

Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle)

## **Isolation und Charakterisierung des humanen Rac1-Pseudogens**

Matthias Christian Kugler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

### **Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt
2. Priv.-Doz. Dr. N. Harbeck
3. apl. Prof. Dr. Chr. Prinz

Die Dissertation wurde am 10.09.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.01.2003 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

	S.
<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1 Grundlagen der Krebsentstehung	4
1.2 Molekularbiologische Erkenntnisse beim Mammakarzinom	9
1.3 Signaltransduktionswege als Vermittler zwischen Zelloberfläche und Zellkern	10
1.4 Der MAPK-Signaltransduktionsweg	12
1.5 Die Familie der Ras- und Rho-GTPasen	14
1.6 Die Rho-GTPase Rac1	19
<b>2. Fragestellung</b>	<b>23</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>24</b>
3.1 Materialien	24
3.2 DNA-Analysen	26
3.3 RNA-Analysen	41
3.4 Proteinanalysen	44
3.5 Zellkultur	45
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>50</b>
4.1 Erschließung der DNA-Region in 5'-Richtung aus der proteinkodierenden Sequenz von Rac1	50
4.2 Das Sequenzierungsergebnis der PAC-Klone 5, 6 und 9	54
4.3 Nachweis der Existenz von Rac1-Gen und Rac1-Pseudogen auf genomischer DNA	57
4.4 Nachweis der Sequenz –4100 bis +579 bp auf humaner genomischer DNA	59
4.5 Analyse der 5'-Region des Rac1-Pseudogens	60
4.6 Klonierung der Rac1-Pseudogen Promotorfragmente –877 bp, –1299 bp, –2053 bp und –4074 bp in den Luziferase Reportergenvektor pGL3	65
4.7 Charakterisierung der Aktivität der Rac1-Pseudogenpromotor-Konstrukte	66
4.8 Ermittlung des Transkriptionsstartes für das Rac1-Gen	72
4.9 Vergleich der Rac1-Expression in Kolonkarzinomgewebe und normaler Kolonschleimhaut	74

---

<b>5. Diskussion</b>	<b>76</b>
5.1 Isolation und Charakterisierung von Rac1-Pseudogen und Rac1-Gen	77
5.2 Analyse der 5'-Region des Pseudogens - der Rac1-Pseudogenpromotor	82
5.3 Der Transkriptionsstart für das Rac1-Gen liegt bei -174 bp	86
5.4 Rac1 ist im Kolonkarzinom nicht überexprimiert	87
5.5 Ausblick	88
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>8. Verzeichnis der Abkürzungen und Einheiten</b>	<b>106</b>
8.1 Abkürzungen	106
8.2 Einheiten	108
8.3 Aminosäuren	108
<b>9. Danksagung</b>	<b>109</b>

---

# **1. Einleitung**

## **1.1 Grundlagen der Krebsentstehung**

Krebserkrankungen gehören heute zusammen mit den kardiovaskulären Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen der westlichen Welt. Die Diagnose ist für den Erkrankten von außerordentlicher Tragweite, da die Erkrankung in vielen Fällen nicht rechtzeitig erkannt wird, einen schwer vorhersagbaren Verlauf nimmt und trotz vielfältiger Therapieoptionen selten geheilt werden kann. Deshalb entwickelten sich verschiedene Forschungsrichtungen, um der Erkrankung Krebs näherzukommen. Die Ursachenforschung beinhaltet die Gebiete der Tumorbiologie, der Tumorimmunologie, der Tumorbiochemie sowie der allgemeinen Tumorätiologie und Epidemiologie. Die Erforschung der Grundprinzipien von Diagnostik und Therapie stellt die Verbindung zwischen Erkenntnissen der Ursachenforschung und der klinischen Behandlung von Krebs dar. Schließlich beschäftigt sich ein Forschungszweig mit der speziellen Diagnostik und Behandlung einzelner Tumorentitäten. Die Kombination und der Ausbau dieser Forschungsrichtungen sollen die Voraussetzungen für eine effizientere Bekämpfung der Erkrankung Krebs schaffen.

Die molekularbiologische Krebsforschung hat in den letzten Jahren eine umfangreiche Sammlung an Erkenntnissen hervorgebracht, in der sich einige, stetig wiederkehrende Grundprinzipien bei der Transformation einer normalen zu einer malignen Zelle erkennen lassen. Die dynamischen Veränderungen des genetischen Materials stellen die Grundlage für die maligne Transformation von Zellen dar. Durch die Abfolge irreversibler genetischer Veränderungen („Multi-Hit-Theorie“) (Kinzler and Vogelstein, 1996) wird das Gleichgewicht von Onkogenen, die die ungebremste Zellproliferation und malignes Zellverhalten stimulieren, und Tumorsuppressorgenen, die das Wachstum kontrollieren und programmierten Zelltod induzieren, zerstört und es kommt zur Entartung. Die Krebszellen entwickeln dabei Defekte in physiologischen Regelkreisen, die normales Wachstum und Proliferation im Zellverband steuern und in engen Grenzen im Gleichgewicht halten (Homöostase). Die mannigfaltigen beschriebenen Zelldefekte lassen sich in sechs Kategorien einteilen (Abb. 1), die in ihrem Zusammenwirken malignes Wachstum zur Folge haben und in den meisten malignen Tumoren vorkommen (Hanahan and Weinberg, 2000): (1) Eigenständigkeit in bezug auf wachstumsfördernde Signale, (2) Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, (3) Umgehung des programmierten Zelltods (Apoptose), (4) unbegrenzte Teilungsfähigkeit, (5) zeitlich unbegrenzte Angiogenese sowie (6) Invasion und Metastasierung. Jede dieser erworbenen Veränderungen verschafft der Zelle neue Fähigkeiten

und Vorteile, die zu ihrer Selektion gegenüber den normalen Zellen führen und ihr Überleben gegenüber den krebshemmenden Verteidigungsmechanismen sichert.

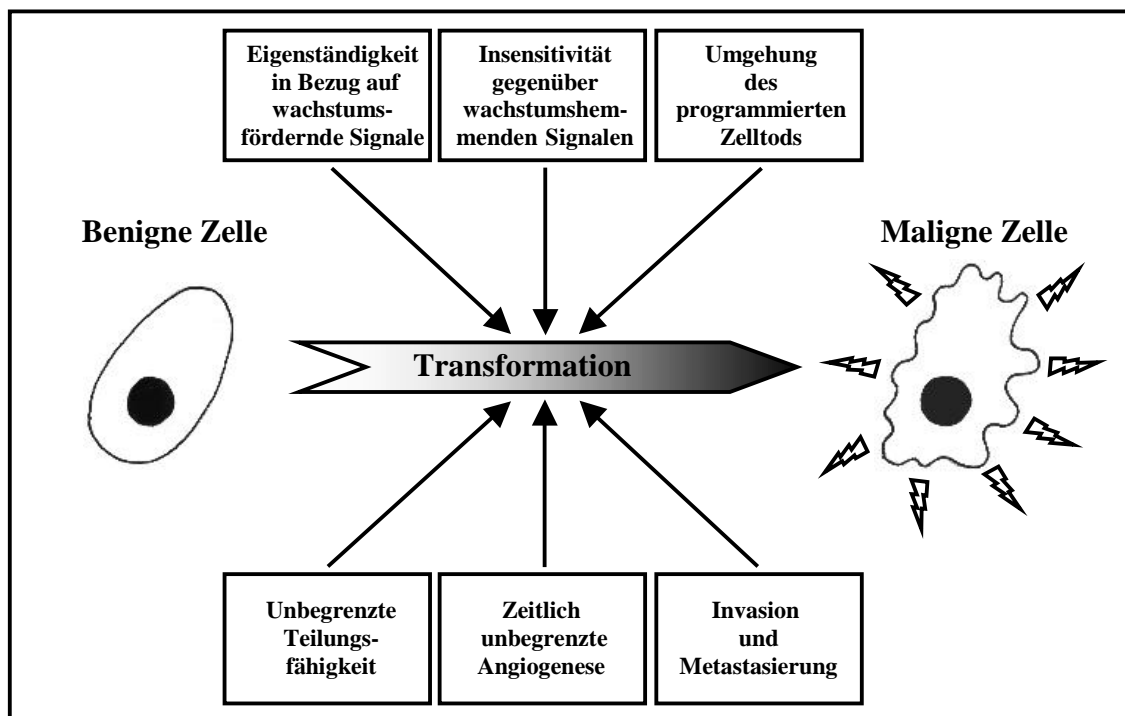


Abbildung 1: Schematische Darstellung der 6 Hauptfaktoren für die maligne Zelltransformation. (frei nach Hanahan *et al.*, 2000).

(1) Eigenständigkeit in bezug auf wachstumsfördernde Signale: Normale Zellen benötigen mitogene Wachstumssignale, um proliferieren zu können. Diese werden von anderen Zellen im Gewebeverband produziert und erreichen als exogene Faktoren die Rezeptoren der Zelle, um in ihr über intrazelluläre Wege der Signalvermittlung eine Reaktion hervorzurufen (parakrine Stimulation). Die Tumorzellen dagegen erreichen eine Unabhängigkeit, indem sie ihre Wachstumsfaktoren selbst produzieren, damit ihre eigenen Rezeptoren stimulieren (autokrine Stimulation) und verringern dadurch ihre Abhängigkeit von der Kontrolle im Gewebeverband (Fedi *et al.*, 1997). Weiterhin kann die Überexpression eines Rezeptors auf der Zelloberfläche zu einer Hyperreagibilität gegenüber physiologischen Konzentrationen von Wachstumsfaktoren führen (Fedi *et al.*, 1997; Yarden and Ullrich, 1988). Schließlich kann ein Wachstumssignal über einen Rezeptor eine inadäquate Stimulation von Signaltransduktionswegen in das Zellinnere zur Folge haben, wenn einzelne Komponenten dieser Wege eine Daueraktivierung aufweisen (Hunter, 1997).

(2) Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen: Wachstumshemmende Signale können die Zellproliferation auf zweierlei Weise blockieren. Sie können die Zelle aus dem teilungsaktiven Zustand ( $G_1$ ) in den Ruhezustand ( $G_0$ ) überführen, und sie können die

funktionelle Ausdifferenzierung einer Zelle induzieren, die mit einer Teilungsunfähigkeit einhergeht. Fallen diese Signale weg, so ist der Zelle die Kontrolle der Teilungsfähigkeit genommen. Die meisten wachstumshemmenden Signale werden durch das Retinoblastom-Protein RB und seine Verwandten p107 und p130 vermittelt, die im Zellteilungszyklus den Eintritt der Zelle aus der G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase verhindern (Weinberg, 1995). Die Unterbrechung des RB-Signalwegs und seiner Stimulatoren geschieht an unterschiedlichen Stellen, führt zu massiver Zellteilung und kommt in vielen verschiedenen Tumoren vor (Fyran and Reiss, 1993). Sobald RB phosphoryliert oder mutiert ist, kommt es zu einer Aktivierung des Zellzyklus über Cyclin-D1. Tumorzellen versuchen weiterhin, die Ausdifferenzierung und damit die Teilungsunfähigkeit zu vermeiden. So verhindert zum Beispiel das ErbA Onkogen die irreversible Differenzierung von Erythrozyten (Kahn *et al.*, 1986).

