 \cong GG

Position -351: 1 \cong GC
 2 \cong GT

Position -186: 1 ≅ 3 Repetitionen
 2 ≅ 5 Repetitionen

Position -49: 1 ≅ GA
 2 ≅ TA
 seltenere Varianten: GG; CA; CC; CG

Diese wurden von Duchrow et al. (2002) in vier Hauptgruppen zusammengefaßt:

T3: x21x C3: x11x
T5: x22x C5: x12x

Hierbei stehen die Buchstaben „T“ für die Base Thymin und „C“ für Cytosin in Position -351, während die Ziffern „3“ und „5“ die Anzahl der Repetitionen in Position -186 angeben. Das „X“ an erster und vierter Position (d.h. Position -518 und -49) besagt lediglich, daß diese beiden Genloci für jene Einteilung nicht relevant waren. Der C5-Typ konnte nach Revision nicht nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Duchrow).

In Tabelle 5 wurde der nach oben erwähneter Klassifikation „erwartete“ Genom-Typ bezüglich der vier untersuchten Genloci dem durch Sequenzierung „vorgefundenem“ Genom-Typ gegenübergestellt.

<i>Nr. in Tumorbank</i>	<i>Primer</i>	<i>Fragmentlänge</i>	<i>Orientierung</i>	<i>Name</i>	<i>Erwartetes Genom</i>	<i>vor-gefundenes Genom</i>	<i>Polymorphismen</i>
137T	127/74	k	s	p56.1N6B2	$^{1/2}$ -2-1-1	1-2-1-1	AT3G
			as	p56.1N6B1		1-2-1-1	AT3G
	127/DanPri	l	s	p35.4B1		2-2-1-GG	GT3(GG)
			as	p35.4B6		2-2-1-1	GT3G
144T	127/74	k	s	p51.1XB3	$^{1/2}$ - 2 / $_1$ -1-2 d.b. 1-2-1-2 od. 2-1-1-2	1-2-1-2	AT3T
			as	p51.1XB1		1-2-1-2	AT3T
	127/DanPri	l	s	p31.1A2		2-1-1-1	GC3G
			as	p31.1A11		2-1-1-1	GC3G
145T	127/74	k	s	p52.1B1	1-2-2-1	1-2-2-1	AT5G
			as	p52.1B2		1-2-2-1	AT5G
	127/DanPri	l	s	p53.3B2		1-2-2-1	AT5G
			as	p53.3B6		1-2-2-1	AT5G
154T	127/74	k	s	p36.2B4	1-2-2-1	1-2-2-1	AT5G
			as	p36.2B11		1-2-2-1	AT5G
	127/DanPri	l	s	p50.3B6		1-2-2-1	AT5G
			as	p50.3B2		1-2-2-?	AT5?
158T	127/74	k	s	p54.1XB6	1-2-2-1	1-2-2-1	AT5G
			as	p54.1XB4		1-2-2-1	AT5G
	127/DanPri	l	s	p48II9B3		1-2-2-1	AT5G
			as	p48II9B12		1-2-2-1	AT5G
160T	127/74	k	s	p55.2B3	2 / $_1$ - 1 / $_2$ - 1 / $_2$ - 2 / $_1$ d.b. 2-1-1-2 od. 1-2-2-1	1-2-2-1	AT5G
			as	p55.2B6		1-2-2-1	AT5G
	127/DanPri	l	s	p49.3B1		1-2-2-2	AT5T
			as	p49.3B2		1-2-2-2	AT5T
Standard	127/74	k	s	p25.2A3	2-1-1-2	2-1-1-2	GC3T
			as	p25.2B2		2-1-1-2	GC3T
	127/DanPri	l	s	8b-b8		2-1-1-2	GC3T
			as	8b-a4N1		2-1-1-2	GC3T

Tabelle 5: Verwendete Reportergenplasmide: l: lang; k: kurz; s: sense; as: antisense; $^{1/2}$: 1 oder 2. Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur setzt sich aus den drei Spalten „Nr. in Tumorbank“, „Fragmentlänge“ und „Orientierung“ zusammen (z.B. 137T k s). In der Spalte „Polymorphismen“ sind die entsprechenden Polymorphismenkombinationen bzgl. der Genloci (Reihenfolge -518/-351/-186/-49) dargestellt; A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin; ?: Base konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Anhand von Fettdruck ist die Gruppeneinteilung nach Duchrow et al. (2002) (vgl. S. 30) hervorgehoben.

Anhand des „vorgefundenen“ Genom-Typs erfolgte die revidierte Gruppenzuordnung (Tabelle 5).

Abweichungen vom „erwarteten“ Genom-Typ wurden durch wiederholtes Sequenzieren überprüft und verifiziert. Abweichend von der Klassifikation nach Duchrow et al. (2002) wurde bei 160T der Genotyp 1-2-2-½ gefunden. Demzufolge konnte 160T kein C5- oder C3-Typ sein, sondern war eindeutig ein T5-Typ. Nach Abschluß des praktischen Teils dieser Arbeit ergaben Korrekturen der Arbeitsgruppe Duchrow / Maaser bei den Tumorproben 145T und 154T hinsichtlich der vier Genloci jeweils den Genotyp 1-2-2-1 (persönliche Mitteilung Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Duchrow). Daher wurden in dieser Arbeit Tumoren mit dem gleichen Genotyp bezüglich der vier Genloci untersucht.

3.4 Aktivitätsbestimmungen der Promotorfragmente

Die Messungen zur Promotoraktivität wurden mit dem DLR-Assay durchgeführt (vgl. 2.5.14). Es wurden eine interne Kontrolle sowie eine externe Negativ- und Positivkontrolle mitgeführt.

Die interne Kontrolle diente der Effizienzbeurteilung der Elektroporation. Dadurch, daß der Meßwert des Reportergenplasmides (Meßwert M1) in Relation zu dem cotransfizierten Kontrollplasmid (Meßwert M2) gesetzt wird, ist der ermittelte Quotient $Q = M1/M2$ unabhängig von der Menge des Reportergenplasmides, die während der Elektroporation von den HeLa-Zellen aufgenommen wurde. Die Aktivität der Plasmide wurde als Funktion des Quotienten $Q = M1/M2$ (mit M1: Messung der Firefly-Luciferase; M2: Messung der Renilla-Luciferase) ermittelt und wird nachfolgend mit der Einheit RLU (relative luciferase units) versehen. Als interne Kontrolle diente der pRL-TK-Vektor. Dieser besitzt einen Herpes simplex virus-Thymidinkinase-Promotor (HSV-Promotor) (vgl. 2.2). Um den günstigsten Verdünnungsfaktor des Kontrollplasmides (für den Experimentalansatz) zu ermitteln, wurden entsprechende Verdünnungsmeßreihen durchgeführt. Hierbei wurden Verdünnungen von 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 und 1:50 ausgetestet. Des weiteren wurde der pRL-TK-Vektor gegen den pRL-SV40-Vektor, einem möglichen alternativen Kontrollvektor, in entsprechender Verdünnung getestet. Ziel war es, eine Verdünnung zu finden, die einerseits deutlich geringere Meßwerte als diejenigen der Reportergenplasmide zeigte, sich aber andererseits klar vom Hintergrundrauschen absetzte. Bei Cotransfektion mit pGL3-Basic-Vektoren erwies sich eine Verdünnung von 1:20 des pRL-TK-Vektors als die geeignetste. Daher wurde die Cotransfektion mit 5 µg Reportergenplasmid und

0,25 µg interner Kontrolle je Elektroporationsansatz durchgeführt.

Als externe Positivkontrolle wurde der pGL3-Control-Vektor verwendet. Er besitzt einen SV40-Promotor sowie einen entsprechenden Enhancer. Für die externe Negativkontrolle wurde ohne Zugabe eines Plasmides elektroporetisch transfiziert (NTC = Non-transfected cells). Des Weiteren wurde regelmäßig noch der Ansatz „/+TK“ (d.h. nur aus dem Kontrollplasmid bestehend) mitgeführt. Dadurch war eine Beurteilung möglich, inwieweit bei der ersten Luciferasemessung M1 bereits Photonenemissionen - katalysiert durch die Renilla-Luciferase des Kontrollvektors - mitgemessen und somit zu hohe Werte des Reportergenplasmides ermittelt wurden. Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigten, daß das Kontrollplasmid erst durch Zugabe des S&G-Reagenz (vgl. 2.5.14) aktiviert wurde. Auch konnte sicher gezeigt werden, daß die Firefly-Luciferase des Reportergenplasmides durch das S&G-Reagenz adäquat gestoppt wurde und daß es somit nicht zu falschen M2-Meßwerten kam. Die Meßergebnisse sind zusammengefaßt in Tabelle 6 dargestellt. Eine ausführliche Darstellung findet sich in Kapitel 8.9.

<i>Plasmide</i>	<i>arithmetischer Mittelwert der RLU ($Q=M1/M2$)</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Anzahl der Messungen</i>
p8b-b8	30,4731	9,4969	5
p8b-a4	4,0544	1,9230	3
p25.2A3	85,1160	22,7058	6
p25.2B2	3,4256	1,6441	5
p35.4B1	36,1577	9,2207	4
p35.4B6	6,41	2,1995	4
p36.2B4	82,3848	26,7137	5
p36.4B11	3,67	2,0148	4
p48II9NLB3	52,2287	14,9893	5
p48II9B12	3,0981	1,2364	3
p49.3B1	41,0065	18,4078	4
p49.3B2	2,9729	0,3146	3
p50.3B6	26,74	12,0445	6
p50.3B2	6,5456	2,7983	3
p51.1XB3	87,0136	10,7759	4

<i>Plasmide</i>	<i>arithmetischer Mittelwert der RLU ($Q=M1/M2$)</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Anzahl der Messungen</i>
p51.1XB1	5,6947	1,9944	3
p52.1B1	83,5778	25,7378	5
p52.1B2	5,7141	1,3587	4
p53.3B2	20,5477	5,0593	5
p53.3B6	3,7866	1,0794	3
p54.1XB6	81,0112	26,3739	3
p54.1XB4	4,2770	0,7913	3
p55.2B3	56,9561	20,6701	5
p55.2B6	3,6653	0,5062	4
p56.1N6B2	59,6597	8,4596	5
p56.1N6B1	4,5047	2,0570	3
p31.1A11	4,2095	1,0113	4
p31.1A2	23,6269	2,1164	3
Control (/TK)	28,0036	5,7209	3
NTC	0,0137	0,0070	15

Tabelle 6: Meßergebnisse der Reportergenplasmide sowie des Kontrollplasmidansatzes (Control) und der externen Negativkontrolle (NTC); zur Namensgebung der Plasmide vgl. Tabelle 5; RLU: relative Luciferase-Aktivität

3.5 Auswertung

Die Meßergebnisse der Plasmide wurden zunächst einmal nach Tumor und Länge des Fragmentes geordnet dargestellt. Dabei zeigte sich, daß sämtliche Quotienten bei Plasmiden mit dem 127/74-Insert höher lagen als diejenigen mit dem 127/DanPri-Insert und zwar unabhängig davon, welcher Polymorphismus zu Grunde lag. Darüberhinaus lagen die Quotienten sämtlicher Plasmide mit antisense-Orientierung zwischen 1,33 RLU und 9,77 RLU. Diese waren zwar deutlich höher als das Hintergrundrauschen - ermittelt durch Messungen mit NTC-Ansätzen ($Q = 0,01 \pm 0,01$ RLU), jedoch deutlich niedriger als die Quotienten der Plasmide in sense-Orientierung.

Die Werte der Plasmide mit 127/74-Insert lagen zwischen dem 56,96 ($\pm 20,67$)- und 87,01 ($\pm 10,78$)-fachen der Renilla-Luciferase, des internen Kontrollvektors. Die Plasmide

mit einem 127/DanPri-Insert wiesen das 20,55 ($\pm 5,06$)- bis 51,59 ($\pm 14,99$)-fache der Renilla-Luciferase-Messung auf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 und Abbildung 6 graphisch dargestellt.

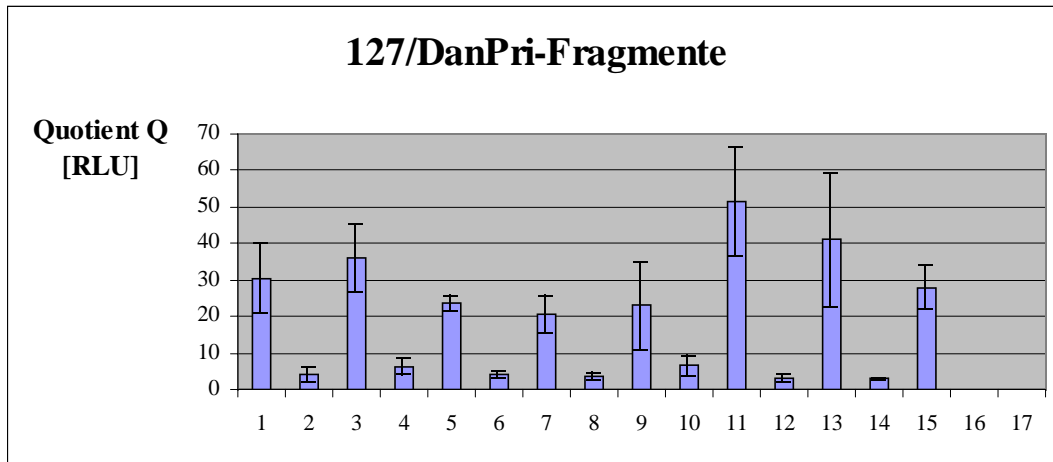


Abbildung 5: Meßergebnisse der *pKi-67* Promotoren (langes Fragment) aus verschiedenen Tumoren: 1) Standard l s; 2) Standard l as; 3) 137T l s; 4) 137T l as; 5) 144T l s; 6) 144T l as; 7) 145T l s; 8) 145T l as; 9) 154T l s; 10) 154T l as; 11) 158T l s; 12) 158T l as; 13) 160T l s; 14) 160T l as; 15) Positivkontrolle („Control“); 16) Negativkontrolle („NTC“); 17) Renilla-Luciferase-Vektor ohne Reporter-genplasmid („TK“) mit s: sense-Orientierung; as: antisense-Orientierung und Standard: *pKi-67* Promotor aus HeLa S3

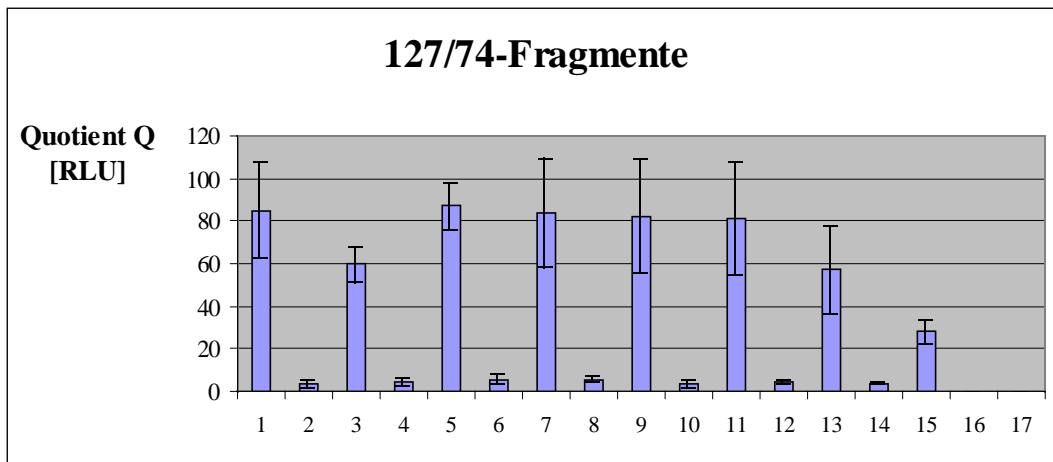


Abbildung 6: Meßergebnisse der *pKi-67* Promotoren (kurzes Fragment) aus verschiedenen Tumoren: 1) Standard k s; 2) Standard k as; 3) 137T k s; 4) 137T k as; 5) 144T k s; 6) 144T k as; 7) 145T k s; 8) 145T k as; 9) 154T k s; 10) 154T k as; 11) 158T k s; 12) 158T k as; 13) 160T k s; 14) 160T k as; 15) Positivkontrolle („Control“); 16) Negativkontrolle („NTC“); 17) Renilla-Luciferase-Vektor ohne Reporter-genplasmid („TK“) mit s: sense-Orientierung und as: antisense-Orientierung und Standard: *pKi-67* Promotor aus HeLa S3

3.5.1 Gruppeneinteilung nach Duchrow et al.

Gemäß der Einteilung nach Duchrow et al. (2002) hinsichtlich der Polymorphismen wurden die Plasmide getrennt nach der Länge des Promotorfragmentes zusammengefaßt. Hierbei war insbesondere innerhalb der Gruppe T5 eine recht inhomogene Verteilung der Aktivitäten zu beobachten. Bei den 127/DanPri-Fragmenten von T5 variierten die ermittelten Quotienten von $20,55 \pm 5,05$ RLU bis $51,59 \pm 14,99$ RLU, d.h. die gemessenen Aktivitäten von T5 entsprachen in vollem Umfang dem Aktivitätsspektrum der gesamten 127/DanPri-Fragmente. Für die entsprechenden 127/74-Fragmente sind Aktivitäten zwischen $83,56 \pm 25,74$ RLU und $56,96 \pm 20,67$ RLU ermittelt worden. Die Aktivitäten sind in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt. Es zeigte sich, daß wiederum die Quotienten der Plasmide mit dem 127/74-Insert über denjenigen Quotienten der Plasmide mit 127/DanPri-Insert lagen. Die Aktivität der 127/74-Fragmente war zirka doppelt so hoch wie diejenige der 127/DanPri-Fragmente.