(3) Umgehung des programmierten Zelltods: Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein Mechanismus, der bei bestimmten physiologischen Bedingungen das gesteuerte Zugrundegehen einer Zelle innerhalb kurzer Zeit ermöglicht (Wyllie *et al.*, 1980). Spezielle Sensoren der Zelle überprüfen ständig die intra- und extrazelluläre Umgebung auf normale und abnormale Bedingungen und entscheiden über Leben oder Tod der Zelle. Sie senden Signale aus, die die ausführenden Zellsysteme (Effektoren) der Apoptose - hauptsächlich die Kaspasen 8 und 9 und ihre Verwandten - aktivieren (Thornberry and Lazebnik, 1998) und damit den Zellabbau einleiten (Ashkenazi and Dixit, 1999). Die Tumorzelle kann sowohl durch fehlende Sensorfunktion als auch durch fehlende Effektorfunktion den Weg der Apoptose umgehen, selbst wenn zelluläre Prozesse außer Kontrolle geraten sind. Ein bekanntes Beispiel ist der Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53, der Schäden an der DNA erkennt und Apoptosekaskade aktivieren kann. Das Protein p53 ist in über 50 % der humanen Tumoren inaktiviert (Harris, 1996).

(4) Unbegrenzte Teilungsfähigkeit: Während normale Zellen nur eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen innerhalb ihrer Lebensdauer bewerkstelligen können und dann ihr Wachstum einstellen (Zellalterung), besitzen Tumorzellen Defekte, die zu ihrer Immortalisierung und zu einer großen Anzahl von Zellteilungen führen. Wie oft sich die normale Zelle während ihrer Lebenszeit teilen kann, ist durch die Anzahl kleiner repetitiver DNA Sequenzen (6 bp) an den Enden der Chromosomen (Telomere) festgelegt, die bei jedem Zellzyklus Stück für Stück verloren gehen. Sind die Telomere vollständig aufgebraucht, so ist die chromosomale DNA nicht mehr geschützt. Es kommt zu irreversiblen Genveränderungen, die zur Aktivierung von Apoptosemechanismen führen (Counter *et al.*, 1992).

Zellkultorexperimente mit verschiedenen, humanen Karzinomzelllinien konnten zeigen, dass diese Zellen 60-70 Generationen an Tochterzellen produzieren können (Hayflick, 1997). Hier liegt das Potential von Tumorzellen, makroskopische Tumore zu erzeugen. Die Aufrechterhaltung der Telomerlänge wird in fast allen humanen Tumoren gesehen (Shay and Bacchetti, 1997), wobei dieser Umstand in 85-90% der Fälle durch die Überexpression des Enzyms Telomerase, die Hexanukleotide an die Telomerenden fügt, resultiert (Bryan and Cech, 1999).

(5) Zeitlich unbegrenzte Angiogenese: Die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff und Nährstoffen ist sowohl für die normale Zelle als auch für die Tumorzelle essentiell. Jede Zelle darf nur einen bestimmten Abstand ( $< 100 \mu\text{m}$ ) von den versorgenden Blutgefäßen haben, um durch Diffusion noch ausreichend versorgt zu werden. Bei der Entstehung von Organen sprossen von den Zellen induziert Blutgefäße mit ein (Neovaskularisation), die ein so großes Kapillarbett bilden, dass alle Zellen durch die Substrate erreicht werden. Hierfür sezerniert die Zelle Angiogenesefaktoren wie z.B. VEGF („vascular endothelial growth factor“) oder FGF („fibroblast growth factor“). Nach Abschluss des Organwachstums wird die Neovaskularisation herunterreguliert. Tumorzellen besitzen die Fähigkeit zur Neovaskularisation zu Anfang nicht, was sie an weiterer Ausbreitung hindert, können diese jedoch im Laufe ihrer Entstehung erwerben, die Gefäßeinsprossung in die Tumorumgebung induzieren und sie aufrechterhalten (Bouck *et al.* 1996., 1996; Hanahan and Folkman, 1996). Zu einem Teil werden die Angiogenesefaktoren durch die Tumorzelle selbst produziert, zum anderen Teil werden Angiogeneseinhibitoren (z.B. Thrombospondin) durch sie gehemmt. Das Phänomen der Neovaskularisation wird bereits in prämaligen Gewebsläsionen beobachtet (Hanahan and Folkman, 1996), tritt in früheren Tumorstadien auf und hat eine Tumorexpansion zur Folge, da das Substratangebot für die Tumorzellen zunimmt.

(6) Invasion und Metastasierung: Die Fähigkeit von Tumorzellen, in das umgebende Gewebe und Gefäße einzudringen, ist maßgebend für ihre Aggressivität. Eine bemerkenswerte Tatsache dabei ist, dass sich die Tumorzellen molekularbiologische Prozesse normaler Zellen zunutze machen, die unter physiologischen Bedingungen ständig stattfinden, wie zum Beispiel die Sekretion von Proteasen und Verminderung der Zelladhäsionen während der Einwanderung glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima (Bendeck *et al.*, 1994). Während diese Prozesse bei normalen Zellen strengstens kontrolliert und nach Wegfall der sie stimulierenden Substanzen (z.B. Hormone) sofort beendet werden, unterliegen sie in Tumorzellen nicht mehr der Regulation durch sich selbst sowie Nachbarzellen und finden auch ohne adäquate Stimuli statt (Kohn and Liotta, 1995). Früher oder später brechen Zellen

maligner Tumoren aus den kompakten Gewebsmassen in das umgebende Gewebe aus (Kohn and Liotta, 1995) und durchdringen die Wand dort befindlicher Blut- oder Lymphgefäße. Sie werden durch das Gefäßsystem in andere Organe (Lunge, Leber, Gehirn, etc.) verschleppt, durchbrechen im Kapillarbett erneut die Gefäßwand und entwickeln in der neuen Umgebung einer Tochtergeschwulst (Woodhouse *et al.*, 1997). Gelangen sie in die Lymphbahn, so werden sie in den nächstfolgenden Lymphknoten verschleppt. Dieser Prozess wird als Metastasierung bezeichnet (Abb. 2) und beinhaltet zwei Grundprinzipien.

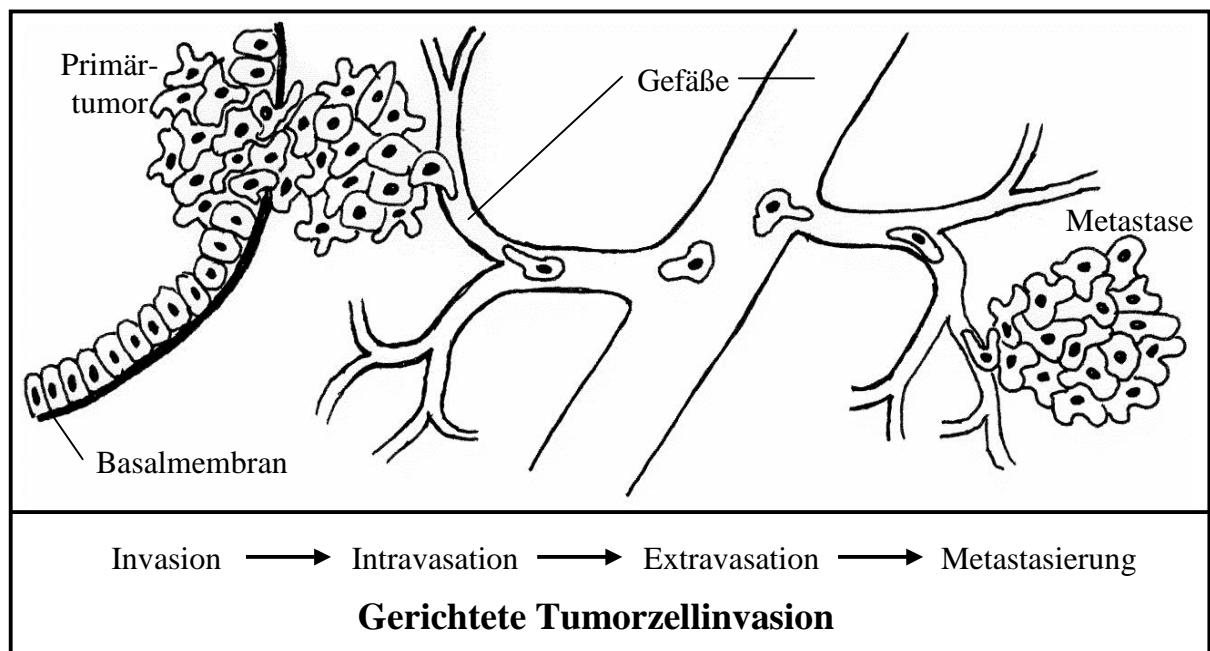


Abbildung 2: Schematische Darstellung der gerichteten Invasion und Metastasierung von Tumorzellen.

Erstens, die Metastasierung ist ein gerichteter Prozess. Er geht vom Primärgewebe aus, nimmt seinen Weg über ein Gefäßsystem und endet im Sekundärgewebe. Zweitens, er verläuft in bestimmter Abfolge und ist für die Tumorzellen selektiv (Price *et al.*, 1986). Die Zellen müssen zuerst die Zell-Zell-Kontakte unterbrechen und die Basalmembran des Gewebes sowie die extrazelluläre Matrix (EZM) des Interstitiums zerstören (Aznavorian *et al.*, 1993). Dazu benötigen sie die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, Proteasen, und Faktoren für die Fortbewegung (Aznavorian *et al.*, 1993). Nach Eintritt in das Gefäßsystem (Intravasation) müssen sie während ihrer Zirkulation dem Angriff des Immunsystems standhalten, was sie nur in 0,05 % der Fälle bewerkstelligen (Nicolson, 1991). Demfolgend müssen sie im Gefäßbett eines anderen Organs an das Endothel andocken und es mit Hilfe



proteolytischer Enzyme durchdringen (Extravasation), um dort erneut proliferieren zu können (Magdolen *et al.*, 2000; Reuning *et al.*, 1998; Schmitt *et al.*, 1992).