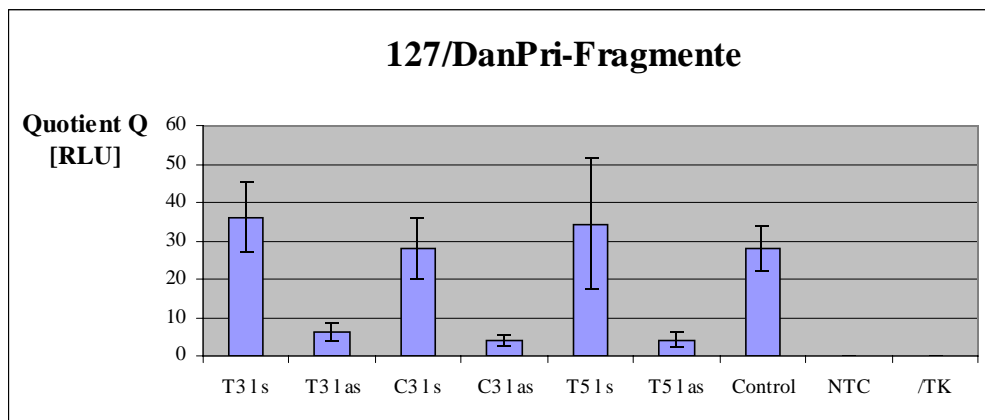


Abbildung 7: Zusammenfassung der verschiedenen *pKi-67* Promotortypen (langes Fragment) nach Duchrow et al.: l: lang (127/DanPri); s: sense-Orientierung; as: antisense-Orientierung; Control: Positivkontrolle; NTC: Negativkontrolle (non-transfected cells); /TK: Renilla-Luciferase-Vektor ohne Reportergenplasmid

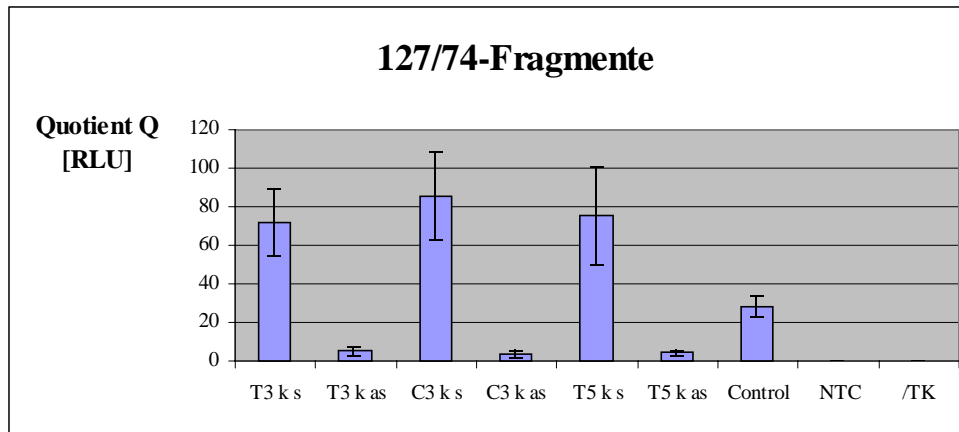


Abbildung 8: Zusammenfassung der verschiedenen *pKi-67* Promotortypen (kurzes Fragment) nach Duchrow et al.: k: kurz (127/74); s: sense-Orientierung; as: antisense-Orientierung; Control: Positivkontrolle; NTC: Negativkontrolle; /TK: Renilla-Luciferase-Vektor ohne Reporterplasmid

Ordnete man die Gruppen bezüglich ihres Quotienten, so ergab sich folgende Reihenfolge:

127/74-Insert („kurzes“ Insert): $C3 > T5 > T3$

127/DanPri-Insert („langes“ Insert): $T5 > T3 > C3$

Die Plasmide der Subgruppe „T“ wiesen bei den langen Inserts (127/DanPri) eine höheren Quotienten auf als die Gruppe C3. Bei den kurzen Fragmenten hatte der C3-Typ den höchsten Quotienten, während Plasmide der Subgruppe „T“ einen geringeren Quotienten hatten. Auffallend war diesbezüglich die Relation der Quotienten der jeweils entsprechenden 127/DanPri- und 127/74-Fragmente zueinander und damit die Aktivitätszunahme vom 127/DanPri- zum 127/74-Insert. Die Aktivität stieg beim C3-Typ von $27,91 \pm 8,09$ RLU auf $85,12 \pm 22,71$ RLU um $57,21$ RLU. Dies entsprach einer Zunahme um $205,0\%$ bzw. einer Verdreifachung. Beim T5-Typ war ein Zuwachs von $34,42 \pm 17,17$ RLU auf $75,42 \pm 25,41$ RLU und beim T3-Typ von $36,16 \pm 9,22$ RLU auf $71,82 \pm 16,95$ RLU zu beobachten. Damit lag die Aktivitätssteigerung bei $119,1\%$ für den T5-Typ und bei $98,6\%$ für den T3-Typ. Die Aktivität vom T3-Typ verdoppelte sich folglich.

3.5.2 Alternative Gruppeneinteilung

Für eine alternative Darstellung wurden die Klone - getrennt nach der Insertlänge - hinsichtlich ihres Quotienten Q geordnet und diesbezüglich in jeweils drei Gruppen unterteilt. Es wurde folgende Unterteilung gewählt:

Plasmide mit 127/DanPri-Insert (Angabe in RLU)

Gruppe I: $Q < 30$

Gruppe II: $Q: 30-40$

Gruppe III: $Q > 40$

Plasmide mit 127/74-Insert (Angabe in RLU)

Gruppe 1: $Q < 70$

Gruppe 2: $Q: 70-85$

Gruppe 3: $Q > 85$

Die entsprechende Zuordnung der Klone ist in Tabelle 7 dargestellt. Ein Vergleich der Klone innerhalb einer Gruppe auf genomischer Ebene sollte erste Hinweise bringen, inwieweit es bezüglich der Polymorphismen an diesen vier Genloci Übereinstimmungen gab. Hierbei zeigte sich, daß es in Gruppe I eine Übereinstimmung in der vierten Position gab. In Gruppe II waren die erste und dritte Position (Position -518 und -186) und in Gruppe III die erste, zweite und dritte Position (Position -518, -351 und -186) identisch. Auch bei den Plasmiden mit den 127/74-Fragmenten fanden sich diesbezüglich Übereinstimmungen: in Gruppe 1 waren die erste, zweite und vierte. Position (Position -518, -351 und -49) und in Gruppe 2 sind die Klone komplett hinsichtlich der vier Genloci identisch. In Gruppe 3 stimmten die dritte und vierte Position überein (Tabelle 8).

<i>Gruppe</i>	<i>Name</i>	<i>Genom a</i>	<i>Genom b</i>
I	144T l s	2-1-1-1	GC3G
	145T l s	1-2-2-1	AT5G
	154T l s	1-2-2-1	AT5G
II	Standard l s	2-1-1-2	GC3T
	137T l s	2-2-1-GG	GT3(GG)
III	158T l s	1-2-2-1	AT5G
	160T l s	1-2-2-2	AT5T
1	137T k s	1-2-1-1	AT3G
	160T k s	1-2-2-1	AT5G
2	145T k s	1-2-2-1	AT5G
	154T k s	1-2-2-1	AT5G
	158T k s	1-2-2-1	AT5G
3	Standard k s	2-1-1-2	GC3T
	144T k s	1-2-1-2	AT3T

Tabelle 7: Alternative Gruppeneinteilung der verschiedenen Tumore nach ihrer *pKi-67* Promotoraktivität: l: langes Fragment (127/DanPri); k: kurzes Fragment (127/74); s: sense-Orientierung; genomische Bezeichnung bzgl. der vier Genloci (-518/-351/-186/-49); die Ziffern in Spalte 3 (Genom a) beziehen sich auf die Klassifikation von Duchrow et al., Spalte 4 (Genom b) sind die Basen bzw. die Anzahl der Repetitionen an den vier Genloci dargestellt (vgl. 3.3)

<i>Gruppe</i>	<i>Übereinstimmung im Genom</i>
I	_ _ _ G
II	G _ 3 _
III	A T 5 _
1	A T _ G
2	A T 5 G
3	_ _ 3 T

Tabelle 8: Übereinstimmungen von Polymorphismen an den untersuchten Genloci: die Genloci -518, -351, -186 und -49 sind in dieser Reihenfolge durch [_] dargestellt. Bei vollständiger Übereinstimmung ist am entsprechenden Locus die vorgefundene Base bzw. die Anzahl der Repetitionen eingetragen.

Anhand der Darstellung in Tabelle 8 zeigte sich, daß bei den 127/DanPri Fragmenten des mutmaßlichen *pKi-67* Promotors Übereinstimmungen vorzugsweise in Position -518 und -186 (mit Ausnahme von Gruppe I) anzutreffen waren, während bei den 127/74-Fragmenten in allen Gruppen (Gruppen 1-3) mindestens die Position -49 übereinstimmte. In Abbildung 9 sind den Promotoraktivitäten der verschiedenen Gruppen die Übereinstimmungen an den vier unterschiedlichen Genloci zusammenfassend gegenübergestellt.

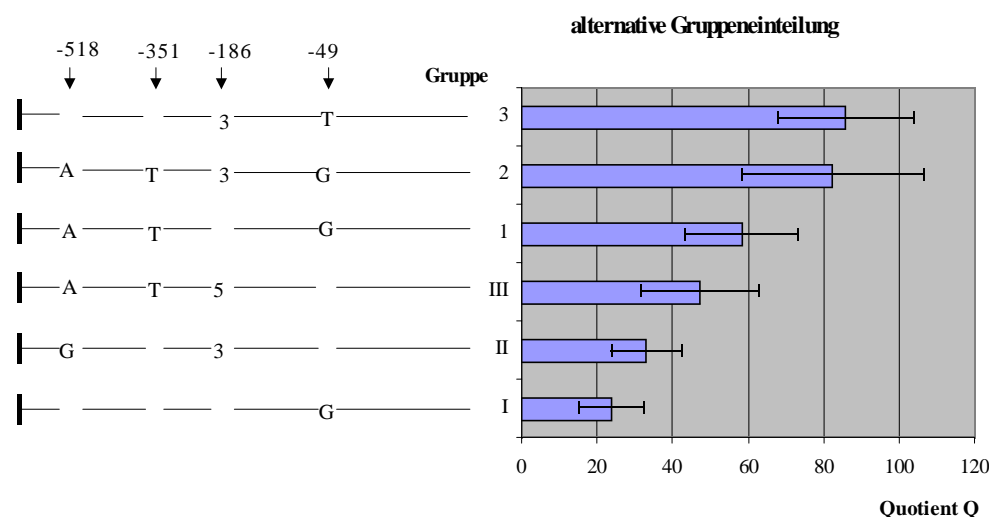


Abbildung 9: Zusammenfassung der verschiedenen *pKi-67* Promortypen nach der Promotoraktivität (alternative Gruppeneinteilung) und Darstellung der gemeinsamen Polymorphismen an den Genloci: Positionangaben der Genloci bzgl. Transkriptionsstart; bei vollständiger Übereinstimmung der Polymorphismen in einer Gruppe ist am Genlocus der entsprechende Polymorphismus eingetragen: A: Adenin; G: Guanin; T: Thymin; 3: drei Repetitionen; 5: fünf Repetitionen

3.5.3 Berechnung von Promotoraktivitäten

Da aufgrund von nachträglichen Korrekturen seitens der Arbeitsgruppe Duchrow / Maaser nicht alle Genotypkombinationen als 127/74- und 127/DanPri-Fragmente vorlagen, wurde anhand des vollständig vorhandenen Genotyps „AT5G“ und „GC3T“ das Verhältnis der 127/74-Fragmente (k) zu den 127/DanPri-Fragmenten (l) rechnerisch ermittelt. Unter Gewichtung der zugrundeliegenden Anzahl der Messungen ergab sich ein gemittelter Faktor $v=2,411$, d.h. ein Verhältnis k:l von 2,411:1. Anhand dieses Faktors v ließen sich die Promotoraktivitäten der fehlenden Fragmente einzelner Genotypen theoretisch ermitteln. Zusammen mit den experimentell ermittelten Promotoraktivitäten der einzelnen Tumore ließ sich eine Rangfolge bezüglich der Promotoraktivität erstellen (Tabelle 9).

<i>Q [RLU]</i>	<i>Genom</i>	<i>Tumor</i>
98,86	AT5T	a (160T _I) k
87,18	GT3G	a (137T _I) k
87,01	AT3T	144T _{II} k
85,12	GC3T	Standard k
83,58	AT5G	145T k
82,38	AT5G	154T k
81,01	AT5G	158T k
59,66	AT3G	137T _{II} k
56,96	AT5G	160T _{II} k
56,96	GC3G	a (144T _I) k
52,23	AT5G	158T l
41,01	AT5T	160T _I l
36,16	GT3-(GG)	137T _I l
36,11	AT3T	a (144T _{II}) l
30,47	GC3T	Standard l
26,74	AT5G	154T l
24,76	AT3G	a (137T _{II}) l
23,63	GC3G	144T _I l
23,63	AT5G	a (160T _{II}) l
20,55	AT5G	145T l

Tabelle 9: Rangliste der *pKi-67* Promotoraktivität (lange und kurze Fragmente) von verschiedenen Tumoren: mit Q: relative Promotoraktivität (M1/M2); k: 127/74-Fragment; l: 127/DanPri-Fragment; A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin; a: rechnerisch ermittelte Promotoraktivität, in Klammern ist der zugrundeliegende Tumor angegeben. Da die Tumoren 137T, 144T und 160T in den 127/74- und 127/DanPri-Fragmenten einen unterschiedlichen Genotyp aufweisen, werden sie zu Unterscheidung mit den Zusätzen I und II versehen. Der entsprechende Genotyp kann Spalte 2 entnommen werden.

Hierbei zeigte sich die höchste Aktivität bei der Genotypkombination „AT5T“ bei den 127/74-Fragmenten. Die zweithöchste Aktivität hatte – ebenfalls rechnerisch ermittelt – die Genotypkombination „GT3G“. Bei den 127/DanPri-Fragmenten wies der Tumor T158 („AT5G“) mit 52,23±14,98 RLU die höchste Promotoraktivität auf. An zweiter Stelle fand sich Tumor T160 („AT5T“) mit 41,01±18,41 RLU. Die geringste Aktivität wiesen die Genotypen „GC3G“ (rechnerisch ermittelt) und „AT5G“ (Tumor T160) bei den

127/74-Fragmenten auf. Bei den 127/DanPri-Fragmenten hatten der Tumor T145 („AT5G) und Tumor T144 („GC3G“) die niedrigste Aktivität.