Die in Abbildung 1 und im Text beschriebenen Veränderungen (1)-(6) in den physiologischen Zellfunktionen treten in fast allen Tumoren auf und zeigen lediglich in ihrer Abfolge in den einzelnen Tumoren eine gewisse Variabilität. Die genetische Basis der neu erworbenen Fähigkeiten von Tumorzellen ist zwar erwiesen, jedoch können Veränderungen des genetischen Materials von der Zelle normalerweise durch das sehr effizient arbeitende System aus DNA-Fehlererkennung und DNA-Reparatur sehr gut korrigiert werden. Deshalb kommt als weiterer Faktor der Tumorgenese die genetische Instabilität hinzu, die während der Stufen der Krebsentstehung immer größere Tragweite erlangt (Lengauer *et al.*, 1998). Vor allem die Gene der Erkennungs- und Reparaturproteine für DNA-Veränderungen gehen hier durch Mutation, Deletion und weitere Fehler verloren, so dass die Mutagenese die Entstehung von weiteren zellulären Fehlfunktionen begünstigt.

### 1.2 Molekularbiologische Erkenntnisse beim Mammakarzinom

Das Mammakarzinom hat in den letzten Jahren in den entwickelten Ländern rapide zugenommen und stellt heute den häufigsten bösartigen Tumor der Frau dar. So ist das Lebensrisiko für eine Frau, an einem Mammakarzinom zu erkranken, 1:10 (Sauer, 1998). Es ist in jüngeren Jahren geringer und nimmt mit zunehmendem Alter zu. Zu den epidemiologisch ermittelten Risikofaktoren gehören unter anderem Östrogenbehandlung, frühe Menarche, späte Menopause und späte Erstschwangerschaft. Wegen der hohen Inzidenz (100 von 100.000 Frauen) wurde die Suche nach Ursachen in den letzten Jahren vor allem auf molekularbiologischer Ebene verstärkt betrieben und konnte den Erkenntnisstand zwar deutlich erweitern, aber das Gesamtbild nicht vervollständigen.

Es ist heute sehr wahrscheinlich, dass das Mammakarzinom bestimmte histologisch differenzierbare Stadien durchläuft. Aus der prämaligen Hyperplasie mit Proliferation der Milchgangsepithelien entwickeln sich Läsionen mit Zelldysplasien bei noch intakter Basalmembran, duktales Carcinoma in situ (DCIS) genannt. Das Wachstum bleibt hier auf das Lumen der Milchgänge beschränkt. Die Zerstörung der Basalmembran (Barsky *et al.*, 1983), diffuse Infiltration in das umgebende Bindegewebe, Neovaskularisation des Tumors (Liotta *et al.*, 1991) und zelluläre Atypien mit Mitosen definieren bereits das Stadium des invasiven Karzinoms. Ab diesem Moment werden lymphogene und hämatogene Absiedlungen beobachtet. Die Abfolge bestimmter genetischer Veränderungen, wie sie in der Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms beobachtet wurden (Kinzler and

Vogelstein, 1996), konnte hier bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht erkannt werden. Ein kleiner Teil der Patientinnen mit Mammakarzinom (5 %) weist Veränderungen auf Genebene auf, so dass sich für Verwandte ersten Grades ein erhöhtes Risiko ergibt. Viele Studien wiesen Mutationen (Futreal *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1995), Deletionen und Verlust des gesunden Allels („loss of heterozygosity“) (Katsama *et al.*, 2000) für die Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 in Mammakarzinomen nach. BRCA1 und BRCA2 sind zusammen mit Rad51 an der DNA-Reparatur beteiligt. Das p53 Tumorsuppressorgen, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert und als Hauptsteuerelement für den programmierten Zelltod gilt, zeigt ebenfalls Mutationen in malignen Brusttumoren (Lukas *et al.*, 2000). Auf der Seite der Onkogene ist H-Ras zu nennen, ein kleines G-Protein im MAPK-Signaltransduktionsweg, das in 8 % der Mammakarzinome Mutationen aufweist (Spandidos, 1987).

In entartetem Gewebe der Mamma konnte aber auch Überexpression verschiedener Onkogene nachgewiesen werden, wie zum Beispiel für Ras, Rac1, MAPK und Her-2/neu (ErbB2). Her-2 ist ein transmembraner EGF-Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität, der durch Wachstumsfaktoren Signaltransduktionswege zum Zellkern aktiviert (Dougall *et al.*, 1994). Überexpression (Parkes *et al.*, 1990) auf der Zelloberfläche ermöglicht eine vermehrte Stimulation durch Wachstumsfaktoren (Dougall *et al.*, 1994). Es gibt jedoch noch viele andere Onkogene wie zum Beispiel c-Met, Myc und Bcl2, deren Expression und Vorhandensein in Mammakarzinomen klinisch-prognostische Relevanz besitzen (Ghoussoub *et al.*, 1998), die jedoch bis jetzt nicht direkt in Zusammenhang mit dessen Entstehung zu bringen waren.

### 1.3 Signaltransduktionswege als Vermittler zwischen Zelloberfläche und Zellkern

Die eukaryontische Zelle benötigt zur adäquaten Reaktion auf die vielfältigen Signale seiner Umgebung differenzierte Informationssysteme, die die Kommunikation zwischen Zelloberfläche und Zellkern ermöglichen. Ein Netzwerk aus Signalmolekülen und Enzymen setzt ein fein reguliertes, kaskadenförmig ablaufendes „messenger“-System in Gang, das neben dem Signal selbst auch dessen Stärke und Dauer berücksichtigen kann. Hat die Information den Zellkern erreicht, werden dort durch transkriptionelle Regulation diejenigen Gene exprimiert, die für die entsprechende Zellantwort notwendig sind. Da 90 % der eukaryontischen Gene auf Transkriptionsebene reguliert werden (Karin and Smeal, 1992; Smith and Hager, 1997), sind die Signaltransduktionswege ein essentieller Bestandteil für die Vermittlung physiologischer und pathophysiologischer Zellantworten. Zur Vereinfachung

kann man die Signale, die in den Zellkern vermittelt werden, in vier verschiedene Klassen von Signaltransduktionswegen unterteilen, die im Folgenden kurz erläutert werden (Abb. 3).

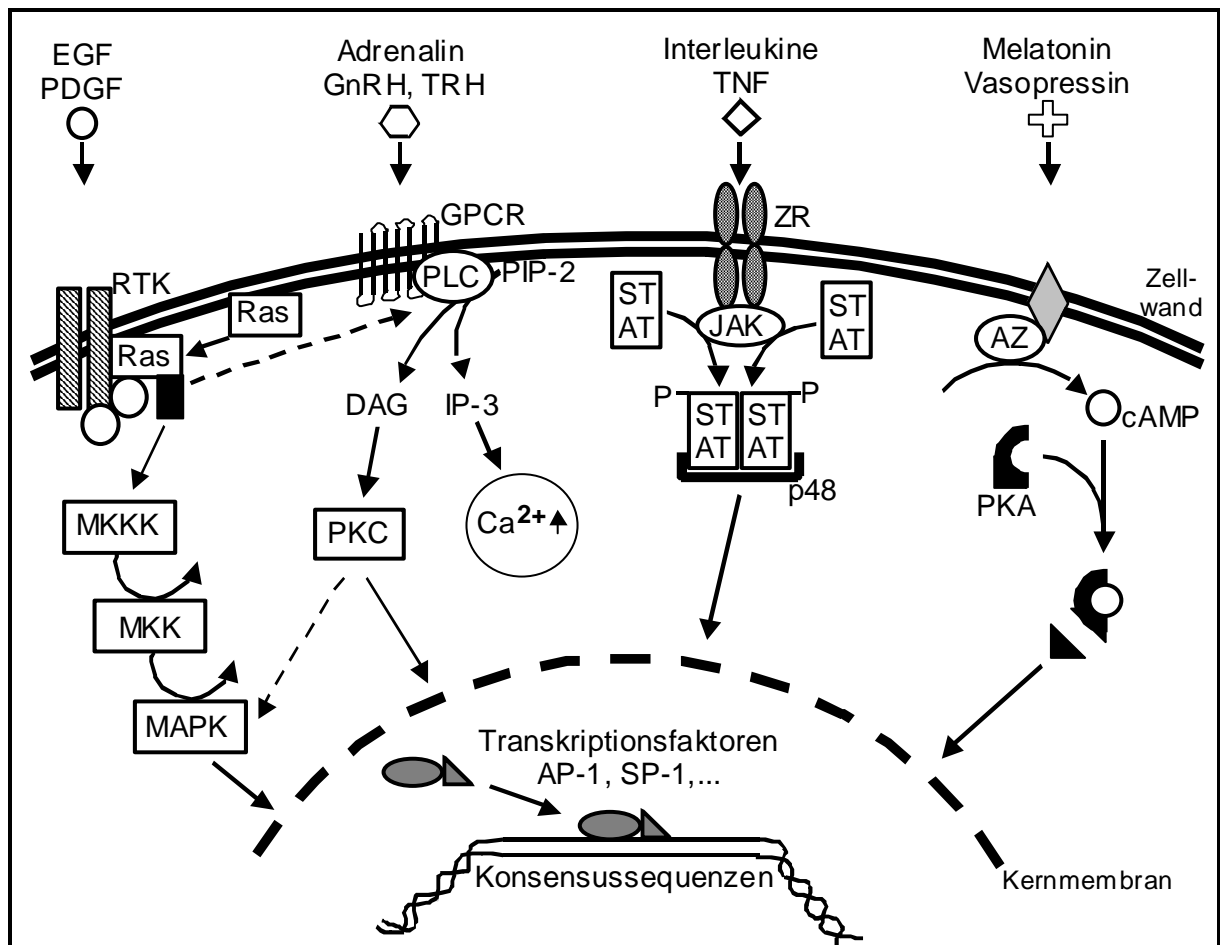


Abbildung 3: **Überblick über zelluläre Signaltransduktionswege.** Abkürzungen werden auf S.106 definiert.

Das Adenylatzyklasesystem gehört zu den „second messenger“-Systemen. Ein Hormon („first messenger“) wird von einer auf der Plasmamembranaussenseite gelegenen, spezifischen Rezeptoruntereinheit erkannt und gebunden. Diese Bindung bewirkt über ein transmembranes, als Übertragereinheit dienendes System von G-Proteinen die Aktivitätszunahme der katalytischen Einheit der Adenylatzyklase an der Membrannenseite (Birnbaumer *et al.*, 1985). Sie katalysiert den Abbau von ATP zu cAMP („second messenger“). Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels führt zur Aktivierung der Proteinkinase A, die daraufhin eine katalytische Untereinheit abspaltet. Diese gelangt in den Zellkern und aktiviert dort den Transkriptionsfaktor CREB („cAMP response element binding protein“), der an DNA binden kann (Jameson *et al.*, 1987).