Faßte man bei der Berechnung die durchschnittlichen Promotoraktivitäten der Tumore gleicher Genotypen – getrennt nach Insertlänge – zusammen und bezog die theoretisch ermittelten Promotoraktivitäten der jeweiligen Genotypen mit ein, so ergab sich, normiert auf die 127/DanPri-Fragmente, folgendes (Tabelle 10):

<i>Genom</i>	<i>Promotoraktivität [RLU]</i>
GC3G	23,6 ±2,1
AT3G	24,8 ±3,5
AT5G	32,0 ±13,8
GC3T	33,1 ±9,3
AT3T	36,1 ±4,5
GT3G	36,2 ±9,2
AT5T	41,0 ±18,4

Tabelle 10: Darstellung der gemittelten Promotoraktivitäten für die jeweiligen Polymorphismenkombination ("Genom"): Schreibweise analog zu 3.3

Zusammenfassend läßt sich folgendes festhalten: Der Genotyp „AT5T“ hatte experimentell nachgewiesen die höchste Aktivität bei den 127/DanPri-Fragmenten und höchstwahrscheinlich auch die höchste Aktivität bei den 127/74-Fragmenten (rechnerisch ermittelt). Die geringste Promotoraktivität fand sich bei „GC3G“ sowohl bei den 127/74-Fragmenten als auch bei den 127/DanPri-Fragmenten.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methode

Zur Eingrenzung von Promotoren und der Bestimmung ihrer Aktivitäten sind Reporter-genassays die Methode der Wahl. Es werden Vektoren mit diversen Genen als Reporter verwendet, deren Transkriptionsrate mittels verschiedener Meßmethoden quantifiziert wird. Als Beispiel seien das CAT-Gen (Chloramphenicol Acetyl Transferase), das LacZ-Gen, welches für β -Galactosidase kodiert, sowie das luc-Gen (Luciferase) als die am häufigsten verwendeten genannt (Pardy 1994). Lumineszenzassays (luc und β -gal) haben den Vorteil, daß sie keiner Radioaktivität bedürfen und bis zu 1000-fach sensitiver und leichter bestimmbar als CAT-Assays sind (Martin et al. 1996). Hierbei werden Chemilumineszenz- von Biolumineszenzmessungen unterschieden. Unter Chemilumineszenz (Synonyme sind „kaltes Leuchten“ und „Kaltlicht“) werden Leuchterscheinungen verstanden, die auf Freisetzung von Lichtquanten bei chemischen Reaktionen beruhen. Lichtemissionen von lebenden Organismen werden als Biolumineszenz oder „living light“ bezeichnet. LacZ-Genen (β -gal) liegt die Chemilumineszenz zugrunde, während die Luciferase auf Biolumineszenz beruht. Um Messungen von Promotoraktivitätsstudien vergleichen zu können, werden die verwendeten Zellen mit einem zweiten Vektor, einem Kontrollplasmid, cotransfiziert. Hierzu wurde ein System benutzt, in dem das Reporterplasmid ein luc-Gen und das Kontrollplasmid ein β -gal-Gen besaß. Die Meßsysteme bestehen also aus einer kombinierten Bio-/Chemilumineszenzmessung. Ein Nachteil hierbei liegt darin, daß eine mögliche endogene β -gal-Aktivität in den transfizierten Zellen die Meßergebnisse verfälschen kann (Pardy 1994). Farr und Roman (1991) stellten fest, daß die Aktivität des internen Kontrollplasmides mit β -gal durch Reporterplasmide verschieden stark und abhängig von der verwendeten Zelllinie supprimiert werden. Aufgrund neuerer Entwicklungen ist die doppelte Biolumineszenzmessung in einem einzigen Zellysat möglich. Hierzu wird die Firefly-Luciferase als Reporterplasmid und die Renilla-Luciferase als Kontrollplasmid verwendet. Dies ist aufgrund unterschiedlicher Substratanforderungen möglich. Ein Vorteil des Dual-Luciferase Reporter Assay-Systems (Firefly- und Renilla-Luciferase) gegenüber dem Dual Lumineszenz basiertem Reporter Assay-System (luc und β -gal) liegt in der deutlich kürzeren Meßdauer von 30 Sekunden gegenüber mehr als einer Stunde. Darüberhinaus

zeichnet das Dual-Luciferase Reporter Assay-System eine hohe Sensitivität aus (Martin et al. 1996). Das Detektionslimit für Luciferase-Assays liegt bei 10^3 Molekülen (Van der Poell et al. 2001) beziehungsweise 10^{-15} bis 10^{-8} g (d.h. bis 1 fg) Luciferase (Martin et al. 1996). Durch die bereits erwähnte Cotransfektion mit Renilla-Luciferase ist die Normalisierung präziser als bei der Einzeltransfektion und somit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse besser gewährleistet. Es konnte gezeigt werden, daß die normalisierte Ratio der Firefly- und Renilla-Luciferase ($Q = M1/M2$) proportional zur Leseeffizienz des Ribosoms ist (Stables et al. 1999, Dyer et al. 2000). Erst nach Abschluß des experimentellen Teils dieser Arbeit wurde bekannt, daß das in dieser Arbeit verwendete native *Renilla-Luciferase*-Gen mehrere hundert Bindungsstellen für diverse Transkriptionsfaktoren besitzt. Diese können unkontrolliert die Transkriptionsrate der *Renilla-Luciferase* beeinflussen und somit zu einer fehlerhaften Normalisierung der Meßwerte führen. Als Folge ergibt sich eine größere Streuung der ermittelten Promotoraktivitäten (persönliche Mitteilung Dr. rer. nat. T. Klünner, Fa. Promega, Mannheim).

Dadurch lassen sich möglicherweise die relativ hohen Standardabweichungen der Meßwerte erklären. Ein weiterer Grund für die relativ hohen Standardabweichungen der Meßwerte liegt unter anderem in den stärkeren Schwankungen bei der Transfektion der Reporterogenplasmide als bei der Transfektion der Renilla Luciferase-Plasmide. Dies könnte in der unterschiedlichen Größe der beiden Plasmide begründet sein. pRL-TK umfaßt 4045 bp, pGL3-Control 5256 bp und die Reporterogenplasmide 5850 bp respektive 6125 bp. Ein zusätzlicher Grund für die ermittelten Standardabweichungen könnte die unterschiedliche Verteilung der transfizierten Zellen in den diversen Phasen des Zellzyklus sein. Da die Expression des pKi-67 zellzyklusabhängig ist (Gerdes et al. 1983 und 1984, Guillard et al. 1989), sollte dies gegebenenfalls zukünftig durch Synchronisierung mittels entsprechender Inhibitoren berücksichtigt werden. Als Verbesserung empfiehlt es sich meines Erachtens, Reportergenassays möglichst vollautomatisch durchzuführen, um die Störanfälligkeit des Systems weiter zu minimieren.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Charakterisierung des gesamten untersuchten *pKi-67* Promotorfragmentes

Das 127/DanPri-Fragment reicht von -555 bis +754 (Exon 1, Intron 1, Exon 2 und Intron 2 teilweise) und das 127/74-Fragment von -555 bis +479 (bzgl. Transkriptionsstart). Letzteres beinhaltet also Exon 1, Intron 1 sowie Exon 2 zu Teilen. Duchrow et al. (1996) beschrieben in einem Fragment des *pKi-67* Gens, welches von -75 bis +726 bzgl. des Transkriptionsstarts reicht (= 800 bp), mehrere potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Positionsangaben bzgl. Transkriptionsstart): 2 GC-Boxen als mögliche Bindungsstellen für Sp1, einem Transkriptionsfaktor (Dyran und Tjian 1985, Briggs et al. 1986, Jankowski und Dixon 1987, Santoro et al. 1988, weiteres s.u.) in (+)-Orientierung bei Position -14 und +4, potentielle Bindungsstellen für AP1 (Martin et al. 1988) in Position -48 [(+)-Orientierung] und Position +271 (inverse Orientierung), zwei Konsensus-Sequenzen für MRE („metal response elements“) (Labbe et al. 1991) in Position -11 und -65; eine potentielle ETF-Bindungsstelle (Kageyama et al. 1988) in Position +309 (inverse Orientierung) und eine Konsensus-Sequenz für den Faktor NF-kappa b (Bäuerle 1991) in Position +159 (inverse Orientierung) sowie eine potentielle E2A-Bindungsstelle (Faisst und Meyer 1992) in Position +289. Ferner fanden sie in Position +76 und +103 mögliche Bindungsstellen für Faktoren der Helix-Loop-Helix-Familie [bHLH] (Anthony-Cahill et al. 1992). Nach aktuellem Stand der Wissenschaft sind zahlreiche potentielle Bindungsstellen für weitere Transkriptionsfaktoren hinzugekommen, wie ein Vergleich der untersuchten Sequenz von 127/DanPri mit der MatInspector Matrix Library (einschließlich der Transfac-Matrixen) [www.gsf.de] ergab. Sie sind vollständig in Kapitel 8.6 aufgeführt.

4.2.1.1 Potentielle DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren an den Genloci der Polymorphismen

Insbesondere die vier Genloci, die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen, sind hinsichtlich möglicher Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht worden. Position -518 liegt innerhalb der Konsensus-Sequenz für die potentielle Bindungsstelle von E47 in (+)-Orientierung. Nahe Position -351 befindet sich eine putative Bindungsstelle für Sp1 in inverser Orientierung. Bei Position -186 liegen in unmittelbarer Nachbarschaft potentielle

Bindungsstellen für CREB und WT1 jeweils in (+)-Orientierung. Die Konsensus-Sequenzen von VMAF (+) und WHN (+) beinhalten jeweils Position -186. Direkt stromabwärts von Position -49 liegen potentielle Bindungsstellen für AP2 in (+)-Orientierung. Die Konsensus-Sequenzen von AHR (-) und EBVR (-) überspannen Position -49 (Angabe der Orientierung jeweils in Klammern; vgl. 8.4 und 8.6). Auf eine ausführliche Diskussion der potentiellen Bindungsstellen in inverser Orientierung wird verzichtet, weil eine biologische Funktion nicht zu erwarten ist, mit Ausnahme von Sp1 bei Position -351, da hier nur diese eine potentielle Bindungsstelle liegt.

E47:

Zwischen Position -526 und Position -511, also inklusive Position -518, liegt eine putative Bindungsstelle für MYOD/E47. Das Protein E47 gehört in die Familie der bHLH-Proteine der Klasse A (Hsu et al. 1990, Murre et al. 1989). E47 bildet mit TAL1 Heterodimere, die mittels ihrer spezifischen Konsensus-Sequenz an DNA binden. Dabei ist die Konsensus-Sequenz des Heterodimers jeweils zur Hälfte zusammengesetzt aus der Erkennungssequenz für A bHLH [d.h. E47] (AACAG) und der Erkennungssequenz für TAL1-Polypeptide (ATGGT). Die resultierende Konsensus-Sequenz des Heterodimers (AACAGATGGT) ist mit der verglichenen *pKi-67* Sequenz (CAGGTG) mit Ausnahme der Base Guanin (G) an Position -518 identisch. Liegt anstatt der Kombination „GG“ (Typ 2) der Polymorphismus „GA“ (Typ 1) vor, so beträgt die Übereinstimmung 100%. Dies ist vermutlich die entscheidende Stelle, ob und mit welcher Affinität das Heterodimer TAL1/E47 gebunden wird. Die Erstbeschreibung der TAL1/E47 Heterodimere erfolgte bei Zellen von einem Patienten mit „T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)“ (Rabbitts 1991). Durch die Bindung des Heterodimers an DNA wird wahrscheinlich die Transkription von Zielgenen reguliert (Hsu et al. 1990). Die im *pKi-67* Gen gefundenen Polymorphismen an Position -518 könnten eine veränderte Bindungsaffinität bewirken und somit zur Erklärung der unterschiedlichen Promotoraktivitäten beitragen. Bei der Gruppeneinteilung nach dem Promotoraktivitätslevel (vgl. 3.5 und 4.2.4) fiel auf, daß bei den niedrigen Aktivitätsleveln (Gruppe II) der Typ 2 bzgl. Position -518 (d.h. „GG“) und bei den Plasmiden mit einer höheren Aktivität (Gruppe III-V) vorzugsweise Typ 1 (d.h. „GA“) vorlagen. Damit betrug die Übereinstimmung mit oben genannter Konsensus-Sequenz 100%. Dies deutet auf einen möglichen, positiven Einfluß von E47 auf die *pKi-67* Promotoraktivität hin.

Sp1

Von Position -350 bis Position -338, also in unmittelbarer Nachbarschaft zu -351, liegt eine potentielle Bindungsstelle, eine GC-Box (Konsensus-Sequenz: GGGGCGGGG) für den Transkriptionsfaktor Sp1 in inverser Orientierung. Aufgrund der Strukturähnlichkeit binden neben Sp1 auch Sp3 und Sp4 an die klassische „Sp1-binding-site“ mit identischer Affinität (Suske 1999). Insgesamt weisen 14 verschiedene Proteine ein Sp1-ähnliche DNA-Bindungsdomäne auf (Cook et al. 1999). Sp1 ist ein Aktivator der Transkription (Courey und Tjian 1988, Suske 1999). Sp3 konkurriert als Repressor mit Sp1 um die Bindestelle. Dies hat zu der Modellvorstellung geführt, daß einige Gene einerseits durch Sp1 aktiviert und andererseits durch Sp3 über dieselbe Bindungsstelle reprimiert werden (Birnbaum et al. 1995, Denning et al. 1996). Die Aktivierung wird durch Interaktion mit Faktoren, die Teil des generellen Transkriptionsapparates sind (z.B. TBP), erreicht. Piao et al. (1997) wiesen nach, daß Mutationen im Sp1-Motiv, der GC-reichen DNA-Bindungsstelle für Sp1, zu einer Veränderung der Promotoraktivität führen. In JEG-3-Zellen nahm die Aktivität auf 30% und in JAR-Zellen auf 60% ihres Ausgangswertes ab. Beides sind humane Chorionkarzinomzelllinien. Da die putative Bindungsstelle für Sp1 im *pKi-67* Gen nicht direkt den Polymorphismus in Position -351 umfaßt, sondern nur in unmittelbarer Nachbarschaft liegt, bleibt der Einfluß auf die Promotoraktivität fraglich, zumal zudem noch eine inverse Orientierung vorliegt. Jankowski und Dixon (1987) zeigten, daß die Wirkung von Sp1 als negativer oder positiver Transkriptionsregulator von der Position der GC-Box zur TATA-Box abhängt. Inwieweit dies für TATA⁰-Inr⁺-Promotoren (vgl. 4.2.2.2) wie den *pKi-67* Promotor gilt, bleibt nach derzeitigem Wissensstand offen.

VMAF

Die potentielle Bindungsstelle für maf, AP1F/VMAF, hat interessanterweise zwei palindromische Konsensus-Sequenzen, deren Mittelteile mit jeweils zwei Bindungssequenzen für AP-1 übereinstimmt: TGCTGACTCAGCA und TGCTGACGTCAGCA (Kataoka et al. 1994).

Vmaf ist ein Onkogen, das für maf, einem Protein mit bZip-Motiv, kodiert. Mittels bZip-Motive (Leucin-Zipper) ist die Dimerisierung und die DNA-Bindung möglich. Es können sowohl Homodimere (maf-maf) als auch Heterodimere entstehen. Hierbei bildet maf mit Teilen von AP-1, Fos oder Jun, Heterodimere. Hetero- und Homodimere der maf-Familie weisen eine unterschiedliche Affinität zur DNA auf (Kataoka et al. 1994). Kataoka et al.

(1994) folgerten, daß durch die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten bezüglich der Dimerbildung eine außergewöhnliche Feinabstimmung der Transkriptionsregulation möglich sei. In Anbetracht der Tatsache, daß das *pKi-67* Gen an dieser putativen Bindungsstelle (-186) 3 oder 5 Repetitionen aufweist, liegt folgende Vermutung nahe: Die unterschiedliche Anzahl der Repetitionen könnte zu einer Veränderung der Affinitäten der verschiedenen Hetero- respektive Homodimere (bei bestimmten Kombinationen) aufgrund synergistischer oder konkurrierender Interaktion derselben führen. Dies könnte wiederum in einer unterschiedlichen Transkriptionshäufigkeit des *pKi-67* Gens resultieren. Unterstützt wird die Vermutung von folgender Beobachtung von Kataoka et al. (1994): Bei DNA-Elementen, die beide Homodimere (maf-maf, Jun-Jun) vorrangig binden, wirkt bei Heterodimeren der jeweilige Partner inhibitorisch. Ferner können maf und AP-1 als Heterodimere synergistisch wirken, wodurch eine stärkere Bindungsaffinität zur DNA resultiert (Kataoka et al. 1994). Demzufolge bestimmt das DNA-bindende Protein als Homo- respektive Heterodimer die Promotoraktivität mit, wobei die Art der Dimerbildung anderen Einflüssen unterworfen ist. Kataoka et al. (1994) vermuteten, daß Interaktionen von maf und AP-1 Proteinen sowohl eine inhibitorische als auch stimulierende Wirkung haben könnten - und zwar in Abhängigkeit von der Zielsequenz.

WHN

Zwischen -196 und -186 liegt die Konsensus-Sequenz für Winged Helix-Proteine (WHN), eine Subfamilie in der Familie der Helix-Turn-Helix Proteine (Gajiwala und Burley 2000). Die WHN-Proteine sind für die Embryogenese, für Entwicklung und Alterungsvorgänge von Bedeutung. So fungiert beispielsweise ein Protein dieser Subfamilie, HNF-3 β , als Repressor der Transkription, während ein anderes Protein, HFH, durch Bindung an die Regulationssequenz im Promotor des Zielgens als Entwicklungsverstärker bei endodermalem Gewebe wirkt (Gajiwala und Burley 2000).

WT1

WT1 ist ein Protein, von dem es mindestens 24 Isoformen gibt (Scharnhorst et al. 2001). Ursprünglich wurde es als Suppressor des Wilms-Tumors (Nephroblastom), einer malignen Neoplasie des Kindesalters, beschrieben. Inzwischen ist bekannt, daß es eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Urogenitaltraktes, der frühen Hämatopoese und der frühen Organogenese des Embryos spielt. Auch bei der Entwicklung der akuten Leukämien und des

Gonadoblastoms scheint es eine wichtige Funktion auszuüben. Der Wirkmechanismus ist zur Zeit noch weitgehend unverstanden. WT1 wirkt auch als sequenzspezifischer Transkriptionsregulator. Es gibt Hinweise darauf, daß das WT1-Protein andere Transkriptionsfaktoren von GC-reichen Promotorelementen verdrängt (Scharnhorst et al. 2001). WT1 kann u.a. in Abhängigkeit der Struktur und der verwendeten Zelllinie die Transkription aktivieren oder reprimieren. So beschrieben beispielsweise Wang et al. (1995), daß eine bestimmte Isoform von WT1 die Transkription eines kürzeren Fragmentes des PDGT-A Ketten-Promotors aktiviert und die Transkription der längeren Promotorfragmente reprimiert. Es ist demnach eine Analogie zu den Aktivitäten der langen und kurzen Fragmente des *pKi-67* Promotors vorhanden. Als Zielgene für das WT1-Protein wurden bislang unter anderem Gene für Wachstumsfaktoren, Gene für Wachstumsfaktorrezeptoren und Gene für Transkriptionsfaktoren identifiziert (Scharnhorst et al. 2001).

CRE

Des Weiteren weist die Sequenz des *pKi-67* Gens bei Position -186 die Konsensus-Sequenz von ATF/CRE („cAMP responsive element“) auf. An ATF/CRE bindet die ATF/CREB-Familie der Transkriptionsfaktoren, welche in die Gruppe der bZip-Proteine gehören. Diese Familie wird in mehrere Subgruppen unterteilt. An Position -186 liegt eine putative Bindungsstelle für das Mitglied CREB der Subgruppe CREB, d.h. für CREB/CREB (= ATF-47) (Hurst et al. 1990, Hai und Hartman 2001), vor. CREB („cAMP-response-element-binding protein“) wird mittels einer Signalkaskade von externen Stimuli via Adenylatcyclase, cAMP und Proteinkinase A durch Phosphorylierung aktiviert. Es kommt nachfolgend zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität (Nordheim 1998). Insgesamt ist die ATF/CREB-Familie (also auch die Subgruppe CREB) in die Homöostase involviert. Es sind sowohl Homo- als auch Heterodimerbildungen bekannt (Hai und Hartman 2001), unter anderem mit AP-1 (Kataoka et al. 1994).

AP-2

In unmittelbarer Nachbarschaft zu Position -49, nämlich von -48 bis -37, liegt eine potentielle Bindungsstelle für AP-2. Der Transkriptionsfaktor AP-2 ist bei der Regulation der Expression von zahlreichen Genen beteiligt. Als Beispiel seien HIV-Typ 1, HTLV-1 und Transforming growth factor- α genannt (Hilger-Eversheim et al. 2000). Ferner spielt AP-2 bei der Zellteilung und -differenzierung des Mamma-Karzinoms eine Rolle. AP-2 wirkt als

Tumorsuppressor, indem er verstärkt exprimiert wird. Dies wurde am *c-erbB-2* Promotor (*c-erbB-2* wird bei 25-30% der Mamma-Karzinome exprimiert) und am malignem Melanom untersucht (Hilger-Eversheim et al. 2000). Darüberhinaus fungiert AP-2 als Gegenspieler (negativer Regulator) von *c-myc*, indem es bei den Zielgenen von *c-myc* aufgrund überlagerter Bindungsstellen (von beiden Proteinen) mit den Heterodimeren *myc/max* konkurriert (Gaubatz et al. 1995). Somit ist AP-2 bei der Kontrolle der Apoptose und Zellzyklusprogression beteiligt. AP-2 ist als Homo- und als Heterodimer an den *c-erbB-2* Promotor bindungsfähig. Bisher ist die Funktion von *pKi-67* weitgehend unbekannt. Es ist denkbar, daß die Expression von *pKi-67* durch ein Onkogen-Protein kontrolliert wird. AP-2 könnte als Gegenspieler aufgrund der unmittelbaren Nachbarschaft zum Polymorphismus an Position -49 durch unterschiedliches Bindungsvermögen die Transkriptionsrate beeinflussen.

Als Fazit läßt sich folgendes festhalten:

Interessant sind die vier potentiellen Bindungsstellen in (+)-Orientierung bei Position -186, von denen VMAF und WHN den besagten Polymorphismus direkt mit einschließen, während die Konsensus-Sequenzen für CREB und WT1 in unmittelbarer Nachbarschaft liegen. Bei Position -518 ist polymorphismusbedingt eine Homologie bis zu 100% zur Konsensus-Sequenz des Transkriptionsregulators E47 möglich. Interessanterweise weisen Tumore mit einer hohen Promotoraktivität vorzugsweise eine 100%ige Homologie zur potentiellen Bindungsstelle MYOD/E47 auf (vgl. 3.5.3, Tabelle 10). Dies ist als Hinweis dafür zu werten, daß Transkriptionsfaktoren – insbesondere E47 – eine wichtige Rolle bei der Regulation der Promotoraktivität von *pKi-67* spielen.

4.2.2 Charakterisierung des 74/DanPri-Fragmentes

Die unterschiedlichen Aktivitäten der 127/DanPri („langen“) und 127/74 („kurzen“) Fragmente weisen also auf das 275 Basenpaare umfassende Teilstück - nachfolgend 74/DanPri genannt - von +479 bis +754 (bzw. von 5727' bis 6002' bzgl. EMBL-Datenbank) hin. Es scheint hinsichtlich der Initiation der Transkription und der Transkriptionshäufigkeit relevant zu sein. In diesem Teilstück liegen die „Direct Repeat Box 1“ und die „Direct Repeat Box 2“ (vgl. 8.5) in Tandemanordnung mit je 24 Basenpaaren und mit jeweils einer TATA-Box in inverser Orientierung am 3'-Ende sowie einer „Cap-Site“ in (+)-Orientierung (Duchrow et al. 1996). Ferner beinhaltet dieses Fragment Teile des 2. Exons sowie Teile des 2. Introns (graphische Darstellung in Kapitel 8.4).

4.2.2.1 Silencer

Da die 127/DanPri-Fragmente eine vergleichsweise geringere Aktivität aufwiesen, beinhaltet oben genanntes Teilstück einen Silencer. Dieser postulierte Silencer ist bei der Repression der Aktivität des *pKi-67* Promotors um ca. 50% beteiligt. Silencer werden allgemein definiert als „DNA-Sequenzbereiche [...], die die Effizienz der Transkription reduzieren [...]“ (Becker-Follmann et al. 1995). Ogbourne und Antalis (1998) unterteilten die Silencer in zwei funktionelle Gruppen:

(I) klassische, positionsunabhängige Elemente, die einen aktiven Repressionsmechanismus (im allgemeinen durch Interaktion mit dem GTF-Komplex) steuern, bezeichneten sie als „silencer elements“. In Gruppe II faßten sie nicht-klassische, positionsabhängige Elemente, die einen passiven Repressionsmechanismus (im allgemeinen durch Interaktion mit stromaufwärts gelegenen Elementen) steuern, als NRE („negative regulatory elements“) zusammen.

Das 74/DanPri-Teilstück umfaßt sowohl Bereiche von Exon 2 (150 bp) als auch 125 bp von Intron 2. Der Silencer könnte sowohl innerhalb eines Introns als auch innerhalb des 2. Exons liegen. Letzteres ist nach bisherigen Erkenntnissen weitaus seltener (Ogbourne und Antalis 1998).

Ein Vergleich mit der MatInspector Matrix Library (vgl. 4.2.1) ergab, daß im 74/DanPri-Teilstück eine Konsensus-Sequenz für NRSE (neural-restrictive-silencer-element) in (+)-Orientierung bei +630/+650 bzgl. Transkriptionsstart vorhanden ist. Ferner konnte eine potentielle Bindungsstelle für NRSF (neuron-restrictive-silencer factor) bei +732/+752 bzgl. Transkriptionsstart in (-)-Orientierung nach-

gewiesen werden. NRSE ist bei der Steuerung der neuronalen Expression und der neuronalen Entwicklung bei Wirbeltieren beteiligt (Ogbourne und Antalis 1998). Es konnte gezeigt werden, daß NRSE als Silencer sowohl bei neuronalen Genen als auch bei nicht-neuronalen Genen von Bedeutung sind (Ogbourne und Antalis 1998). NRSF wurde erstmals als ein Silencer-bindendes Protein bei einem Gen, welches einen neuronenspezifischen Natriumkanal kodiert, identifiziert (Mori et al. 1992, Ogbourne und Antalis 1998). NRSF wirkt in neuronalen Zellen als Enhancer und in nicht-neuronalen Zellen als Silencer und bindet an das konservierte Element namens NRSE (Bessis et al. 1997, Ogbourne und Antalis 1998). Somit könnte auch NRSE (+) im 74/DanPri-Teilstück die Silencerfunktion im *pKi-67* Gen übernehmen. Des weiteren ergab der Vergleich mit der MatInspector Matrix Library (s.o.), daß 3 weitere Konsensus-Sequenzen für NRSE stromaufwärts des 74/DanPri-Teilstückes, also in dem gemeinsamen Teil der beiden untersuchten Fragmente, liegen (Angabe der Orientierung in Klammern):

NRSE (-) zwischen Position +130 und +150; NRSE (+) zwischen Position +149 und +169 sowie NRSE (+) zwischen Position +194 und +214.

Auffallend ist das direkte Aufeinanderfolgen von NRSE (-) und NRSE (+) mit Überschneidung von zwei Basen. Alle NRSE liegen im ersten Intron des *pKi-67* Gens.

Die Eingrenzung und genauere Untersuchung, um welchen Subtyp des Silencers es sich handelt, bleibt zukünftigen Studien vorbehalten.

4.2.2.2 TATA-Box und Inr-Element

Das *pKi-67* Gen besitzt keine TATA-Box im klassischen Sinne (Duchrow et al. 1996), d.h. stromaufwärts des Transkriptionsstarts zwischen Position -25 und -30 in (+)-Orientierung gelegen. Insgesamt zwei TATA-Boxen in inverser Orientierung liegen am 5'-Ende des 2. Exons in der „Direct Repeat Boxen 1+2“ (Duchrow et al. 1996) und somit mehrere hundert Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Daher ist das *pKi-67* Gen als ein Gen mit Promotor ohne TATA-Box anzusehen. Bisher sind Promotoren bekannt, die (a) eine TATA-Box oder (b) ein Inr-Element (Initiator-Element) oder (c) sowohl eine TATA-Box als auch ein Inr-Element oder (d) keines von beiden besitzen. Das Inr-Element wurde erstmalig von Grosschedl und Birnstiel (1980) beim *Histon H2A*-Gen des Seeigels als Region von 60 bp, die den Transkriptionsstart umfaßt, beschrieben. Inr-Regionen können den exakten Startpunkt der Transkription determinieren und zusammen mit TATA-Boxen die Stärke des Kernpromotors modifizieren (Smale 1997). Die Funktion der

Inr-Elemente ist der Funktion der TATA-Box gleichwertig, jedoch in ihrer Funktion nicht vollständig analog (Smale und Baltimore 1989, Smale et al. 1990, Smale 1997). Inr-Elemente umfassen gewöhnlich den Transkriptionsstartpunkt. Die Konsensus-Sequenz des Inr-Elements für Säugetiere ist Py-Py-A₊₁-N^T/_A-Py-Py [mit Py: Pyrimidin (d.h. C oder T); N: A, T, C oder G; A₊₁: Transkriptionsstart] (Smale und Baltimore 1989, Javahery et al. 1994). Ein Vergleich mit dem Transkriptionsstart des *pKi-67* Gens (Sequenz von -2⇨+5: TTACCGG) ergibt eine Übereinstimmung mit der oben genannten Konsensus-Sequenz von 57,14%. Demzufolge besitzt der *pKi-67* Promotor ein Inr-Element, da die Konsensus-Sequenz des Inr-Elementes bei Säugetieren durch Degenerationsprozesse stärker verändert sein kann (Smale und Baltimore 1989, Javahery et al. 1994, Burke et al. 1998). Zudem haben viele Kernpromotoren zusätzliche, stromabwärts des Transkriptionsstarts gelegene Elemente, die die Promotorfunktion modulieren (Smale 1997). Diese sogenannten „downstream elements“ scheinen für die Stabilisierung der Bindung des TFIID-Komplexes an den Promotor wichtig zu sein (Smale 1997). TFIID ist ein Komplex aus mehreren Untereinheiten, der für die Initiation der Transkription wichtig und für die Inr-Aktivität notwendig ist (Smale et al. 1990, Smale 1997). Smale (1997) vermutet, daß die „downstream elements“ für Promotoren ohne TATA-Boxen von Bedeutung sein könnten. Burke und Kadonaga (1996) identifizierten ein konserviertes, stromabwärts gelegenes Element (bei ca. +30) in zahlreichen Genen von *Drosophila*, in denen keine TATA-Box vorkommt. An diesem konservierten Element namens DPE („downstream promoter element“) bindet TFIID. Sie zeigten, daß DPE bei *Drosophila*-Genen essentiell für die Aktivität von Promotoren ohne TATA-Box, aber mit Inr-Element und DPE (TATA⁰, Inr⁺, DPE⁺) ist. Der Effekt von DPE auf die Bindung von TFIID an den Promotor und damit der Transkriptionseffekt ist in Gegenwart von einer TATA-Box gering. Bei TATA⁰-Promotoren war er signifikant höher (Burke et al. 1998). DPE wurde auch als wichtiger Bestandteil des Kernpromotors im menschlichem Genom nachgewiesen (z.B. beim IRF-1 Promotor (Interferon regulatory factor-1) von Burke et al. 1998). Ein Vergleich des konservierten DPE-Motivs [^A/_GG^A/_TCGTG (Kernsequenz ist unterstrichen, Burke und Kadonaga 1996)] mit der entsprechenden Stelle im *pKi-67* Gen ergab keine Übereinstimmung. Allerdings wiesen Burke et al. (1998) darauf hin, daß in Analogie zur Inr-Konsensus-Sequenz die Konsensus-Sequenz des DPE-Motivs bei Säugetieren eine größere Variabilität aufweist und damit weniger eindeutig als im *Drosophila*-Genom sein kann. TATA⁰-Promotoren scheinen auf stromaufwärts gelegene

Transkriptionsfaktoren wie z.B. Sp1 und andere (ETS-Motive oder pyrimidinreiche Initiatorelemente) hinsichtlich der Initiation der Transkription angewiesen zu sein (Smale et al. 1990, Kaufmann et al. 1996, Ogbourne und Antalis 1998). Daher ist es denkbar, daß durch die Polymorphismen im Bereich bzw. in unmittelbarer Nachbarschaft zu den potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie Sp1 et cetera ein unterschiedliches Bindungsverhalten entsteht. Dies wirkt sich dann in der Initiation der Transkription aus. Darüber hinaus ist den TATA⁰Promotoren ein bevorzugtes Ansprechen auf bestimmte Aktivatoren sowie eine Resistenz gegenüber manchen Repressoren eigen (Smale 1997).

4.2.3 Gruppeneinteilung nach Duchrow et alteres

Die Einteilung nach Duchrow et al. (2002) erfolgte aufgrund der Polymorphismen an den Genloci -351 und -186 ohne Berücksichtigung der Genloci -518 und -49.

Die unterschiedliche Reihenfolge der Aktivität der Subtypen (C3, T3, T5) bei dieser Einteilung war von der Länge des untersuchten Inserts abhängig. Nachfolgend ist nochmals die Reihenfolge aufgeführt (vgl. auch 3.5):

127/74-Insert: C3 > T5 > T3

127/DanPri-Insert: T5 > T3 > C3

Hierbei fiel auf, daß die Aktivität von T5 jeweils höher als die Aktivität von T3 war. Bei den 127/74-Fragmenten wies der C3-Typ eine höhere Aktivität auf als die beiden T-Typen, während sich dieses bei den 127/DanPri-Fragmenten genau umkehrte.