Das Phospholipase und -kinasesystem ist ebenfalls ein „second messenger“-System. Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF, etc.), die an Rezeptortyrosinkinasen (RTK) binden und Hormone (Adrenalin, Noradrenalin, etc), die an siebenschännige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (Gutkind, 1998) binden, führen über Aktivierung der Phospholipase C zur Spaltung des membranständigen Moleküls Phosphatinositol-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in die wichtigen Signalmoleküle Inositol-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) (Hokin, 1985). IP<sub>3</sub> stimuliert die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum und bewirkt dadurch einen Anstieg des intrazellulären Kalziums mit Änderungen im Zellstoffwechsel. DAG aktiviert die Proteinkinase C, die ihrerseits verschiedenste Proteine bis hin zu Transkriptionsfaktoren phosphoryliert (Ventura and Maioli, 2001) und auch den MAPK-Signaltransduktionsweg aktiviert (Liebmann, 2001).

Das JAK/STAT-System („Janus kinase/signal transducers and activators of transcription“) wird hauptsächlich durch Zytokine (Il-2, Il-12, IFN $\alpha$ , etc.) aktiviert (Garcia and Jove, 1998). Nach Bindung an den in der Plasmamembran gelegenen Zytokinrezeptor (ZR) ifnar-1 erfolgt die Bildung von Dimeren mit der Untereinheit ifnar-2. An diese Formation lagern sich dann Mitglieder der JAK-Familie. Nach ihrer Phosphorylierung sind sie selbst in der Lage, die zytosolischen Faktoren STAT-1 und STAT-2 zu phosphorylieren. Diese aggregieren ebenfalls zu Dimeren, die nach Bindung der Einheit p48 in den Kern verlagert werden. Hier regulieren sie als Transkriptionsfaktoren die Genexpression. Für den Faktor STAT-3 konnte vor kurzem eine Überexpression beim Mammakarzinom (Garcia *et al.*, 2001) und eine Regulation durch die Rho-GTPase Rac1 aus dem MAPK-Signaltransduktionsweg (Simon *et al.*, 2000) gezeigt werden.

Das vierte System verbindet über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und den MAPK-Signaltransduktionsweg Zelloberfläche und Kern. Es wird im nächsten Kapitel detaillierter abgehandelt.

#### 1.4 Der MAPK-Signaltransduktionsweg

Der MAPK-Signaltransduktionsweg („mitogen activated protein kinase“) (Garrington and Johnson, 1999; Hunter, 1997) ist ein zellulärer Signalweg, der im Mittelpunkt der Übertragung von Wachstumssignalen und Stressfaktoren ins Zellinnere steht. Er wird durch RTKs (van Biesen *et al.*, 1995), GPCRs („G-protein coupled receptor“) und zytoplasmatische Onkogene (Luttrell *et al.*, 1994) aktiviert und leitet über eine Kaskade von phosphorylierenden Proteinkinasen die Information in den Zellkern, wo zuletzt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren erfolgt. Die Mitglieder der MAPK-Familie sind Erk

(Derijard *et al.*, 1995), Jnk (Gupta *et al.*, 1995) und p38 (Han *et al.*, 1994). Mitogene Signale laufen über Erk1 und Erk2, während Stresssignale, die durch UV-Strahlung oder Hitze entstehen, über Jnk laufen. Zytokine nehmen ihren Weg über p38 (Abb. 4).

Bindet ein Ligand (Wachstumsfaktor, Zytokin, etc.) an die Rezeptoreinheit einer membranständigen RTK, so kommt es durch Konformationsänderung der Transmembranabschnitte und Dimerisierung mit einer weiteren RTK zur Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosyl-Reste und damit zur Aktivierung.

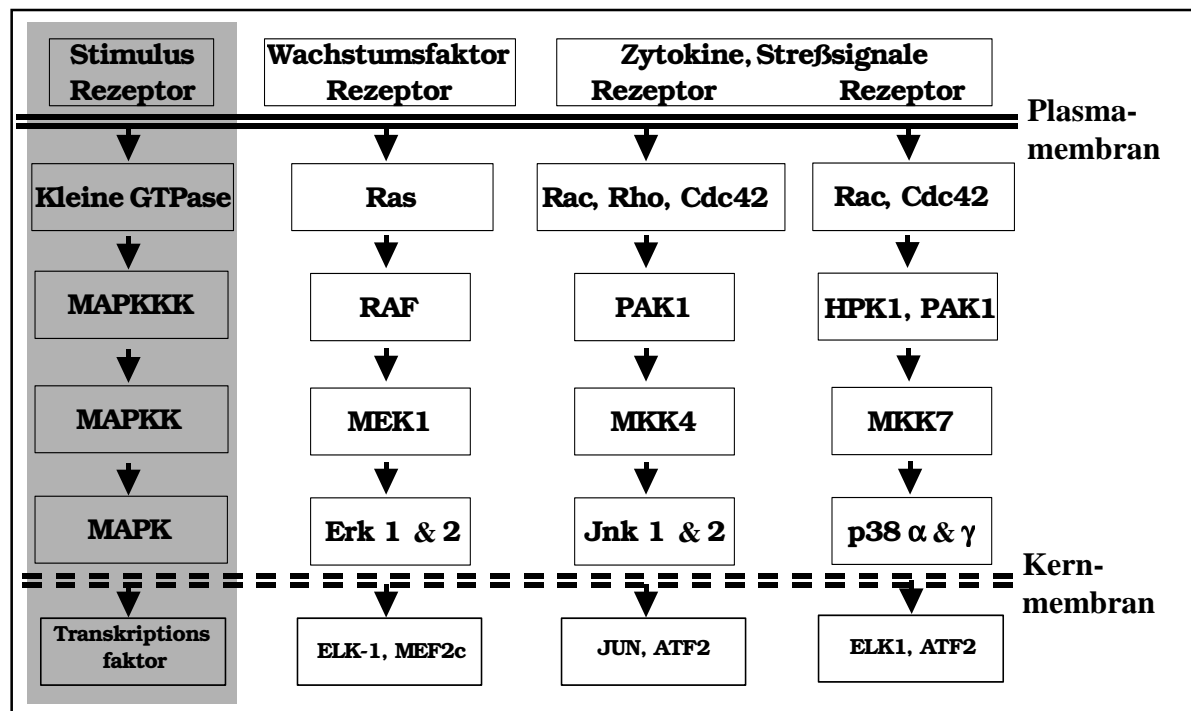


Abbildung 4: Kaskaden des MAPK-Signaltransduktionsweges (aus Hannke-Lohmann *et al.*, 2000).

Beim Erk-MAPK-Weg binden nacheinander die Faktoren Grb2 und Sos1 an die RTK. Dies führt zu einer GTP-getriggerten Aktivierung der membrannahen GTPase Ras. Daraufhin bildet Ras einen Komplex mit der Serin/Threoninkinase c-Raf (MAPKKK), die ihrerseits über die Rho-GTPase RhoA MEK1 (MAPKK) phosphoryliert (Ried *et al.*, 1999). MEK1 aktiviert kaskadenartig Erk1 oder Erk2 (MAPK), die jetzt in den Zellkern dislozieren und dort über das SRE („serum responsive element“) mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren der TCF- und Ets-Familie verschiedene Genpromotoren aktivieren.

Bei Stimulation der Rezeptoren des Jnk-Weges leiten die GTPasen Rac, RhoA und Cdc42 (Coso *et al.*, 1995) die Information weiter, indem sie PAK1 (MAPKKK) phosphorylieren. Über MKK4 (MAPKK) und Jnk1/2 (MAPK) gelangt die Information in den

Zellkern und führt zu Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF2 (Hanne-Lohmann *et al.*, 2000).

Werden die Rezeptoren des p38-Weges angesprochen, resultiert eine Weiterleitung durch die Rho-GTPasen Rac und Cdc42 (Coso *et al.*, 1995). Die Phosphorylierungskaskade läuft über PAK1/HPK1 (MAPKKK), MKK7 (MAPKK) und p38 $\alpha/\gamma$  (MAPK). Durch p38 werden im Nukleus die Transkriptionsfaktoren ELK1 und ATF2 angeschaltet.

Es gibt einige Berichte, dass eine erhöhte Expression und Aktivität des MAPK-Signaltransduktionsweges die Invasions- und Metastasierungsfähigkeiten von Tumorzellen fördern (Brunet and Pouyssegur, 1996; Santen *et al.*, 2002). Im Mammakarzinom und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen konnte eine erhöhte MAPK-Aktivität sowie eine Überexpression auf Protein- und RNA-Ebene gegenüber dem normalen Brustgewebe und benignen Veränderungen (Fibroadenom, fibrös-zystische Mastopathie) nachgewiesen werden (Sivaraman *et al.*, 1997). Dieser Umstand ist insofern von Bedeutung, als dass andere oberhalb der MAPK gelegene Kaskadenmitglieder, wie Ras und Rac1, ebenfalls Veränderungen beim Mammakarzinom aufweisen. Für Ras wurden überexprimierte, konstitutiv-aktive Mutanten in verschiedenen Malignomen (Pankreas, Kolon, Lunge, Schilddrüse) gefunden (Bos, 1989). Auch die Rho-GTPase Rac1 ist in malignen Läsionen der Mamma überexprimiert (Schnelzer *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse haben dazugeführt, dass dem MAPK-Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle bei der Entstehung zugeschrieben wird. Es wird deutlich, dass an dem Entartungsprozess des Mammakarzinoms die Wege der Signalübermittlung maßgeblich beteiligt sind, wobei die Regulation der Gentranskription durch Transkriptionsfaktoren die gemeinsame Endstrecke zu sein scheint.

### 1.5 Die Familie der Ras- und Rho-GTPasen

Kleine GTPasen (20-25 kDa) stellen das Verbindungsglied zwischen RTKs und Signaltransduktionswegen ins Zellinnere dar. Sie sind an der Innenseite der Plasmamembran oder zytosolisch lokalisiert und werden in allen Zellen exprimiert. Alle GTPasen besitzen eine intrinsische GTPase-Aktivität, das heißt, sie können in der Nukleotidbindetasche gebundenes GTP zu GDP und P<sub>i</sub> spalten (Bourne *et al.*, 1991). In ihrer GDP gebundenen Form sind sie inaktiv, in der GTP gebundenen Form aktiv. Die Bindung von GTP induziert eine Konformationsänderung des Proteins, welche die beiden Domänen „switch“ I und II zueinander klappt, und der GTPase eine Interaktion mit Zielproteinen so lange ermöglicht, bis die intrinsische GTPase-Aktivität die Wirkung beendet (Wittinghofer and Nassar, 1996). Die Ras-Superfamilie zählt über 80 Mitglieder und rekrutiert sich aus acht Hauptgruppen (Ras,



Die Aktivität aller kleinen GTPasen wird durch den intrazellulären Quotienten aus GTP/GDP-gebundenen Formen determiniert (Boguski and McCormick, 1993). Die Funktion als molekulare Schalter, die durch den Austausch von GTP und GDP zwischen „on“- und „off“-Zustand wechseln können, wird durch drei Gruppen von Proteinen vermittelt (van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997) (Abb. 6). Die „guanine nucleotide exchange factors“ (GEFs z.B. Dbl, Vav, Sos, etc.) haben die „Dbl-homology“-Domäne gemeinsam und fördern den Austausch von gebundenem GDP zu GTP und erhöhen dadurch den GTPase-Anteil im „on“-Status. Die „GTPase activating proteins“ (GAPs z.B. p50, p190, Bcr, etc.) beschleunigen die Hydrolyse von GTP in GDP und  $P_i$  und überführen damit die GTPase in den GDP-gebundenen „off“-Status. Sie wirken also den GEFs entgegengesetzt. Die dritte Gruppe von Proteinen sind die „GDP-dissociation inhibitory proteins“ (GDIs z.B. Rho-GDI, ERM, D4, etc.). Sie entfalten ihren hemmenden Effekt, indem sie GDP in der Bindungsdomäne der GTPase halten und dadurch den „off“-Zustand konsolidieren (Fukumoto *et al.*, 1990). Jedoch gibt es auch Hinweise, dass sie die intrinsische, GAP-beschleunigte GTPase-Aktivität hemmen und somit den aktiven Zustand verlängern (Chuang *et al.*, 1993). Damit werden zwei entgegengesetzte Effekte durch ein Protein vermittelt. Die komplexe Modulation der GTPase-Aktivität durch GEFs, GAPs und GDIs zeigt, dass hier ein Gleichgewicht fein austariert werden muss, um den Ablauf von daraus folgenden Zellprozessen zu kontrollieren.

Die Grundlage für das Verständnis der Funktion von Rho-GTPasen bilden die *in vitro* Untersuchungen an Rac1, RhoA und Cdc42 der letzten Jahre. Vier Wirkungsmechanismen haben sich dabei herauskristallisiert (Abb. 6).

(1) Umbau des Zytoskeletts: Rho-GTPasen regulieren den Umbau des Zytoskeletts. Sie induzieren Signale, die zur Umstellung von F-Actinfilamenten, den Hauptbestandteilen des Zellskeletts, führen und tragen dadurch zur dynamischen Veränderung der Zellform, der Zelloberfläche, der Zellbewegung und der Adhäsionsfähigkeit bei. Aktiviertes Rac1 induzierte in 3T3-Fibroblasten die Kräuselung der Plasmamembran („membrane ruffling“) und die Ausbildung von zungenartigen Ausläufern, Lamellipodien genannt (Nobes and Hall, 1995). Cdc42-Induktion führte zu Aussprossung schmaler Membrantentakel, sog. Filopodien, und Aktivierung von Rac1 (Nobes and Hall, 1995). RhoA wiederum erzeugte die Formation intrazellulärer Stressfibern und die Exponierung fokaler Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche (Ridley *et al.*, 1992). Cdc42 und Rac1 aktivieren beide RhoA mit den genannten Folgen. Durch Versuche mit dominant-negativen Formen der drei Rho-GTPasen konnte gezeigt werden, dass eine Kaskade von Cdc42 über Rac1 bis RhoA abläuft, die von verschiedenen extrazellulären Stimuli (z.B. Bradykinin, PDGF, Insulin, LPA) und



intrazellulären Stimuli (z.B. Ras) an allen drei Proteinen aktiviert wird (Kozma *et al.*, 1995; Nobes *et al.*, 1995). Diese Kaskade wurde auch in anderen Zelltypen gefunden (Allen *et al.*, 1997). Eine Verlagerung der Rho-GTPasen vom Zytosol an die Zellmembran ist für die zellmodellierenden Funktionen eine wichtige Voraussetzung (Fleming *et al.*, 1996). Weiterhin wurde in verschiedenen Studien ihre Beteiligung an Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen (Kaibuchi *et al.*, 1999). Neben Vorgängen, die zu Zellbewegungen und Adhäsion führen, konnte auch eine Beteiligung von Rac1, RhoA und Cdc42 an Phagozytose- (Adam *et al.*, 1996) und Endozytoseprozessen (Lamaze *et al.*, 1996) in Zellen gezeigt werden.

(2) Signaltransduktion: Rho-GTPasen sind regulierende Elemente in den Proteinkinasekaskaden der Signaltransduktion, die über Transkriptionsfaktoren zu veränderter Genexpression führen. Die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 sind an der Stimulation der Jnk- und p38-MAPK beteiligt (Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995), während RhoA nur Jnk reguliert (Teramoto *et al.*, 1996). Die Rho-Proteine nehmen dabei über „p21-activated kinases“ (PAKs), die als MAPKKKs eine Stufe über der MAPKKs liegen, auf Jnk und p38 Einfluss (Bagrodia *et al.*, 1995a; Bagrodia *et al.*, 1995b). Zusätzlich stimulieren Rac1, RhoA und Cdc42 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors SRF („serum responsive factor“) (Hill *et al.*, 1995) im Kern, der in Komplex mit Elk, einem Ets-Transkriptionsfaktor, in der Promotorregion von Genen an das „serum responsive element“ (SRE) bindet. Neben dem MAPK-Signaltransduktionsweg wird auch die Weiterleitung GPCR-vermittelter Wachstumssignale durch sie reguliert. So konnte gezeigt werden, dass konstitutiv-aktive Mutanten des GPCRs über Rho-GTPasen Zellen transformieren (Whitehead *et al.*, 2001). Rho-GTPasen modulieren auch die Transkription des „estrogen receptors“ (ER) (Su *et al.*, 2001). Schließlich wird ein Redoxpotential abhängiger Signaltransduktionsweg unter Beteiligung von Rac1, RhoA und Cdc42 aktiviert (Perona *et al.*, 1997), der zu einer Stimulation des Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B („nuclear transcription factor“) führt. NF- $\kappa$ B wird normalerweise als Folge einer Degradation von I $\kappa$ B-Proteinen durch UV-Licht, TNF $\alpha$ , Phorbolster und Zytokine aktiviert.

(3) Zellzyklusprogression: Rho-GTPasen regulieren Zellproliferation und Zellzyklusprogression. Rac1, RhoA und Cdc42 sind notwendig um den Fortgang der G<sub>1</sub>-Phase der Zellteilung zu erhalten (Yamamoto *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass NIH3T3-Zellen bei Hemmung der Rho-Proteine durch C3-Toxin in der G<sub>1</sub>-Phase akkumulieren und nicht weiter wachsen, während die Mikroinjektion von konstitutiv-aktiven Mutanten von Rac1, RhoA, Cdc42 und auch Ras die DNA-Synthese in ruhenden Swiss 3T3 Fibrozyten

stimulierte (Olson *et al.*, 1995). Der Mechanismus bezieht aller Wahrscheinlichkeit nach Cyclin-D1, einen wichtigen Regulator der Progression in der G<sub>1</sub>-Phase, ein, dessen Transkription durch Rac1 und RhoA stimuliert wird und den Eintritt in die M-Phase ermöglicht (Westwick *et al.*, 1997). Weiterhin wird unter Einfluss der Rho-Proteine der Eintritt in die S-Phase dadurch erleichtert, dass der Faktor p27<sup>Kip1</sup>, ein Hemmstoff der Cyclin-D-kinase, durch sie gehemmt wird (Hirai *et al.*, 1997).

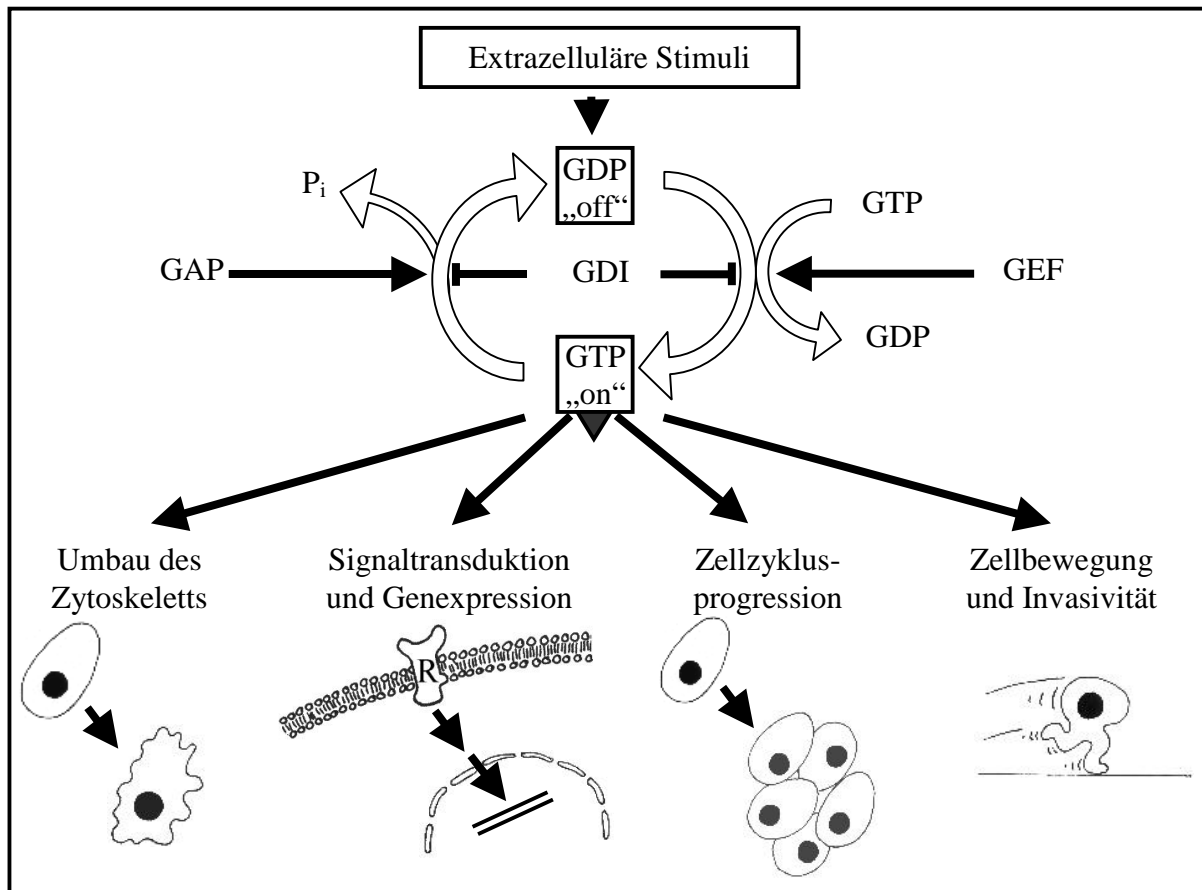


Abbildung 6: **Regulation und Funktion der Rho-GTPasen.**

(4) Zellbewegung und Invasivität: Rho-GTPasen fördern die Beweglichkeit und Invasion von Zellen. Rac1, RhoA und Cdc42 sind an der Induktion räumlicher Bewegungen von Zellen verschiedener Zelllinien *in vitro* beteiligt. Diese Abhängigkeit konnte für NIH3T3-Zellen auf glatter Oberfläche (Takaishi *et al.*, 1993), Mauskeratinozyten unter HGF-Stimulation (Takaishi *et al.*, 1994) und MDCK-Epithelzellen (Ridley *et al.*, 1995) gezeigt werden. Die Hemmung der Rho-GTPasen durch C3-Toxin verhinderte die Invasion von drei T-Zelllymphomreihen durch eine einzellige Schicht aus C3H10T1/2-Zellen und die Ausbildung von experimentellen Metastasen in Nacktmäusen (Verschueren *et al.*, 1997). Eine