Unter Berücksichtigung, daß erstens die 127/74-Fragmente allesamt eine höhere Aktivität als die 127/DanPri-Fragmente aufwiesen und daß zweitens der Polymorphismus in Position -351 nach dieser Einteilung einen größeren Einfluß auf die Promotoraktivität als die Anzahl der Reiterationen zu haben schien, wurde auf die relative Aktivitätszunahme der 127/74-Fragmente in Relation zu den 127/DanPri-Fragmenten geachtet. Im Vergleich war der Aktivitätszuwachs des C-Subtyps größer als beim T-Subtyp. Während sich die Aktivität beim C-Subtyp diesbezüglich verdreifachte, verdoppelte sie sich bei den T-Subtypen. Das Ausmaß der Suppression der Transkription könnte durch weitere Polymorphismen, die bei dieser Einteilung unberücksichtigt blieben, bedingt sein. Diese könnten im untersuchten Promotorbereich des *pKi-67* Gens liegen. Hierfür kommen Position -518 und Position -49 oder weitere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Polymorphismen in Frage. Des weiteren zeigten sich bei den durchgeführten Sequenzierungen im 74/DanPri-Fragment Poly-

morphismen an drei verschiedenen Genloci sowie ein Basenverlust an zwei weiteren Genloci bei verschiedenen Tumortypen (vgl. 8.7). Durch jene Polymorphismen im 74/DanPri-Stück könnten verschiedene Varianten im Bereich des postulierten Silencers entstehen. Dies könnte wiederum zu verschiedenen DNA-Formationen führen, die eine unterschiedliche Affinität der DNA-bindenden Proteine bewirken und somit zu einem stärkeren Silencer im C-Subtyp führen.

4.2.4 Alternative Gruppeneinteilung

Auf Grundlage der ermittelten Aktivitätsquotienten erfolgte eine neue Einteilung in die Gruppen I-III und 1-3, wobei die Gruppen I-III die 127/DanPri-Fragmente und die Gruppen 1-3 die 127/74-Fragmente enthielten.

Klone mit exakt dem gleichen Genom hinsichtlich der vier Genloci wiesen eine unterschiedlich hohe Aktivität auf. So kam der Genotyp „1-2-2-1“ (AT5G) in vier Gruppen vor und hatte somit die höchste Streuung. Entsprechende Plasmide mit dem 127/DanPri-Insert fanden sich zweimal in Gruppe I und einmal in Gruppe III und Plasmide mit dem 127/74-Insert gehäuft in Gruppe 2 (dreimal) sowie in 1 (einmal). Dies ist als Hinweis zu werten, daß die Polymorphismen in Position -351 und insbesondere in Position -186 und -49 in Kombination mit weiteren, hier nicht untersuchten Polymorphismen einen vorrangigen Einfluß auf die Promotoraktivität ausüben. Die relevanten Polymorphismen könnten entweder im Bereich des untersuchten Genabschnittes (127/DanPri) oder an bisher nicht untersuchten Genloci liegen. Vergleiche der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen ergaben, daß hierfür mehrere Genloci in Frage kämen (vgl. 8.7). Ferner fiel auf, daß die Gruppen III und 1 in Position -518 und Position -351 mit der Kombination Adenin-Thymin (AT) übereinstimmen. Ergänzend kam für jede Gruppe eine weitere Übereinstimmung in Position -186 (Gruppe III) respektive in Position -49 (Gruppe 1) hinzu. Die Aktivität der erwähnten Genotypkombination wurde nur in Gruppe 3 mit Übereinstimmungen in Position -186 (3 Repetitionen) und -49 (Thymin) übertroffen. Das bedeutet, daß fünf Repetitionen nicht zwangsläufig eine höhere Aktivität als drei Repetitionen bedingen. Es scheint hierbei relevant, ob drei oder fünf Repetitionen bei Position -186 mit einem bestimmten Polymorphismus in Position -49 kombiniert sind. Wurden neben den experimentell nachgewiesenen Promotoraktivitäten die rechnerisch ermittelten Promotoraktivitäten der fehlenden Genotypen mit einbezogen, so änderte sich die Rangfolge der Promotoraktivitäten: Der Tumor mit der Genotypkombination „AT5T“ würde bei den

127/74-Fragmenten die höchste Aktivität haben, gefolgt von den Genotypen „GT3G“ und „AT3T“ mit nahezu gleichhoher Aktivität. Die niedrigste Aktivität wurde theoretisch beim Genotyp „GC3G“ erwartet. Bei den 127/DanPri-Fragmenten wiesen die durchschnittlich höchste Aktivität Tumoren mit der Kombination „AT5T“ gefolgt vom Genotyp „AT3T“ auf. Durchschnittlich niedrige Aktivitäten fanden sich bei den Genotypen „GC3G“, „AT3G“ und „AT5G“. Aufgrund dieses Ergebnisses kann die von Duchrow et al. (2002) beschriebene Korrelation zwischen bestimmten Genotypen und einer schlechteren Prognose nicht durch eine höhere Promotoraktivität im Sinne der eingangs formulierten Hypothese bestätigt werden. Anhand der in dieser Arbeit ermittelten Promotoraktivitäten und in Zusammenschau mit der Funktion von pKi-67 nach derzeitigem Wissensstand würde man die schlechteste Prognose hinsichtlich der Überlebenszeit bei Patienten erwarten, deren kolorektales Adenokarzinome die Genotypkombination „AT5T“ aufweisen. Ferner müßte sich demzufolge die Genotypkombination „GC3G“ prognostisch eher günstig auswirken.

4.2.5 Revidierte Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier

Aufgrund einer inzwischen längeren Nachbeobachtungszeit der Patienten aus der Studie von Duchrow et al. (2002) sowie zwischenzeitlich durchgeführten Korrekturen kommt es zu einer Änderung der einzelnen Überlebenszeiten in der Kaplan-Meier-Darstellung (persönliche Mitteilung Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Duchrow). Nachfolgend ist das kumulative Überleben abhängig von der Nachbeobachtungszeit und getrennt nach Promotoraktivität dargestellt (vgl. Abbildung 10). Die Promotoraktivität der entsprechenden Tumoren wurde auf Grundlage der in dieser Arbeit ermittelten Promotoraktivität und den daraus resultierenden Konstanten fiktiv berechnet. Es erfolgte hiernach die Gruppenzuordnung: Hohe Promotoraktivität $\hat{=}$ Promotoraktivität > 32 RLU; niedrige Promotoraktivität $\hat{=}$ Promotoraktivität ≤ 32 RLU. Die Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier wurde mir freundlicherweise von Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Duchrow zur Verfügung gestellt.

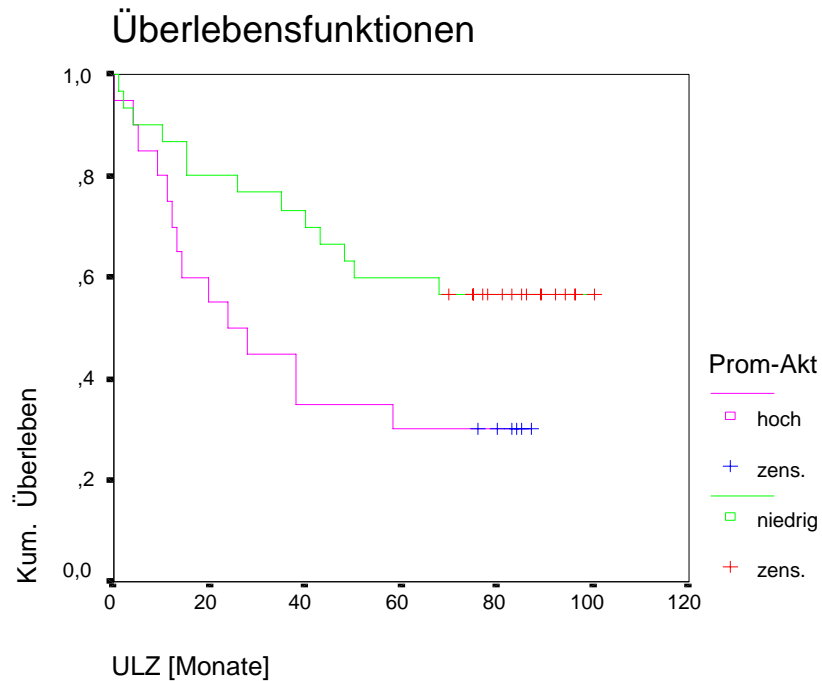


Abbildung 10: Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier von Patienten mit kolorektalem Adenokarzinom : hohe Promotoraktivität (>32RLU) versus niedriger Promotoraktivität (≤ 32 RLU); ULZ: Überlebenszeit in Monaten; Prom-Akt: *pKi-67* Promotoraktivität

Es fand sich hier eine signifikant unterschiedliche Überlebenszeit ($p < 0,05$) von Tumoren mit hoher Promotoraktivität zu Tumoren mit niedriger Promotoraktivität. Ein Vergleich der Promotoraktivitäten der einzelnen Genotypen (vgl. 3.5.3) mit den entsprechenden revidierten Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier zeigte, daß die höchste Promotoraktivität der Genotypen „AT5T“ mit der schlechtesten Prognose verknüpft war. Auch für den Genotyp „AT3T“ konnte eine direkte Korrelation mit der Überlebenszeit der Patienten nachgewiesen werden (Kaplan-Meier-Überlebensfunktionen nicht dargestellt; persönliche Mitteilung Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Duchrow).

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse sind sicher kritisch zu betrachten, da die dieser Arbeit zugrundeliegende, von Duchrow et al. (2002) beschriebene Korrelation zwischen den Polymorphismenkombinationen bezüglich der vier Genloci und der Überlebensrate anhand eines relativ kleinen Kollektivs von 50 kolorektalen Adenokarzinom-Patienten gewonnen wurde. Anhand der revidierten Kaplan-Meier-Überlebensfunktionen konnte eine direkte Korrelation zwischen der Promotoraktivität der Genotypen „T5T“ und „T3T“ und dem Überleben der Patienten hergestellt werden. Eine hohe Promotoraktivität ist demnach mit

einer höheren Sterblichkeit korreliert. Ferner konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß neben den Polymorphismen an den vier untersuchten Genloci weitere Polymorphismen die Promotoraktivität des *pKi-67* Gens beeinflussen. Inwieweit die in Kapitel 8.7 aufgeführten Polymorphismen gerade hinsichtlich der Hybridisierung mit potentiellen Transkriptionsfaktoren (vgl. 8.6) eine Rolle spielen, bleibt zukünftigen Studien auf diesem Gebiet überlassen. Des weiteren könnte untersucht werden, inwieweit die Transkriptionsfaktoren über die potentiellen Bindungsstellen im Bereich der untersuchten Polymorphismen an der Regulation der Promotoraktivität beteiligt sind und in welchem Ausmaß sie mit eventuellen Polymorphismen im postulierten Silencer interagieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

pKi-67 ist ein Nichthiston-Kern-Protein, das ausschließlich zellzyklusabhängig in proliferierenden Zellen immunhistochemisch mittels des Ki-67 Antikörpers nachweisbar ist. Letzterer ist in der onkologischen Diagnostik ein gut etablierter Proliferationsmarker. Bisher konnte in der Literatur nicht eindeutig eine Korrelation zwischen klinisch-pathologisch-prognostischen Parametern und dem Ki-67 Markierungsindex nachgewiesen werden. Gründe hierfür mögen in einer unterschiedlichen Aktivität der *pKi-67* Promotortypen liegen. Ziel dieser Arbeit war es, die von Duchrow et al. (2002) beschriebenen, prognoserelevanten Polymorphismen an den vier Genloci -518, -351, -186 und -49 des *pKi-67* Promotors, die aus kolorektalen Adenokarzinomen isoliert worden waren, durch Aktivitätsuntersuchungen zu charakterisieren. Hierzu wurden jeweils zwei verschieden große Promotorfragmente (127/DanPri und 127/74) der verschiedenen Genotypen mittels PCR amplifiziert und in Luciferase-Reportergenplasmide in sense- und antisense-Orientierung kloniert. Die Plasmide in antisense-Orientierung dienten als Kontrolle. Jeweils zusammen mit einem internen Kontrollplasmid (pRL-TK) wurden die Reporterplasmide in HeLa-Zellen mittels Elektroporation cotransfiziert. Als externe Positivkontrolle wurden pGL3-Control sowie plasmidfreie Ansätze (NTC) als externe Negativkontrollen mitgeführt. Die durch Biolumineszenzmessung ermittelten und auf die internen Kontrollen normierten Aktivitätsquotienten zeigten, daß die kürzeren Promotorfragmente (127/74) allesamt eine höhere Aktivität aufweisen als die längeren (127/DanPri). Aus diesen Ergebnissen kann postuliert werden, daß ein Silencer zwischen Position +479 und +754 bezüglich des Transkriptionsstarts (d.h. im 74/DanPri-Fragment) eine Bindungsstelle hat. Hierfür kommt NRSE (+) in Position +630/+650 in Betracht. Gemäß der Einteilung von Duchrow et al. (2002) wurde beim C-Subtyp (am Genlocus -351) die Aktivität auf zirka ein Drittel gemindert und die Transkriptionsrate entsprechend supprimiert, während bei den T-Subtypen (-351) eine Aktivitätsabnahme auf die Hälfte zu beobachten war. Bei den 127/DanPri-Promotorfragmenten wies der Genotyp T5 (Thymin an Position -351 und 5 Repetitionen bei -186) die höchste Aktivität auf, während es bei den 127/74-Promotorfragmenten der C3-Typ (Cytosin an Position -351 und 3 Repetitionen bei -186) war. Für eine alternative Gruppeneinteilung wurden die Promotorfragmente abhängig von der gemessenen Aktivität jeweils 3 Gruppen zugeordnet. Es zeigten sich bei den Fragmenten

mit einer hohen Aktivität Übereinstimmungen an den Genloci -186 und -49 (Gruppe 3; 127/74) bzw. bei Position -518, -351 und -186 (Gruppe III; 127/DanPri). Anhand des konstanten Verhältnisses der 127/74- zu den 127/DanPri-Fragmenten (2,411:1) erfolgte die Berechnung der fiktiven Promotoraktivitäten von Genotypen, die nicht in beiden Fragmentlängen vorlagen. Faßte man Tumoren, die bezüglich der vier Genloci genotypisch identisch waren, zusammen und mittelte die Promotoraktivität, so wies Genotyp „AT5T“ (Adenin bei -518, Thymin bei 351, 5 Repetitionen bei -186, Thymin bei -49) die höchste Aktivität auf - gefolgt von „AT3T“ (Adenin bei -518, Thymin bei -351, 3 Repetitionen bei -186, Thymin bei -49) und „GT3G“ (Guanin bei -518, Thymin bei -351, 3 Repetitionen bei -186, Guanin bei -49). Die durchschnittlich niedrigste Aktivität hat Genotyp „GC3G“ (Guanin bei -518, Cytosin bei -351, 3 Repetitionen bei -186, Guanin bei -49). Ein Vergleich mit der revidierten Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier zeigte eine Korrelation von Tumoren mit hoher Promotoraktivität mit einer schlechteren Prognose der Patienten. Eine niedrige Promotoraktivität korrelierte mit einer längeren Überlebenszeit der Patienten.

Im Bereich der vier Genloci der Polymorphismen liegen diverse potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Position -518 liegt innerhalb der potentiellen Erkennungssequenz des Transkriptionsregulators E47. Abhängig vom Polymorphismus ist eine Homologie der Konsensus-Sequenz mit der *pKi-67* Sequenz bis zu 100% möglich. Da die vollständige Übereinstimmung (GA) vornehmlich bei Tumoren mit hoher Promotoraktivität vorliegt, deutet dies auf einen wichtigen Einfluß von E47 bei der Regulation des *pKi-67* Promotors und somit auf die Prognose der Patienten hin. Ferner scheint gerade der Genlocus -186 aufgrund der sich überschneidenden putativen Bindungsstellen, insbesondere von CREB (-198/-187) und VMAF (-200/-182), hinsichtlich eines möglichen Konkurrenzverhaltens oder einer synergistischen Interaktion für die Transkriptionsrate von besonderem Interesse zu sein.