andere Gruppe wies nach, dass die Invasion der T-Zelllymphomzellen durch konstitutiv-aktives Rac1 und seinen spezifischen GEF Tiam1 („t-cell lymphoma invasion and metastasis protein“) induziert wurde (Habets *et al.*, 1994). Bestätigt wurde dies durch Versuche mit Tiam1-defizienten Nacktmäusen, in denen es trotz Ras-Aktivierung nicht zur Ausbildung von Hauttumoren kam (Malliri *et al.*, 2002), ein über Rac1 laufender Effekt. Auch in der Mammakarzinomzelllinie T47D konnten aktiviertes Rac1 und Cdc42 Zellbewegungen und Invasion induzieren (Keely, 2001).

Diese Synopse der Funktionen von Rho-GTPasen (1)-(4) zeigt das Potential, multiple zelluläre Vorgänge *in vitro* nachhaltig zu beeinflussen. Eine Dekompensation bei Transformation von Rho-Proteinen und ihrer Aktivatoren, zu denen auch viele Onkogene zählen, hat unvorhersehbare Folgen für die Zelle. Ein Punkt jedoch muss beachtet werden. Der Beitrag der Rho-GTPasen in zellulären Vorgängen bei Tumordinvasion und Metastasierung *in vivo* ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nur wenig untersucht. Immerhin konnte eine Studie zeigen, dass die Rho-Proteine Rac1, RhoA und Cdc42 in Karzinomen der Lunge, des Kolons und der Mamma überexprimiert sind (Fritz *et al.*, 1999; Schnelzer *et al.*, 2000), und eine weitere Studie im Tiermodell, dass Rac1, RhoA und Cdc42 das maligne Wachstum von Brustdrüsengewebe und die Metastasierung *in vivo* regulieren (Bouzahzah *et al.*, 2001).

### 1.6 Die Rho-GTPase Rac1

Die Rac-Familie („Ras-related C3 botulinum toxin substrate“) wurde von Didsbury im Jahre 1989 entdeckt, der aus der HL-60 Bibliothek einer Promyelozytenleukämie-Zelllinie die cDNA-Klone für Rac1 und Rac2 isolierte und deren Sequenz erschloss (Didsbury *et al.*, 1989). Die Aminosäuresequenzen von Rac1 und Rac2 sind zu 92 % identisch, zur Rho-Familie liegt die Homologie bei 58 % und zu Ras immerhin bei 30 %. Beide Proteine haben ein Gewicht von 21,4 kDa, bestehen aus 192 Aminosäuren und besitzen vier der fünf konservierten Domänen von Ras, die zur Bindung und Hydrolyse von GTP notwendig sind. Das COOH-termiale Ende enthält die Konsensussequenz Cys-X-X-X-COOH, die bei Ras die Lokalisation an der Plasmamembran bewirkt, sowie die Aminosäuren Gly und Ala an den Positionen 12 und 59, deren Mutationen bei Ras ein transformierendes Potential zeigten. Die Erschließung der Kristallstruktur von Rac1 (Abb. 7) und damit die dreidimensionale Darstellung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins (Hirshberg *et al.*, 1997) machte es möglich, die Lage und Form der GTP-Bindungstasche mit der „switch“ I/II Region, sowie anderer wichtiger Bestandteile, wie die für die Hydrolyse erforderlichen „loops“, die für Rho-

Proteine charakteristische Insertregion (AS 117-137) und Residuen für die Formation von NADPH im Oxidaseweg, zu lokalisieren.

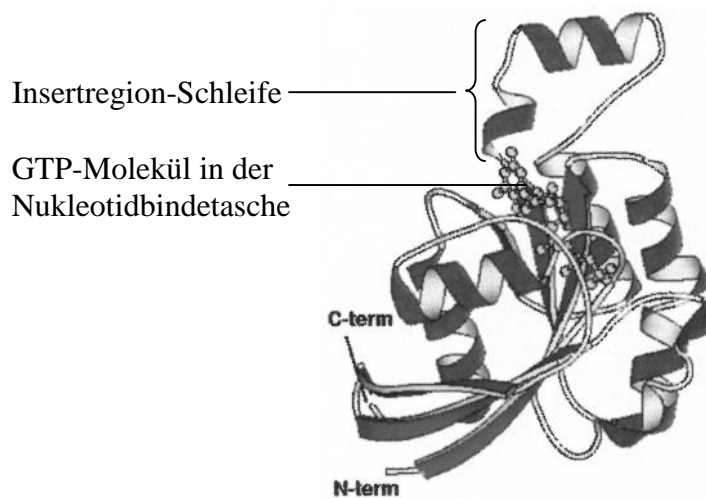


Abbildung 7: **Dreidimensionale Kristallstruktur der Rho-GTPase Rac1 mit dem gebundenen GTP-Molekül.** Wichtigste Bestandteile sind die Schleife der Insertregion (AS 117-137) und die Nukleotidbindungstasche mit dem enthaltenen GTP-Molekül (aus Hirshberg *et al.*, 1997).

Durch Transfektionsexperimente konnte gezeigt werden, dass Rac1 und Rac2 als Substrate für die ADP-Ribosylierung der C3-Komponente des Botulinumtoxins wirken (Didsbury *et al.*, 1989). Rac1 wird in vielen Geweben exprimiert (Moll *et al.*, 1991), während Rac2 auf die Zellen des hämatopoetischen Systems und des lymphozytären Systems beschränkt ist (Shirsat *et al.*, 1991). Rac1 besitzt wie alle Rho-Familienmitglieder eine intrinsische GTPase-Aktivität und wird durch GEFs, GAPs und GDIs auf Proteinebene reguliert, wobei Faktoren unterschieden werden können, die nur Rac1 beeinflussen (z.B. Tiam1) oder die auch RhoA und Cdc42 in ihrer Aktivität regulieren (van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). Tiam1 scheint gerade für die Aktivierung von Rac1 beim Mammakarzinom eine wichtige Funktion zu haben, denn es wird in Mammakarzinomzellen exprimiert (z.B. SP-1) (Habets *et al.*, 1995), ist ein GEF für Rac1 (Bourguignon *et al.*, 2000b) und führt zu Invasion und Zellbewegung (Bourguignon *et al.*, 2000a; Bourguignon *et al.*, 2000b).

Neben den in 1.6 erwähnten Funktionen in den Bereichen Zytoskelettformation, Signaltransduktion, Zellzyklusprogression und Invasion, weist Rac1 im Gegensatz zu RhoA und Cdc42 noch einige zusätzliche Eigenschaften auf. Im Bereich der Zelladhäsion konnte für Rac1 eine spezifische Beteiligung an der Regulation von Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakten (Lambert *et al.*, 2002) und Integrin vermittelten Matrix-Zell-Kontakten (O'Connor and Mercurio, 2001; Shelly and Herrera, 2002) festgestellt werden, wobei O'Connor die

Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 für die Versuche verwendete. Hierbei scheint Rac1 ein Gleichgewicht zwischen Zellbeweglichkeit und Ortsständigkeit im Zellverband aufrecht zu erhalten. Rac1 beeinflusst aber auch die Zellarchitektur durch Beteiligung an Ausrichtungs- und Polarisationsvorgängen über das Strukturprotein Laminin (O'Brien *et al.*, 2001). Die Lokalisation und Verlagerung von aktiviertem Rac1 in Zellen konnte durch die Methode FLAIR („fluorescence activation indicator for rho proteins“) sichtbar gemacht werden (Kraynov *et al.*, 2000). Migrationsexperimente dieser Gruppe in NIH3T3-Fibroblasten zeigten eine quantitative Zunahme und eine Verlagerung von aktiviertem Rac1 an die Wanderungsfront („leading edge“) der Zellen. Rac-Proteinen kommt eine weitere Rolle bei der Erzeugung toxischer Zellsubstanzen, sogenannter „reactive oxygen species“ (ROS), zu. Sie können die Aktivität des NADPH-Oxidase Enzymkomplexes regulieren, der zur Entstehung der Sauerstoffradikale  $O_2^-$ ,  $OH^-$  und deren Folgeprodukts  $H_2O_2$  führt. In neutrophilen Granulozyten geschieht dies unter Beteiligung von Rac2 (Knaus *et al.*, 1991) und in Makrophagen Rac1-vermittelt (Abo *et al.*, 1991), jedoch auch für nicht-phagozytäre Zellen (Fibroblasten) konnte die regulierende Funktion von Rac1 bei der Generierung von ROS gezeigt werden (Sundaresan *et al.*, 1996). Die Sauerstoffradikale werden in der Abwehr von Bakterien durch immunkompetente Zellen gebildet, ihr intrazellulärer Anteil ist jedoch auch für das Redoxpotential der Zelle verantwortlich. So konnte in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass eine Rac1-abhängige Akkumulation von ROS und die daraus resultierende Veränderung des Redoxpotentials zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B führte (Sulciner *et al.*, 1996).