6 LITERATUR

1. **Anthony-Cahill SJ, Benfield PA, Fairman R, Wasserman ZR, Brenner SL, Stafford WF 3rd, Altenbach C, Hubbell WL, DeGrado WF (1992):** Molecular characterization of helix-loop-helix peptides.
Science 255, 979-983
2. **Bäuerle PA (1991):** The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits.
Biochim Biophys Acta 1072(1), 63-80
3. **Becker-Follmann J, Bohrmann J, Collatz CG (1995):** Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie.
1. Auflage, 306-307, Herder Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
4. **Berenzi A, Benetti A, Bertalot G, Rodolfi A, Portolani N, Giulini SM, Pulcini G, Vinco A, Tiberio G (1992):** Ki67 immunohistochemical evaluation in colorectal cancer and normal colonic mucosa. Possible clinical applications.
Pathologica 84, 155-163
5. **Benetti A, Berenzi A, Grigolato P (1992):** Growth fraction of colorectal carcinoma (Ki 67): a comparative study.
Int J Biol Markers 7, 93-96
6. **Bessis A, Champtiaux N, Chatelin L, Changeux JP (1997):** The neuron-restrictive silencer element: a dual enhancer/silencer crucial for patterned expression of a nicotinic receptor gene in the brain.
Proc Natl Acad Sci USA 94(11), 5906-5911
7. **Birnbaum MJ, van Wijnen AJ, Odgren PR, Last TJ, Suske G, Stein GS, Stein JL (1995):** Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3.
Biochemistry 34, 16503-16508
8. **Böcker W, Höfler H, Denk H, Heitz PU (1997):** Allgemeine Tumorpathologie.
In: Böcker W, Denk H, Heitz PU: Pathologie.
1. Auflage, 161-200, Urban & Schwarzenberg, München
9. **Braun N, Papadopoulos T, Müller-Hermelink HK (1988):** Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells.
Virchows Arch B Cell Pathol 56, 25-33
10. **Briggs MR, Kadonga JT, Bell SP, Tjian R (1986):** Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1.
Science 234, 47-52

11. **Brown DC und Gatter KC (1990):** Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology.
Histopathology 17, 489-503
12. **Brown DC und Gatter KC (2002):** Ki67 protein: the immaculate deception?
Histopathology 40(1), 2-11
13. **Bruno S und Darzynkiewicz Z (1992):** Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells.
Cell Prolif 25, 31-40
14. **Burke TW und Kadenga JT (1996):** *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box deficient promoters.
Genes Dev 10, 711-724
15. **Burke TW, Willy PJ, Kutach AK, Butler JEF, Kadonaga JT (1998).** The DPE, a conserved downstream core promoter element that is functionally analogous to the TATA-box.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 63, 75-82
16. **Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J (1992):** Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 2) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.
J Pathol 168(4), 357-363
17. **Cook T, Gebelein B, Urrutia R (1999):** Sp1 and its likes: biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factors.
Ann N Y Acad Sci 880, 94-102
18. **Courey AJ und Tjian R (1988):** Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif.
Cell 55, 887-898
19. **De Jong KP, Stellema R, Karrenbeld A, Koudstaal J, Gouw AS, Sluiter WJ, Peeters PM, Slooff MJ, De Vries EG (1998):** Clinical relevance of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, p53, and Ki-67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors.
Hepatology 28(4), 971-979
20. **Denning J, Beato M, Suske G (1996):** An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains.
EMBO J 15, 5659-5667
21. **Duchrow M, Gerdes J, Schlüter C (1994a):** The proliferation-associated Ki-67 protein: definition in molecular terms.
Cell Prolif 27(5), 235-242

22. **Duchrow M, Schlüter C, Gerdes J (1994b):** Molekularbiologische Charakterisierung des Proliferations-assoziierten Ki-67 Proteins.
Focus MUL 11, 219-225
23. **Duchrow M, Schlüter C, Key G, Kubbutat MH, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J (1995):** Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins.
Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 43(2), 117-121
24. **Duchrow M, Schlüter C, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J (1996):** Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67.
Cell Prolif 29(1), 1-12
25. **Duchrow M, Häsemeyer S, Broll R, Bruch HP, Windhövel U (2001a):** Assessment of proliferative activity in colorectal carcinomas by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).
Cancer Investigation 19(6), 596-604
26. **Duchrow M, Schmidt MHH, Zingler M, Anemüller S, Bruch HP, Broll R (2001b):** Suppression of cell division by pKi-67 antisense-RNA and recombinant protein.
Cell Physiol Biochem 11, 331-338
27. **Duchrow M, Maaser D, Bruch HP, Broll R (2002):** Polymorphism of the proliferation marker pKi-67 in colorectal carcinoma.
Langenbeck's Arch Surg 387, 259
28. **du Manoir S, Guiland P, Camus E, Seigneurin D, Br-gal G (1991):** Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways.
Cytometry 12, 455-463
29. **Dynan WS und Tjian R (1985):** Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins.
Nature 316, 774-778
30. **Dyer BW, Ferrer FA, Klinedinst DK, Rodriguez R (2000):** A noncommercial dual luciferase enzyme assay for reporter gene analysis.
Anal Biochem 282(1), 158-161
31. **Endl E und Gerdes J (2000a):** Posttranslational modifications of the KI-67 protein coincide with two major checkpoints during miosis.
J Cell Physiol 182(3), 371-380
32. **Endl E und Gerdes J (2000b):** The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function.
Exp Cell Res 257(2), 231-237

33. **Faisst S und Meyer S (1992):** Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res* 20(1), 3-26
34. **Farr A, Roman A (1991):** A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency. *Nucleic Acids Research* 20, 920
35. **Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schlüter C (1991):** Assignment of the human Ki-67 gene (MKI67) to 10q25-qter. *Genomics* 11, 476-477
36. **Fontana D, Bellina M, Gubetta L, Fasolis G, Rolle L, Scoffone C, Porpiglia F, Colombo M, Tarabuzzi R, Leonardo E (1992):** Monoclonal antibody Ki-67 in the study of the proliferative activity of bladder carcinoma. *Journal of Urology* 148, 1149-1151
37. **Gajiwala KS und Burley SK (2000):** Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10(1), 110-116
38. **Gaubatz S, Imhof A, Dosch R, Werner O, Mitchell P, Buettner R, Eilers M (1995):** Transcriptional activation by Myc is under negative control by transcription factor AP-2. *EMBO J* 14(7), 1508-1519
39. **Gerdes J (1990a):** Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Sem Cancer Biol* 1(3), 199-206
40. **Gerdes J (1990b):** Ki-67 und andere immunohistologisch einsetzbare Proliferationsmarker. *Focus MUL* 7(3), 180-186
41. **Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983):** Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31, 13-20
42. **Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984):** Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology* 133(4), 1710-1715
43. **Gerdes J, Li L, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD (1991):** Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138, 867-873

44. **Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G (1992):** Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 168(1), 85-87
45. **Grosschedl R, Birnstiel ML (1980):** Identification of regulatory sequences in the prelude sequences of an H2A histone gene by the study of specific deletion mutants in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(3), 1432-1436
46. **Guillaud P, du Manoir S, Seigneurin D (1989):** Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal fibroplastic (MRC-5) and mammary tumour cell lines (MCF-7). *Anal Cell Pathol* 1, 25-39
47. **Hai T und Hartman MG (2001):** The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273, 1-11
48. **Hapgood JP, Riedemann J, Scherer SD (2001):** Regulation of gene expression by GC-rich DNA cis-elements. *Cell Biol Int* 25(1), 17-31
49. **Hartwell LH, Kastan MB (1994):** Cell cycle control and cancer. *Science* 266, 1821-1828
50. **Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R (2000):** Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 260, 1-12
51. **Hitchcock CL (1991):** Ki67 staining as a means to simplify analysis of tumor cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 96, 444-446
52. **Hoang C, Polivka M, Valleur P, Hauteville P, Nemeth J, Galian A (1989):** Immunohistochemical detection of proliferating cells in colorectal carcinomas and adenomas with monoclonal antibody Ki-67. *Virchows Arch. A Pathol Anat Histopathol* 414, 423-428
53. **Hsu HL, Huang L, Tsan JT, Funk W, Wright WE, Hu JS, Kingston RE, Baer R (1994):** Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* 14, 1256-1265

54. **Hurst HC, Masson N, Jones NC, Lee KA (1990):** The cellular transcription factor CREB corresponds to activating transcription factor 47 (ATF-47) and forms complexes with a group of polypeptides related to ATF-43.
Mol Cell Biol 10(8), 6192-6203
55. **Jankowski JM und Dixon GH (1987):** The GC Box as a silencer.
Bioscience Reports 7(12), 955-963
56. **Jansson A und Sun XF (1997):** Ki-67 expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinomas.
Apmis 105(9), 730-734
57. **Javahery R, Khachi A, Lo K, Zenzie-Gegory B, Smales S (1994):** DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells.
Mol Cell Biol 14(1), 116-127
58. **Jernvall P, Mäkinen MJ, Karttunen TJ, Mäkelä J, Vihko P (1999):** Morphological and genetic abnormalities in prediction of recurrence in radically operated colorectal cancer.
Anticancer Research (Athens) 19(2B), 1357-1362
59. **Kageyama R, Merlino GT, Pastan I (1988):** Epidermal growth factor (EGF) receptor gene transcription. Requirement for Sp1 and an EGF receptor-specific factor.
J Biol Chem 263(13), 6329-36
60. **Kaplan KP und Meier P (1958):** Nonparametric estimation from incomplete observations.
J Am Stat Assoc 53, 457-481
61. **Kataoka K, Noda M, Nishizawa M (1994):** Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun.
Mol Cell Biol 14, 700-712
62. **Kaufmann J, Verrijzer CP, Shao J, Smale ST (1996):** CIF, an essential cofactor for TFIID-dependent initiator function.
Genes Dev 10(7), 873-886
63. **Kawate S, Fukusato T, Ohwada S, Watanuki A, Morishita Y (1999):** Amplification of c-myc in hepatocellular carcinoma: correlation with clinicopathologic features, proliferative activity and p53 overexpression.
Oncology 57(2), 157-63
64. **Key G, Becker MHG, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD, Gerdes J (1993):** New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 bases pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope.
Lab Invest 68(6), 629-636

65. **Kreitz S, Fackelmayer FO, Gerdes J, Knippers R (2000):** The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin.
Exp Cell Res 261(1), 284-292
66. **Kubbutat MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD, Gerdes J (1994):** Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein).
J Clin Pathol 47(6), 524-528
67. **Kubota Y, Petras RE, Easley KA, Bauer TW, Tubbs RR, Fazio VW (1992):** Ki-67-determined growth fraction versus standard staging and grading parameters in colorectal carcinoma.
Cancer 70, 2602-2609
68. **Kyzer S, Gordon PH (1997):** Determination of proliferative activity in colorectal carcinoma using monoclonal antibody Ki67.
Dis Colon Rectum 40, 322-325
69. **Labbe S, Prevost J, Remondelli P, Leone A, Seguin C (1991):** A nuclear factor binds to the metal regulatory elements of the mouse gene encoding metallothionein-I.
Nucleic Acids Research 19(15), 4225-4231
70. **Lanza G Jr, Cavazzini L, Borghi L, Ferretti S, Buccoliero F, Rubbini M (1990):** Immunohistochemical assessment of growth fractions in colorectal adenocarcinomas with monoclonal antibody Ki-67. Relation to clinical and pathologic variables.
Patho Res Pract 186, 608-618
71. **Littleton RJ, Baker GM, Soomro IN, Adams RL, Whimster WF (1991):** Kinetic aspects of Ki-67 antigen in a normal cell line.
Virchows Arch B Cell Pathol 60, 15-19
72. **Locker AP, Birrell K, Bell JA, Nicholson RI, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO (1992):** Ki67 immunoreactivity in breast carcinoma: relationship to prognostic variables and short term survival.
Eur J Surg Oncol 18, 224-229
73. **MacCallum DE und Hall PA (1999):** Biochemical characterization of pKi67 with the identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding.
Exp Cell Restriktionsendonuklease 252, 186-198
74. **Martin ME, Piette J, Yaniv M, Tang WJ, Folk WR (1988):** Activation of the polyomavirus enhancer by a murine activator protein 1 (AP1) homolog and two contiguous proteins.
Proc Natl Acad Sci USA 85(16), 5839-5843

75. **Martin CS, Wight PA, Dobretsova A, Bronstein I (1996):** Dual luminescence-based reporter gene assay for luciferase and β -galactosidase. *BioTechniques* 21, 520-524
76. **McCormick D, Yu C, Hobbs C, Hall PA (1993):** The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation- associated antigens. *Histopathology* 22, 543-547
77. **Mori N, Schoenherr C, Vandenberg DJ, Anderson DJ (1992):** A common silencer element in the SCG10 and type II Na⁺ channel genes binds a factor present in nonneuronal cells but not in neuronal cells. *Neuron* 9(1), 45-54
78. **Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D (1989):** Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544
79. **Nordheim A:** Genregulation bei Eukaryoten.
In: Seyffert W, Gassen HG, Hess O, Jäckle H, Fischbach KF: Lehrbuch der Genetik. 1. Auflage 199-217, Gustav Fischer, Stuttgart, 1998
80. **Öfner D, Grothaus A, Riedmann B, Larcher P, Maier H, Bankfalvi A, Schmid KW (1996):** MIB 1 in colorectal carcinomas: its evaluation by three different methods reveals lack of prognostic significance. *Anal Cell Pathol* 12, 61-70
81. **Ogbourne S und Antalis TM (1998):** Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J* 331 (Pt 1), 1-14
82. **Palmqvist R, Sellberg P, Oberg A, Tavelin B, Rutegard JN, Stenling R (1999):** Low tumour cell proliferation at the invasive margin is associated with a poor prognosis in Dukes' stage B colorectal cancers. *Br J Cancer* 79(3-4), 577-581
83. **Pardy K (1994):** Reporter enzymes for the study of promoter activity. *Mol Biotechnol* 2(1), 23-27
84. **Piao YS, Peltoketo H, Vihko P, Vihko R (1997):** The proximal promoter region of the gene encoding human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 contains GATA, AP-2, and Sp1 response elements: analysis of promoter function in choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 138(8), 3417-3425

85. **Porschen R, Lohe B, Hengels KJ, Borchard F (1989):** Assessment of cell proliferation in colorectal carcinomas using the monoclonal antibody Ki-67.
Cancer 64, 2501-2505
86. **Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B Hengels KJ, Borchard F (1991):** Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining.
Int J Cancer 47, 686-691
87. **Rabbitts TH (1991):** Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias.
Cell 67, 641-644
88. **Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986):** Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis.
Science 234, 364-368
89. **Sahin AA, Ro JY, Brown RW (1994):** Assessment of Ki67 derived tumor proliferative activity in colorectal adenocarcinomas.
Mod Pathol 7, 17-22
90. **Saleh HA, Jackson H, Khatib G, Banerjee M (1999):** Correlation of bcl-2 oncoprotein immunohistochemical expression with proliferation index and histopathologic parameters in colorectal neoplasia.
Pathol Oncol Res 5(4), 273-279
91. **Sanger F, Coulson AR (1975):** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.
J Mol Biol 94, 441-448
92. **Santoro C, Mermod N, Andrews PC, Tjian R (1988):** A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs.
Nature (London) 334, 218-224
93. **Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG (2001):** WT1 proteins: functions in growth and differentiation.
Gene 273, 141-161
94. **Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad HD, Gerdes J (1993):** The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins.
J Cell Biol 123, 513-522

95. **Schmidt MHH, Broll R, Bruch HP, Duchrow M (2002):** Proliferation marker pKi67 affects the cell cycle in a selfregulated manner.
J Cell Biochem 87, 334-341
96. **Schmidt MHH, Broll R, Bruch HP, Bögler O, Duchrow M (2003):** The proliferation marker pKi67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on ran and cyclin B.
J Pathol 199, 18-27
97. **Scholzen T und Gerdes J (2000):** The Ki-67 protein: from the known to the unknown.
J Cell Physiol 182(3), 311-322
98. **Schwarting R (1993):** Little missed markers and Ki-67.
Lab Invest 68, 597-599
99. **Shepherd NA, Richman PJ, England J (1988):** Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations.
J Pathol 155, 213-219
100. **Smale ST (1997):** Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes.
Biochim Biophys Acta 1351(1-2), 73-88
101. **Smale ST und Baltimore D (1989):** The “initiator“ as a transcription control element.
Cell 57, 103-113
102. **Smale ST, Schmidt MC, Berk AJ, Baltimore D (1990):** Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirements for mammalian transcription factor IID.
Proc Natl Acad Sci USA 87(12), 4509-4513
103. **Sobin L und Wittekind C (1997):** TNM-Classification of Malignant Tumours.
5. Auflage, Wiley-Liss, New York Chichester Weinheim Brisbane Singapore Toronto
104. **Stables J, Scott S, Brown S, Roelant C, Burns D, Lee MG, Rees S (1999):**
Development of a dual glow-signal firefly and *Renilla* luciferase assay reagent for the analysis of G-protein coupled receptor signalling.
J Recept Signal Transduct Res 19(1-4), 395-410
105. **Sugai T, Nakamura SI, Habano W, Uesugi N, Sato H, Yoshida T, Orii S (1999):**
Usefulness of proliferative activity, DNA ploidy pattern and p53 products as diagnostic adjuncts in colorectal adenomas and intramucosal carcinomas.
Pathol Int 49(7), 617-625