Nachdem Rac1 als wichtiges Signalprotein für Vorgänge der Zellproliferation, Differenzierung und Migration identifiziert worden war, wurde zur Abklärung des transformierenden Potentials analog zu der bereits bekannten Ras-Mutante RasV12 (Bos, 1989) die konstitutiv-aktive Mutante Rac1V12 kloniert, der die GTPase-Funktion fehlt und so eine Daueraktivität resultiert, da Rac1 konstitutiv im GTP-gebundenen „on“-Zustand bleibt. Die Expression von Rac1V12 in Rat1-Fibroblasten führte zu Veränderungen des Zytoskeletts, erhöhter Wachstumsrate, Verlust der Kontaktinhibition und größerer Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren (Qiu *et al.*, 1995). Die Rac1V12-exprimierenden Zellen besaßen gegenüber Zellen mit einer dominant-negativen Mutante von Rac1 (Rac1N17) die Fähigkeit, auf Softagar Kolonien zu bilden und Tumorfoci in Nacktmäusen zu induzieren. Dominant-negatives Rac1N17 konnte auch die Ras-induzierte Transformation blockieren. Die Co-Transfektion von Ras und Rac1 führte zu einer Verstärkung der Zelltransformation und Erhöhung der Zellmotilität (Anand-Apte *et al.*, 1997; Khosravi-Far *et al.*, 1995).

In diesen *in vitro* Experimenten wurde die Mutante Rac1V12 verwendet, um das transformierende Potential von Rac1 zu zeigen. Für Ras jedoch konnte nachgewiesen werden, dass die in der Zellkultur entdeckten, aktivierenden Mutationen auch *in vivo* vorkommen und zu einer malignen Transformation führen (Bos, 1989). Die Untersuchung von Rac1 cDNA-Klonen aus Mammakarzinomgeweben, normalen Brustdrüsengeweben und acht Mammakarzinomzelllinien auf aktivierende Mutationen erbrachte lediglich 18 Einzelmutationen, die jedoch alle zu keiner aktivierenden Veränderung in der Aminosäuresequenz führen (Schnelzer *et al.*, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von Rac1 in malignen Mammagewebe gegenüber den benignen Geweben signifikant erhöht ist. Die Proteinexpression war um das 2,7-fache und die RNA-Expression der 1,1 kb und der 2,4 kb Isoform um das 1,4- und 2,4-fache erhöht (Schnelzer *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Expression von Rac1 wie bei den meisten eukaryontischen Genen auf Transkriptionsebene reguliert wird.

## 2. Fragestellung

Die kleine Rho-GTPase Rac1 ist an Umbauvorgängen des Zytoskeletts, in den Kaskaden von Signaltransduktionswegen, in der Zellzyklusprogression und der Zellbewegung beteiligt. Es gibt drei mögliche Gründe für die erhöhte Aktivität von Rac1 und Rho-GTPasen: Erstens, es entsteht eine Daueraktivierung durch mutationsbedingte Konformationsänderung. Zweitens, regulierende GEFs, GAPs und GDIs sind selbst überexprimiert oder konstitutiv aktiv und führen so zu vermehrter Aktivierung des Proteins. Drittens, das Protein wird vermehrt produziert, so dass quantitativ mehr Protein zur Aktivierung zur Verfügung steht. Genetische Variationen mit Folge der Daueraktivierung konnten bis jetzt *in vivo* nicht festgestellt werden. Das weitreichende Geflecht aus regulierenden Faktoren für Rho-GTPasen wurde nur *in vitro* erschlossen. Das Vorliegen und die Überexpression konstitutiv-aktiver Formen der GEFs, GAPs und GDIs als auch die direkte Beeinflussung der Rho-Proteine in Tumoren wurden *in vivo* nur wenig untersucht. Die Erkenntnis, dass 90 % der eukaryontischen Gene auf Transkriptionsebene reguliert werden, und die erhöhte Expression von Rac1 auf RNA- und Proteinebene in Mammakarzinomgewebe führen zur Postulierung einer regulativen Einheit auf DNA-Ebene. Da Rac1 ein so wichtiges Signalprotein ist, war es ein Ziel dieser Arbeit, nach dem Rac1-Gen und Rac1-Pseudogenen zu suchen und herauszufinden, inwieweit diese transkriptionell aktiviert werden. Dabei wurden folgende Fragestellungen im Zuge des Projektes bearbeitet:

1. Wie lässt sich die Promotorsequenz des Rac1-Gens erschließen ?
2. Wie kann man die gefundene Sequenz als Rac1-Pseudogen und dessen Promotor identifizieren und auf DNA-Ebene von dem 'echten' Rac1-Gen unterscheiden ?
3. Welche promotortypischen Elemente besitzt der gefundene Rac1-Pseudogen-Promotor ?
4. Hat der Rac1-Pseudogenpromotor transkriptionelle Aktivität und lässt sich diese Aktivität stimulieren ?
5. Wo ist die Grenze zwischen 5'-untranslatierter Region des Rac1-Gens und dem Ende des Rac1-Promotors ?
6. Wie sieht die Proteinexpression von Rac1 in Gewebeproben von Adenokarzinomen des Kolons im Vergleich zu normaler Kolonschleimhaut aus ?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Materialien**

##### **Firmen und Reagenzien**

- Amersham Pharmacia Biotech, Bedford, USA: CIAP (Calf-intestinale-alkalische Phosphatase), ECL-Lösung (Nr.RPN-2106), Hybond-N Nylonmembran (Nr.RPN-203 N), Hyperfilm ECL (Nr.RPN 1678H), Microspin G-25 Säulen (Nr.27-5325), mRNA Purification Kit (Nr.27-9258-01), Sephadex G-50 Säulen (Nr.27-9285-05)
- Amresco, Solon, USA: APS
- Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg: Anti-rac mouse monoklonaler Antikörper (Nr.05-398), 200 µl-PCR-Tubes
- Biorad, California, USA: Elektrophoresekammer, Gelkammer (Vol. 100 ml)
- Boehringer-Mannheim/Roche, Penzberg: ATP, Expand High Fidelity DNA-Polymerase (Nr.1732641), dNTP's, hPDGF B/B rekombinant (Nr.1276956), 10x Hexanukleotide (Nr.1277081), Klenow-Enzym (Nr.1008404), Restriktionsenzyme und Puffer, Superscript RT, T4 DNA-Ligase (Nr.716359), t-RNA (Nr.109517)
- Calbiochem Novabiochem, Bad Soden: IL-1 $\beta$  human-rekombinant (Nr.407615)
- Clontech, California, USA: Human GenomeWalker Kit (Nr. K1803-1)
- Dako Diagnostics, Zug, Schweiz: DAKO ChemMate Detection-Kit, Peroxidase/DAB, rabbit/mouse (Nr.K 5001)
- Difco Laboratories, Detroit, USA: Bacto Agar, Yeast Extract, Tryptone Peptone
- Gibco BRL LifeTechnologies, Karlsruhe: BenchMark Prestained Proteinladder (Nr.10748-010), DH5 $\alpha$ -kompetente Zellen (Nr.18265-017), DNA-ladder 1kb, Lipofectamin (Nr.18324-012), HEPES, PBS
- Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz: Glaszylinderspritze
- Hybaid-AGS, Heidelberg: RNA-Clean (Nr.828010)
- ICN Biomedicals, Aurora, USA: [1,2-<sup>14</sup>C]-Chloramphenicol (Nr.12060E25), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP, Sodiumdodecylsulfat (SDS), Tris-HCl, UREA
- Invitrogen, Groningen, Niederlande: TOPO TA Cloning Kit (Nr. K4500-01)
- Macherey&Nagel, Dueren: Nucleobond AX 500 Maxiprep, NucleoSpin Extract Kit
- Merck, Darmstadt:  $\beta$ -Mercaptoethanol, Chloroform, Ethanol pro analysi, Ethidiumbromid, Formaldehyd, Gelatine, Glycerin, Lithiumchlorid, Methanol, Natriumchlorid, TEMED
- Nalgene Nunc International, Wiesbaden: Cellscrapper
- New England Biolabs, England: Restriktionsenzyme und Puffer



- Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen: DNA-ladder 1kb, DNA-ladder 100bp, peqGOLD Universal Agarose
- Perkin&Ellmer/Cetus, Norwalk, USA: Multiscribe RT (Reverse Transkriptase)
- Pierce, Rockford, USA: BCA-Protein Assay (Nr.23223), bovines Serumalbumin (BSA)
- Promega, Mannheim: Primer Extension Assay (Nr.E3030), Human genomic DNA (Nr.G3041)
- Qiagen, Hilden: Large-construct Kit (Nr.12462), Qiaprep Spin, Taq PCR Mastermix Kit (Nr.201445)
- Roth, Karlsruhe: Acrylamid Rotiophor, Glycin, Triton X-100
- Santa Cruz, Santa Cruz, USA: Anti-mouse IgG-HRP polyklonaler Antikörper, (Nr. SC-2005),
- Schleicher&Schuell, Dassel: Optitran-Nitrozellulosepapier BA S85 0,45 µm (Nr.439194)
- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim: Ampicillin, Aprotinin, Borsäure, Bromphenolblau, Bromphenol Blue-Xylenecyanol Dye Solution (Nr.B-3269), DEPC-H<sub>2</sub>O, EDTA, Essigsäure, Glycerol, Kanamycin, Magnesiumchlorid, MOPS (3-[n-Morpholino]-Propansulfonat), Natriumacetat, Natriumfluorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumhydroxid, oNPG, Natrium-ortho-Vanadat, Natrium-Pyrophosphat, PCI (Phenol-Chloroform-Isoamyl) 25:24:1 (Nr.P-3803), PMSF, TEN, Tri-Natriumcitrat
- Whatman, Maidstone, England: 3 mm Papier

#### **Zellkultur:**

- Falcon/Becton Dickinson, Plymouth, England: Petrischalen (Nr.531029)
- Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe: DMEM with Glutamax, GAM, FCS (Nr.10270-106), HEPES, PBS, EDTA in PBS
- Merck, Darmstadt: Trypanblau, Neubauer-Zählkammer
- Seromed-Biochrom KG, Berlin: Penicillin/Streptomycin, Trypsin 2,5 %
- Sigma-Aldrich GmbH Steinheim: L-Arginin (Nr.A-3909), L-Asparagin (Nr.A-4159)
- Falcon, Plymouth, England: Kulturflaschen T175/T75, Röhrchen 50 ml/10 ml, 6-well-Plates

#### **Primer und Vektoren:**

- MWG, Ebersberg: PCR-Cycler Primus, Oligonukleotidprimer

- Toplap/Metabion, Martinsried: Oligonukleotidprimer
- Promega, Mannheim: pG13 Basic Vektor (Nr. E1751)
- Invitrogen, Carlsbad, USA: pCR 2.1 TOPO Klonierungsvektor (Nr. K4500-01)
- Ressourcencenter des Deutschen Humanen Genomprojekts, Berlin: pCYPAC2 Vektor

#### **Auswertung:**

Das Nukleotidsequenzprogramm Generunner Version 3.04 von der Firma Hastings Corporation wurde zur Verarbeitung und Aufbereitung der durch Sequenzierung gewonnenen Daten verwendet. PCR-Ergebnisse und Restriktionsanalysen wurden mit einer Polaroid Sofortbildkamera aufgenommen. Western Blot, Southern Blot, die Primerextension, Ergebnisse der PCR und der Restriktionsanalysen wurden mit dem Epson-Scanner GT-9500 eingelesen. Die quantitative Auswertung der Western Blot Analysen erfolgte mit dem Programm Sigma ScanPro, das uns freundlicherweise von Frau Dr. med. Engelhardt aus der Abteilung für Anaesthesiologie im Klinikum rechts der Isar zur Verfügung gestellt wurde.