106. **Suske G (1999):** The Sp-family of transcription factors.
Gene 238, 291-300
107. **Suzuki H, Matsumoto K, Terabe M (1992):** Ki67 antibody labeling index in colorectal carcinoma.
J Clin Gastroenterology 15, 317-320
108. **Tungekar MF, Gatter KC, Dunnill MS, Mason DY (1991):** Ki-67 immunostaining and survival in operable lung cancer.
Histopathology 19, 545-550
109. **Ueda T, Aozasa K, Tsujimoto M (1989):** Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas.
Cancer 63, 1607-1611
110. **van Dierendonck JH, Keijzer R, van de Velde CJH Cornelisse CJ (1989):** Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: Comparison with growth fraction in human breast cancer cells.
Cancer Res 49(4), 2999-3006
111. **van Oijen MGCT, Medema RH, Slootweg PJ, Rijksen G (1998):** Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells.
Am J Clin Pathol 110, 24-31
112. **van der Poell HG, McCadden J, Verhaegh GW, Kruszewski M, Ferrer F, Schalken JA, Carducci M, Rodriguez R (2001):** A novel method for the determination of basal gene expression of tissue-specific promoters: an analysis of prostate-specific promoters.
Cancer Gene Therapy 8(12), 927-935
113. **Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, van Driel R, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC (1989):** Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase.
J Cell Sci 92, 123-130
114. **Wang ZY, Qiu QQ, Huang J, Gurrieri M, Deuel TF (1995):** Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways.
Oncogene 10, 415-422
115. **Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Mönting J, Hellerich U, von Kleist S (1991):** Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis.
Cancer 67, 421-428

7 ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Aufl.	Auflage
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ccw	counterclockwise (gegen den Uhrzeigersinn; nach links)
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CREB	cAMP-response-element-binding-protein
cw	clockwise (im Uhrzeigersinn)
d.b.	das bedeutet
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethanol
d.h.	das heißt
DLR	Dual-Luciferase Reporter Assay
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynucleosidtriphosphate
E	Einheiten

E. coli	Escherichia coli
EMBL	European Molecular Biology Laboratories
et al.	et alteres / altera
F	Farad
Fa.	Firma
Fr.	Frau
g	Gramm
G	Guanin
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GTF	generelle Transkriptionsfaktoren
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LAR II	Luciferase Assay Reagent II
LI	Labeling Index
M	Molar
m	Milli
mA	Milliampere
min	Minute
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MTA	Medizinisch-technische(r) Assistent(in)
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NRE	negative regulatory elements
NRSE	neural-restrictive-silencer-element
OD	optische Dichte

od.	oder
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion / Polymerase chain reaction
pH	potentia Hydrogenium
PLB	Passive Lysis Buffer
pmol	picomol
präp.	präperativ
resp.	respektive
rpm	Rotations per minute
®	registrierter Warenname
RLU	relavtive Luciferaseeinheiten (relative luciferase units)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
S&G	Stop & Glo
s.o.	siehe oben
T	Thymin
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Trade mark, geschütztes Warenzeichen
TNM	Tumor, Nodulus, Metastase
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminoethan
U	Units = Einheiten
u.a.	unter anderem
ü.N.	Über Nacht
UICC	Union internationalis contra cancrum; Union internationale contre le cancer
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche

Vol.	Volumenanteil
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
Z	Zellen
z.B.	zum Beispiel

griechische Buchstaben

α	Alpha
β	Beta
Δ	Delta
κ	Lambda - physik. Zeichen für die Wellenlänge
μ	Mü
Φ	Phi

8 ANHANG

8.1 Nährmedien, Kulturmedien und Lösungen

8.1.1 Nährmedien / Kulturmedien

LB-Medium	10 g Bacto-tryptone; 5 g Bacto-yeast extract; 5 g NaCl; ad 1 l aqua dest.; pH 7,5
supplementiertes Dulbeccos Eagle Medium	450 ml DMEM; 5 ml L-Glutamin (1%); 5 ml Pencillin-Streptomycin (50µg/ml); 5 ml Glucose (100x für DMEM); 3 ml Heparin Buffer Solution 1M; 10% FKS (inaktiviert)
Agarplatten	LB-Medium; 1,5% (w/v) Agar; 25 mg/ml Ampicillin oder 25 mg/ml Kanamycin
YT-Medium	8 g Bacto-Tryptone; 5 g Bacto-yeast extract; 5 g NaCl; ad 1 l aqua dest.; pH 7,5
FKS (fötales Kälbermedium)	FKS von Gibco BRL/Berlin; hitzeinaktiviert bei 65°C über 45 min
Einfriermedium	10% FKS (v/v); 12% (v/v) DMSO (Sigma, USA); supplementiertes DMEM

8.1.2 Lösungen

Dephosphorylierungspuffer (10x) für alkalische Phosphatase	0,5 M Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,5 (20°C)
dNTP-Mix	20 mM von Pharmacia Biotech als DNA Polymerization Mix
Ligationspuffer für T4-DNA-Ligase (10x)	660 mM Tris-HCl; 50 mM MgCl ₂ ; 10 mM Dithioerythrit; 10 mM ATP; pH 7,5 (20°C)
One-Phor-All-Puffer PLUS	100 mM Trisacetat; 100 mM Magnesiumacetat; 500 mM Kaliumacetat von Amersham Pharmacia Biotech
P1-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A;
P2-Puffer	200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)
P3-Puffer	3,0 M Natriumacetat; pH 5,5
QBT-Puffer	750 mM NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15% Isopropanol (v/v); 0,15% Triton X-100 (v/v)
QC-Puffer	1,0 M NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15% Isopropanol (v/v)

QF-Puffer	1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl (pH 8,5); 15% Isopropanol (v/v)
PBS (Phosphat buffered saline):	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Pfu DNA Polymerase 10x Reaction Buffer	200 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25°C); 100 mM KCl; 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 20 mM MgSO ₄ ; 1% Triton X-100; 1 mg/ml nukleasefreie BSA
SuRE/Cut Puffer B	10 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM 2-Mercaptoethanol; pH 8,0
TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer):	40 mM Tris-Acetat; 2 mM EDTA; pH 8,5
TfbI	30 mM Kaliumacetat; 50 mM MgCl ₂ ; 100 mM KCl; 15% (v/v) Glycerin; mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt; steril filtriert
TfbII	10 mM MOPS/NaOH (pH 7); 75 mM CaCl; 10 mM KCl; 15% (v/v) Glycerin; steril filtriert
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0
Salt Solution	1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl ₂
Schwere Lösung:	TAE-Puffer mit 50 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 1 % (w/v) Xylencyanol

8.2 Oligodesoxynucleotiden (Primer) für die Sequenzierung

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>
M 13 Reverse	5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-AC-3'
M 13 Forward	5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-G-3'
GLprimer2 (ccw)	5'-CTA-GCA-AAA-TAG-GCT-GTC-CC 3'
RVprimer3 (cw)	5'-CTT-TAT-GTT-TTT-GGC-GTC-TTC-CA-3'

8.3 Chemikalien und Geräte

8.3.1 Enzyme und Chemikalien

Hind III aus Haemophilus influenzae Rd com-10, Roche

T4-DNA-Ligase aus E.coli NM 989 nach Murray, Boehringer Mannheim

Pfu-DNA-Polymerase aus Pyrococcus furiosus Vc1 DSM3638; c = 2-3 u/μl; Promega

alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, c = 10³ U/ml; Boehringer Mannheim

8.3.2 Geräte

Photometer Spectrophotometer DU 640,
Fa. Beckman, München

Fotodokumentationsanlage MWG Multi D,
Fa. MWG Biotech, Ebersberg

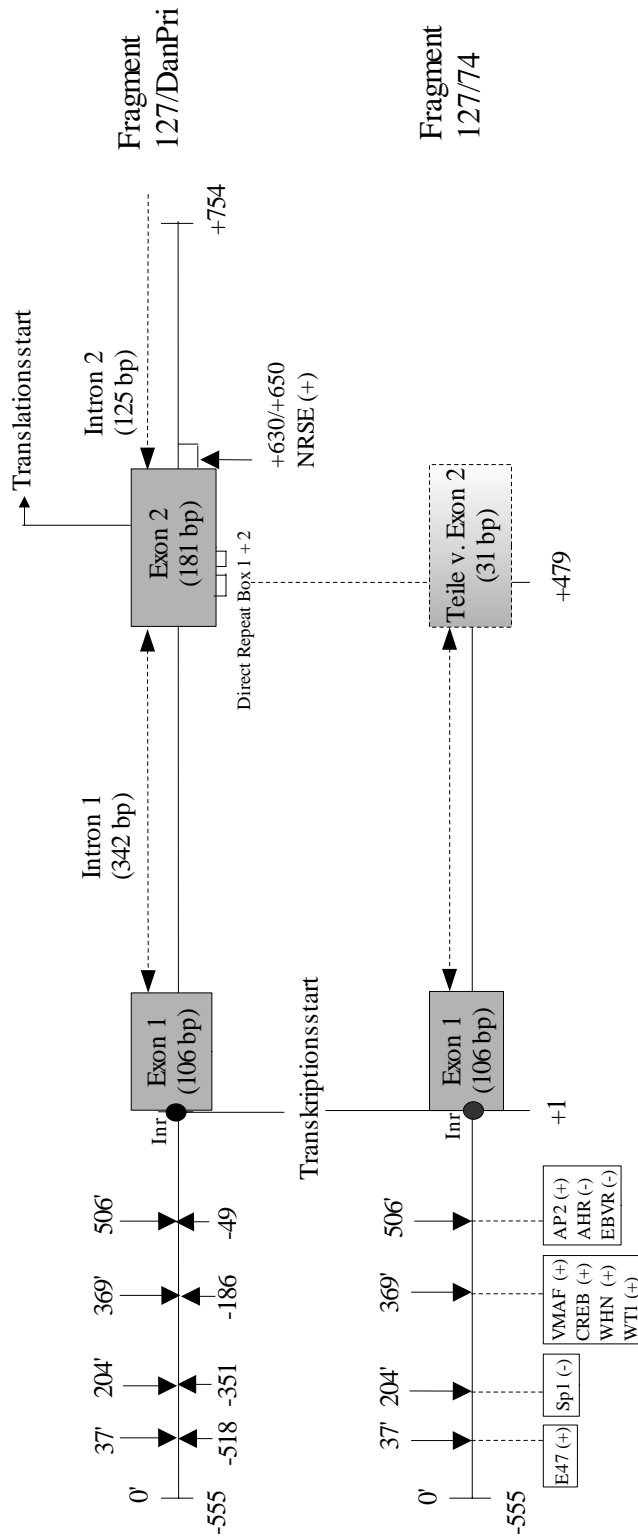
Sterile Werkbänke (Bench) Class II Type A/B3,
Fa. Naire, Plymouth, GB; (Fa. Zapf
Instrumente, Sarstedt)
BSB 4A, Fa. Gelaire Flow
Laboratories GmbH (ICN Biomedicals),
Meckenheim

Zentrifugen	Biofuge 22R, Fa. Heraeus, Hanau Megafuge 1.0R, Fa. Heraeus, Hanau Rotanta/TR, Fa. Hettich Zentrifugen
Agarose-Gelelektrophoresekammern	Fa. Labortechnik Fröbel GmbH, Wasserburg am Bodensee
Luminometer	LB 9507, Fa. EG&G Berthold, Bad Wildbad
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II und Capacitance Extender Plus, Fa. Bio-Rad, München
PCR-Gerät	Primus 96 Plus, Fa. MWG-Biotech
Thermomixer	Thermomixer compact, Fa. Eppendorf, Hamburg
Sequenziergerät (Sequencer)	DNA Sequencer Model 4000L, Fa. MWG-Biotech, Ebersberg
Brutschränke	Kelvitron T, Fa. Heraeus, Hannover CO ₂ -Auto-Zero, Fa. Heraeus, Hannover Heraeus 6000, Fa. Heraeus, Hannover
Schüttelwasserbad	GFL 1083

8.3.3 **Komplette Kits**

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
Dual-Luciferase Reporter Assay	Promega
NucleoSpin System	Machery-Nagel
Plasmid Purification Kit	Qiagen
Prep-A-Gene DNA Purification Kit	Bio-Rad
Zero Blunt TOPO Cloning Kit	Invitrogen
Thermosequenase Kit RPN 2438	Amersham Pharmacia

8.4 Graphische Darstellung des *pKi-67* Promotor



Zusammenfassende Darstellung des Aufbaus des bisher bekanntesten *pKi-67* Promotors: bei den beiden abgebildeten Fragmenten ist jeweils oberhalb die Position relativ zu „PIP 127“ und unterhalb die Position bzgl. des Transkriptionsstarts dargestellt. Die Boxen mit den potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren sind den entsprechenden Genloci zugeordnet. Zwischen Position +630 und +650 (bzgl. des Transkriptionsstarts) befindet sich eine potentielle Bindungsstelle für NRSE in (+)-Orientierung. Ferner sind die von Duchrow et al. (1996) beschriebenen, jeweils 24 Basenpaare umfassenden Direct Repeat Boxen 1 und 2 innerhalb des 2. Exons dargestellt.

8.5 *pKi-67* Sequenz

(EMBL-Datenbank Accession-Nr. X94762)

1' AATCT TCTGG CAATG AGTAA TGTTA TAGTG TCCCA GGTGT TTGGT CCTTT
E 47 (+)
**

51' AAGAA AAGGA TAGCA GGACG GGTTA TCTCG GTGGG AGCGT GTTCC ACCTC
 101' TGCCC TCCGC CAGCC GCCCT CGCCG GGGAT GCACC CAGGT ATTTT CCTCC
 151' GGATG CGTGA GTGGC TCGCC CGCGG ACACG CCAGC CCCGC CCCGC GAGCC

Sp1 (-)

201' CGGCT TCCCC GCCCC CTCCC CGCCC ACGCC CTGCG CTCCC TTCCT ATTGG
##

251' TCCCA TGCCG CGCTT TCCCG TTCAA TCGCA GCGCT TAGCG CCAGA ATTTG
 301' AATCT TCGTT TTCGT TTGAA TTGGG CGGGC GCGCC GGGCT GGAAG AAGGA

VMAF (+)

CREB (+)

WHN (+) WT 1 (+)

351' AGTGG AGGGC TGACG CTGCG GGCGG GCGGG AGGAC TCGAC TCGGT GGGAG
{ I I I }

401' CCGCT AGAGC CGGGC GCCCG GGGAC GTAGC CTGTA GGGCC ACCGG GTCCC

451' CGTCA GAGGC GGCGG CGGGA GCAGC GGGGA CTGCA GGCCG GGGTG CAGCG

EBVR (-)

AHR (-)

AP 2 (+)

501' AACGC TACCC CGCGG GCTGC GGCCC GGTGT GTGCG GAGCG TGGCG GGCGC
++

Inr

551' AGCTT ACCGG GCGGA GGTGA GCGCG GCGCC GGCTC CTCCT GCGGC GGA
 |→ TS ; Exon 1

601' TTGGG TGCGA CTTGA CGAGC GGTGG TTCGA CAAGT GGCCT TGCCG GCCGG
 651' ATCGT CCCAG GTGAG CTGCG GCCGG GACTC CTGGG AGCTG TCCGG GGTCG

Exon 1→|

```

701' AGGGC TGAGC CGCGG GGACC CCCCAG AGCTC TGC GG GACG GGCAG GGGAC
751' AGACG CGCGG CCTGG GCCCG ACTCC TCCTG GGCTC TGGCG AGGGC GTCTC
801' GGTGG AAGCT CCCAG GAGGC GCAGG CGCTG GCGAC AACAC CCCAG CTGCC
851' GGACT TTGGG GCGCC GGGGG CTGCG GTCGG ATCGT CCTGG GGTCC CCGCT
901' AGCTA GCTGC GGTGT GCGCT TCTGT GGCCG GGGAT AGGTG AATTG GGCAC
951' GGGGC CCTTC TTAGC TCCTT TGCTA TCAGA GTAAC TCGCA CCTCT TTTGC

                                     Direct Repeat Box 1
                                     ┌──────────────────────────────────┐
1001'AGTGG AAGAG TTGTA AATTT GCTTC TGGCC TTCCC CTACG GATTA TACCT
      |←Exon 2                               →|

      Direct Repeat Box 2
      ┌──────────────────────────────────┐
1051'GGCCT TCCCC TACGG ATTAT ACTCA ACTTA CTGTT TAGAA AATGT GGCCC
1101'ACGAG ACGCC TGGTT ACTAT CAAAA GGAGC GGGGT CGACG GTCCC CACTT
1151'TCCCC TGAGC CTCAG CACCT GCTTG TTTGG AAGGT GAGCC CCGCG GGCGC
                                     Exon 2 →|

1201 GCGCG GACGT TTTAG CTGAG AAAGA GGAAA ATACC TTAGT CACAG AATAA
1251 AGTCC AGAAA CGCGC TCTAG GATTG GTTCC TGCCG TCACT TTTCC TTGGT
1301 GCTTC TCC
      →|

```

Darstellung der untersuchten *pKi-67* Sequenz mit den Polymorphismen an den Genloci 37' (-518); 204' (-351); 369' (-186); 506' (-49) sowie den potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren:

Positionsangaben bezüglich PIP 127 (Position 1' ≙ Position -555 bezüglich Transkriptionsstart, Angabe in Klammern); die Grenzen der Exons, Introns und des Transkriptionsstart sowie die Genloci der Polymorphismen sind jeweils unterhalb der *pKi-67* Sequenz eingetragen; die Konsensus-Sequenzen der potentiellen Transkriptionsfaktoren sind oberhalb der *pki-67* Sequenz durch eine Klammer dargestellt.

Legende:

- ** : GA≙1; GG≙2
- ## : GC≙1; GT≙2
- { } : Anzahl der Repetitionen von (CGGG)
- ++ : GA≙1; TA≙2
- | : Ende 127/74-Fragment
- | : Ende 127/DanPri-Fragment
- |← Exon 1: Beginn des Exon 1
- | Exon 1: Ende des Exon 1
- |← Exon 2: Beginn des Exon 2
- | Exon 2: Ende des Exon 2
- TS: Transkriptionsstart
- Inr: Inr-Element

8.6 Potentielle DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren am *pKi-67* Promotorfragment

<i>Name</i>	<i>Position bzgl. PIP 127</i>	<i>Position bzgl. Transkriptionsstart</i>	<i>Orientierung</i>
HOX1-3	5-34	-550/-521	-
STAT	5-13	-550/-542	+
E47	29-44	-526/-511	+
GATA1	54-67	-501/-488	+
GATA1	69-82	-486/-473	-
WT1	79-91	-476/-464	+
AHRARNT	80-98	-475/-457	+
PAX5	83-110	-472/-445	-
PPARA	94-113	-461/-442	-
MTF-1	98-112	-457/-443	+
WT1	111-123	-444/-432	-
OLF1	114-135	-441/-420	-
NF-kappaB (p50)	125-134	-430/-421	+
AREB6	133-145	-422/-410	-
MTBF	137-145	-418/-410	+
NFAT	140-151	-415/-404	-
c-Ets.1(p54)	148-157	-407/-398	+
PAX8	151-163	-404/-392	-
NGFIC	153-164	-402/-391	+
NFY	156-169	-399/-386	-
CAAT	158-169	-397/-386	-
AP2	167-178	-388/-377	+
MUSCULE_INI	168-188	-387/-367	+
AHRARNT	174-189	-381/-366	-
GC	182-195	-373/-360	-
SP1	205-217	-350/-338	-
MZF1	206-213	-349/-342	-
WT1	208-220	-347/-335	-
SP1	216-228	-339/-327	-

<i>Name</i>	<i>Position bzgl. PIP 127</i>	<i>Position bzgl. Transkriptionsstart</i>	<i>Orientierung</i>
MZF1	217-224	-338/-331	-
EGR3	220-231	-335/-324	-
MYOGNF1	235-263	-320/-292	+
PU1	235-250	-320/-305	-
NFY	240-255	315/-300	-
VMYB	267-275	-288/-280	-
OCT1	293-307	-262/-248	-
HSF1	299-308	256/-247	+
STAT6	308-322	-247/-233	+
SP1	320-332	-235/-223	+
WT1	323-335	-232/-220	+
ETS1	345-359	-210/-196	+
VMAF	355-373	-200/-182	+
CREB	357-368	-198/-187	+
WHN	359-369	-196/-186	+
WT1	370-382	-185/-173	+
SP1	371-383	-184/-172	+
ZID	400-412	-155/-143	-
AP2	415-426	-140/-129	+
CREBP1	420-431	-135/-124	+
ATF	445-458	-110/-97	-
NGFIC	457-468	-98/-87	+
AP2	460-471	-95/-84	-
MZF1	473-480	-82/-75	+
ROAZ	483-498	-72/-57	-
MTF-1 (MRE)	486-500	-69/-55	-
AHR	498-515	-57/-40	-
EBVR	506-526	-49/-29	-
AP2	507-518	-48/-37	+
AHRARNT	530-545	-25/-10	+
ATF6	534-546	-21/-9	-
NGFIC	536-547	-19/-8	+
MTF-1 (MRE)	540-554	-15/-1	-

<i>Name</i>	<i>Position bzgl. PIP 127</i>	<i>Position bzgl. Transkriptionsstart</i>	<i>Orientierung</i>
SP1	556-568	+2/+14	+
EBVR	581-601	+27/+47	-
STAF	588-609	+34/+55	-
PAX3	606-618	+52/+64	-
USF	629-638	+75/+84	-
SF1	635-643	+81/+89	-
NF-kappaB	647-660	+93/+106	-
PAX3	652-664	+98/+110	+
AREB6	655-667	+101/+113	-
STAF	669-689	+115/+135	-
OLF1	671-692	+117/+138	-
ROAZ	675-690	+121/+136	-
NRSE	684-704	+130/+150	-
NRSE	703-723	+149/+169	+
MZF1	711-718	+157/+164	+
NFkappaB (p50)	714-723	+160/+169	+
MZF1	731-738	+177/+184	+
NRSE	748-768	+194/+214	+
WHN	749-759	+195/+205	+
CP2	785-795	+231/+241	-
EGR1	786-797	+232/+243	+
MUSCULE_INI	793-813	+239/+259	-
CREL	804-813	+250/+259	-
OLF1	804-825	+250/+271	+
EGR1	817-828	+263/+274	+
EBVR	836-856	+282/+302	-
MYF5	840-851	+286/+297	-
AP4	841-850	+287/+296	-
E2F	855-862	+301/+308	-
MZF1	893-900	+339/+346	-
PPARA	922-941	+368/+387	+
GATA1	928-941	+374/+387	+
AREB6	932-943	+378/+389	-

<i>Name</i>	<i>Position bzgl. PIP 127</i>	<i>Position bzgl. Transkriptionsstart</i>	<i>Orientierung</i>
OCT1	933-944	+379/+390	+
USF	946-955	+392/+401	+
GATA1	969-981	+415/+427	-
NRF2	1001-1010	+447/+456	+
TH1E47	1017-1032	+463/+478	+
EGR2	1032-1043	+478/+489	-
AREB6	1042-1054	+488/+500	+
EGR2	1056-1067	+502/+513	-
XFD2	1078-1091	+524/+537	-
mef2	1082-1091	+528/+537	-
USF	1098-1107	+544/+553	+
BARBIE	1119-1133	+565/+579	+
VDR_RXR	1142-1156	+588/+602	-
MZF1	1142-1149	+588/+595	-
BEL1	1144-1171	+590/+617	+
LMO2COM	1163-1174	+609/+620	-
NRSE	1184-1204	+630/+650	+
AP2	1188-1199	+634/+645	+
PU1	1220-1235	+666/+681	+
NFAT	1222-1233	+668/+679	+
NFkappaB	1224-1237	+670/+683	-
MTBF	1228-1236	+674/+682	-
AP1	1234-1244	+680/+690	-
AREB6	1255-1263	+701/+709	-
NFY	1266-1281	+712/+727	-
CREB	1279-1290	+725/+736	-
MYOGNF1	1284-1312	+730/+758	+
NRSF	1286-1306	+732/+752	-
NFAT	1288-1299	+734/+745	-

8.7 Weitere Polymorphismen im *pKi-67* Promotorfragment

<i>Position bzgl. EMBL- Datenbank</i>	<i>Position bzgl. PIP 127</i>	<i>Position bzgl. Transkrip- tionsstart</i>	<i>Polymorphis- men</i>	<i>Tumor-Typen</i>
4960	265'	-290	TTT	Ki-67 Seq.; Standard; 137; 144; 145; 154; 158; 160
			TTA	Standard; 144
4966	271'	-284	TTC	ki-67 Seq.; Standard; 137; 144; 145; 154; 158; 160
			TAC	Standard; 144; 154
5047	352'	-203	TGA	137; 158
			GGA	Ki-67 Seq.; Standard; 144; 145; 154; 158; 160
5165	470'	-85	1 Base Verlust	Standard; 137; 144; 145; 154; 158; 160
5217	522'	-33	CCCGGT	Ki-67 Seq.; 145; 154
			CCGGGT	Standard; 137; 144; 145; 158
			CCGGTT	154
5232	537'	-18	CGTT	Standard; 144; 145; 154; 158
			GCGT	Ki-67 Sequenz; 137; 160
5245	550'	-5	2 Basen Verlust	Standard; 145; 154; 158
5400	705'	+151	2 Basen Verlust	154
5429	734'	+180	GGGG	Ki-67 Seq.; Standard; 137; 144; 145; 154; 160
			GCGG	154
5754	1059'	+505	1 Base Verlust	Standard; 144
5751	1056'	+502	1 Base Verlust	137; 145; 154; 158; 160

<i>Position bzgl. EMBL- Datenbank</i>	<i>Position bzgl. PIP 127</i>	<i>Position bzgl. Transkrip- tionsstart</i>	<i>Polymorphis- men</i>	<i>Tumor-Typen</i>
5760	1065'	+511	TTT	154; 158
			ATT	Ki-67 Seq.; Standard; 137; 144; 145; 158
5952	1257'	+703	AAA	Ki-67 Seq.; Standard; 137; 144; 158; 160
			ATA	145; 154
5976	1281'	+727	TTC	Standard
			TGC	Ki-67 Seq.; 137; 144; 145; 154; 158; 160

8.8 Verwendete Tumorproben

<i>Tumor bank- Nr.</i>	<i>Geburts- datum</i>	<i>Sex</i>	<i>UICC-Stadium</i>	<i>Grading</i>	<i>Tod</i>	<i>ÜLZ (Monate)</i>
137	1930	m	R0 T1 N0 M0	2	0	90
144	1922	m	R2 T3 N2 M1	2	1	4
145	1913	w	R2 T3 N1 M1	2	1	26
154	1934	m	R0 T2 N0 M0	2	0	75
158	1938	w	R0 T3 N1 M0	2	0	86
160	1937	m	R2 T3 N2 M1	2	1	12

m: männlich; w: weiblich; Tod: 0 $\hat{=}$ lebt, 1 $\hat{=}$ verstorben; ÜLZ: Überlebenszeit in Monaten; UICC-Stadium nach Sobin und Wittekind (1997)

8.9 Meßergebnisse

<i>Plasmid</i>	<i>Relative Luciferase-Aktivität (Quotient $Q = M1/M2$)</i>	<i>arithmetischer Mittelwert von Q</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Anzahl der Messungen</i>
p8b-b8	22,35	30,4731	9,4969	5
	46,82			
	29,43			
	27,51			
	26,27			
8b-a4	6,24	4,0544	1,9230	3
	3,32			
	2,61			
p25.2A3	58,36	85,1160	22,7058	6
	93,27			
	118,35			
	97,19			
	81,47			
	62,06			
p25.2B2	2,01	3,4256	1,6441	5
	5,64			
	2,91			
	1,94			
	4,62			
p35.4B1	29,09	36,1577	9,2207	4
	33,43			
	32,41			
	49,71			
p35.4B6	3,29	6,4127	2,1995	4
	6,49			
	8,21			
	7,66			
p36.2B4	42,3	82,3848	26,7137	5
	99,88			
	103,44			
	67,39			
	98,91			
p36.4B11	2,94	3,6699	2,0148	4
	1,33			
	4,35			
	6,06			

<i>Plasmid</i>	<i>Relative Luciferase-Aktivität (Quotient $Q = M1/M2$)</i>	<i>arithmetischer Mittelwert von Q</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Anzahl der Messungen</i>
p48II9NLB3	70,68	52,2287	13,0583	5
	46,39			
	35			
	54,3			
	54,76			
p48II9B12	4,49	3,0981	1,2364	3
	2,14			
	2,66			
p49.3B1	63,23	41,0065	18,4078	4
	49,05			
	26,18			
	25,57			
p49.3B2	3,34	2,9729	0,3146	3
	2,77			
	2,81			
p50.3B6	48,45	26,7358	12,0445	6
	22,43			
	28,55			
	25,14			
	24			
	11,84			
p50.3B2	4,73	6,5456	2,7983	3
	9,77			
	5,14			
p51.1XB3	76,44	87,0136	10,7759	4
	97,23			
	95,32			
	79,07			
p51.1XB1	3,58	5,6947	1,9944	3
	5,95			
	7,55			
p52.1B1	68,86	83,5778	25,7378	5
	89,97			
	124,33			
	57,21			
	77,52			

<i>Plasmid</i>	<i>Relative Luciferase-Aktivität (Quotient $Q = M1/M2$)</i>	<i>arithmetischer Mittelwert von Q</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Anzahl der Messungen</i>
p52.1B2	6,54	5,7141	1,3587	4
	5,05			
	7,12			
	4,15			
p53.3B2	20,67	20,5477	5,0593	5
	27,07			
	23,58			
	17,06			
	14,35			
p53.3B6	4,1	3,7866	1,0794	3
	4,67			
	2,58			
p54.1XB6	57,58	81,0112	26,3739	3
	75,89			
	109,57			
p54.1XB4	5,18	4,2770	0,7913	3
	3,94			
	3,71			
p55.2B3	51,78	56,9561	20,6701	5
	33,95			
	87,52			
	66,15			
	45,38			
p55.2B6	3,23	3,6653	0,5062	4
	3,26			
	4,25			
	3,92			
p56.1N6B2	68,61	59,6597	8,4596	5
	50,1			
	51,13			
	64,31			
	64,15			
p56.1N6B1	2,35	4,5047	2,0570	3
	6,45			
	4,7			

<i>Plasmid</i>	<i>Relative Luciferase-Aktivität (Quotient $Q = M1/M2$)</i>	<i>arithmetischer Mittelwert von Q</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Anzahl der Messungen</i>
p31.1A11	5,23	4,2095	1,0113	4
	3,72			
	3,04			
	4,86			
p31.1A2	21,18	23,6269	2,1164	3
	24,83			
	24,87			
Control(/TK)	30,59	28,0036	5,7209	3
	21,45			
	31,97			
NTC	a	0,0137	0,0070	15

a: Auf die ausführliche Darstellung der einzelnen Meßwerte der NTC-Ansätze wurde verzichtet, da diese kein Plasmid enthielten und jeweils nur aus Kontrollgründen mitgeführt wurden.

8.10 Danksagung

Für die Überlassung des Themas und für das rege Interesse am Fortgang dieser Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Duchrow. Durch seine konstruktive Kritik sowie durch seine vielfältige Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Diskussionen hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. R. Broll für seine konstruktiven Vorschläge sowie für die hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. H.-P. Bruch für die freundliche Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Darüberhinaus möchte ich meinen Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Duchrow und Herrn D. Maaser aussprechen, die mir die gDNA-Proben mit den Polymorphismenkombinationen für die Aktivitätsmessungen zur Verfügung gestellt haben.

Des weiteren möchte ich mich herzlich bei Fr. E. Gheribi, Fr. V. Grobleben, Fr. R. Kaatz und allen Mitarbeitern des Chirurgischen Forschungslabors für die vielfältige Hilfe bedanken.

8.11 Lebenslauf

Name: Alexandra Wehrstedt
Geburtstag: 10.11.1975
Geburtsort: Gelsenkirchen
Wohnort: Landwehr 54
46514 Schermbeck

Schulbildung:

1982-1986 Gemeinschaftsgrundschule Schermbeck, Kreis Wesel
1986-1995 Gymnasium Petrinum Dorsten, Kreis Recklinghausen
06/1995 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1995-2002 Studium der Medizin an der Universität zu Lübeck
09/1997 Ärztliche Vorprüfung
08/1998 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruf:

02/2003-01/2004: Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der Klinik für Unfall-,
Hand- und Wiederherstellungschirurgie im Klinikum Leverkusen
seit 02/2004 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum und Assistenzärztin in der
Klinik für Neurochirurgie im Städtischen Klinikum Braunschweig
08/2004 Vollapprobation als Ärztin