#### 3.2 DNA-Analysen

##### **Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) ist eine *in vitro*-Technik, mit der Abschnitte der DNA, die von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt werden, nach dem Prinzip der DNA-Replikation gezielt vervielfältigt sind. Sie ermöglicht die Amplifizierung spezifischer Genabschnitte, auch wenn die Menge an Ausgangsmaterial sehr gering ist.

Drei Grundkomponenten bilden das Ausgangsmaterial für die PCR-Reaktion: die DNA, das Enzym DNA-Polymerase und die Primer. Die einzelsträngige DNA stellt die Matrize („template“) für die Neusynthese eines zu ihr komplementären Stranges dar. Das Enzym Taq-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Lawyer *et al.*, 1989) und ist eine DNA-abhängige DNA-Polymerase. Sie eignet sich wegen ihrer Hitzebeständigkeit hervorragend für den temperaturabhängigen Syntheszyklus (Mullis and Faloona, 1987). Um DNA amplifizieren zu können, benötigt sie als Starthilfe einzelsträngige DNA-Moleküle (Primer), die komplementär zur DNA-Matrize sind. Nach deren Anlagerung verlängert die DNA-Polymerase in der Gegenwart von Einzelnukleotiden (dNTP's) die Primer und synthetisiert so einen neuen Komplementärstrang entlang der ursprünglichen Einzelstrangsequenz.

Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der DNA bei 94°C zu Einzelsträngen („denaturation“). Als Zweites wird die Temperatur auf ein primerspezifisches Niveau ( $T_m$ )



### Genomewalking

Ein „Genomewalking“ (Siebert *et al.*, 1995) ermöglicht es, von einer bekannten DNA-Sequenz aus eine unbekannte Genregion in 5'-Richtung, z.B. einen vor einem Gen liegenden Promotor oder in 3'-Richtung, z.B. ein hinter einem Exon liegendes Intron, zu erschließen. Hierzu wird genomische DNA mit Restriktionsenzymen verdaut. An die Enden der entstandenen Fragmente werden Adaptoren gehängt, die Primersequenzen enthalten. Nun wird mittels PCR mit einem Adaptorprimer (AP) und einem Primer aus der bekannten Sequenz (GSP) ein DNA-Fragment amplifiziert, das je nach Verdau unterschiedliche Länge hat und die Nachbarregion repräsentiert. Durch Agarosegelelektrophorese lässt sich das Fragment auffinden und nach Aufreinigung in einen Vektor zum Zwecke der Sequenzierung einklonieren. Eine nachgeschaltete "nested" PCR mit innerhalb der vorherigen Primersequenzen liegenden Oligonukleotiden kann die Menge an spezifischem Produkt noch erhöhen.

Puffer und Lösungen: aus dem Human GenomeWalker Kit (Clontech)

Primer für das Genomewalking (20 pm/μl):

- Rac1 32 as:  
5'-TCT CCC ACC ACC ACA CAC TTG ATG GCC TGC-3'
- Rac1 62 as:  
5'-GAT CAG TAG GCA AGT TTT ACC TAC AGC TCC G-3'

Durchführung:

Der Kit enthält bereits die mit 5 verschiedenen Enzymen geschnittene und mit Genadaptoren versehene genomische DNA, die als Ausgangsmaterial für die Amplifikations-schritte vorlag. Für die erste PCR wurden die Primer *AP1* und *rac1 62 as*, für die "nested" PCR die Primer *AP2* und *rac1 32 as* benutzt. In der Tabelle ist der Ablauf der beiden Amplifikationen angegeben:

7 Zyklen	94°C	25 s
	72°C	3 min
25 Zyklen	94°C	25 s
	67°C	3 min
1 Zyklus	67°C	7 min

Die Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, die benötigte Bande ausgeschnitten und nach Eluierung aus dem Gel sequenziert.

### Mutagenese-PCR

Mit der Mutagenese-PCR (Hemsley *et al.*, 1989) können in einer DNA-Sequenz einzelne Basen abgewandelt werden, z.B. bei der Veränderung von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in einem DNA-Fragment. Das zentrale Element dieser speziellen PCR ist der Mutageneseprimer („mismatch“-Primer). Er besteht aus zwei kurzen Sequenzen, die komplementär zu dem Ausgangsstrang sind, 5'- und 3'-Klammer („clamp“) genannt. Dazwischen liegt eine Basenfolge, welche die Erkennungssequenz für ein bestimmtes Restriktionsenzym enthält. Bei dem Primerentwurf wird auf der DNA-Matrize eine Region aufgesucht, die sich von der Erkennungssequenz nur durch 1-2 Basen unterscheidet („mismatches“) und die sich in GC-reicher Umgebung befindet. Es wird darauf geachtet, dass der Primer eine Gesamtlänge von 27-36 Basen mit 8-12 Basen langen Klammern hat, ein GC-Gehalt von 50-60 % vorliegt und bei der Berechnung der  $T_m$  die „mismatches“ sowohl im GC-Gehalt als auch in der Länge des Primers nicht berücksichtigt werden sollten. Für die Berechnung der  $T_m$  wurde folgende Formel (Rychlik *et al.*, 1990) verwendet:

$$T_m = 0,41 \cdot (\%G + \%C) + 16,6 \log [K^+] - 675 \cdot 1/\text{Primerlänge}$$

Führt man eine PCR mit „mismatch“-Primern durch, kommt es zur Anlagerung der Primer an die DNA-Matrize und deren Verlängerung. Nach Erhitzen wird der Doppelstrang in Einzelstränge aufgeteilt, ergeben sich durch die enthaltene Primersequenz zwei Vorlagen mit veränderter Basenpaarfolge und die beiden ursprünglichen Einzelstränge. Werden jetzt nach dem „annealing“ die neuen Vorlagen verlängert, kommt es zum Einbau der neuen Basen an den Stellen der „mismatches“. Die Amplifikate aller folgenden Zyklen enthalten nun zur Hälfte die veränderte Sequenz.

#### Puffer und Lösungen:

10x Expand HF Puffer                      20 mM Tris-HCl; pH 7,5, 100 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>,  
1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Tween, H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Nukleotide:                                      10 mM dNTP-Mix; je 2,5 mM dATP, dTTP, dCTP,  
dGTP

#### Primer für die pGI3-Konstrukte (20 pm/μl):

- Rac1-4100 Xho se:  
5'-GTT CCA CTG GAA GGC TCG AGT TTC CTG TTT C-3'
- Rac1-2000PstXho se:  
5'-GGG AAA GGG TTC TGC AGT CTC GAG ACA TTA CCT GGG-3'
- Rac1-1300 Xho se:  
5'-AAA CAG CTG CAG CTC GAG CTC CCT GAG TAG CTC CTT-3'

- **Rac1 Nco mut as:**

5'-TGG CCT CCA TGG GGG CCG CTC GCT GGG-3'

#### Durchführung:

Für die Mutagenese-PCR wurde ausschließlich hoch aufgereinigte Vektor-DNA der auf Insert positiven pCYPAC-Klone 5 und 6 verwendet. Die eingesetzte Menge betrug 100-350 ng. In 50 µl Ansatz fanden sich 2,6 U Expand HF DNA-Polymerase, 1x Expand HF Puffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Stammlösung 25 mM), 0,8 mM dNTP's, 0,4 µM Primer „se“ und 0,4 µM Primer „as“ als Endkonzentrationen. Die Expand HF Polymerase wurde als letztes zugegeben und die PCR-Tubes in die bereits vorgeheizte PCR-Maschine gesetzt. Der Heißstart der PCR hat sich bei der Expand Polymerase als vorteilhaft erwiesen. Je nach Länge der zu synthetisierenden Sequenz wurde die Zeitspanne für die Primerverlängerung erhöht. Der Ablauf der Amplifikation sah folgendermassen aus:

1 Zyklus	94°C	4 min	
30 Zyklen	94°C	30 s	
	T <sub>m</sub>	30 s	
	72°C	45 s	< 0,75 kb
		60 s	0,75-1,5 kb
		120 s	1,5-3,0 kb
240 s		3,0-6,0 kb	
1 Zyklus	72°C	10 min	

#### Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht es, DNA-Moleküle ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Die Agarose bildet nach Polymerisation ein dreidimensionales Maschenwerk. In einem elektrischen Feld durch das Gel verlangsamt sie die Wanderung der negativ geladenen DNA zur Anode größenspezifisch.

#### Puffer und Lösungen:

50x TAE-Puffer	4 M Tris-HCl; pH 8,2 2 M Essigsäure 0,2 M EDTA (lichtgeschützt aufbewahren, vor Gebrauch 1x Puffer mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> herstellen)
Ethidiumbromid	10 µg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (kanzerogen)
DNA-Auftragspuffer	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol



Alternativ kann die DNA auch mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  eluiert werden, wenn Folgeschritte die Abwesenheit von TE-Puffer erforderlich machen.

### **Subklonierung von PCR-Produkten**

Bei der Subklonierung wird ein PCR-Produkt direkt in einen Vektor inkloniert, ohne dabei den Umweg über Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation nehmen zu müssen. Die Methode (Sambrook *et al.*, 1989) eignet sich vor allem zur Unterscheidung einzelner PCR-Produkte aus einer Probe, zur Sequenzierung und zur Erstellung von DNA-Bibliotheken. Da die Taq-Polymerase neben der DNA-Synthesefunktion auch eine terminale Nukleotidtransferase-Aktivität hat, hängt sie an die 3'-Enden des Amplifikats das Nukleotid Adenosin (dATP). Besitzt ein linearisierter Vektor an seinen Enden einen Überhang von Thymidin, werden die Enden des Vektors und des PCR-Produkts durch das Enzym Topoisomerase miteinander verbunden. Das neue Plasmid kann in Bakterien transformiert, vervielfältigt und analysiert werden. Der Einbau der Amplifikate geschieht dabei unselektiv, so dass Klone geschaffen werden können, die Unterschiede in Länge oder Eigenschaften aufweisen. Für die Subklonierung des Genomewalking-Ergebnisses wurde das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) benutzt. Der Vektor pCR 2.1 TOPO liegt hier in linearisierter Form mit Topoisomeraseenzymen an beiden Enden vor.

Durchführung:

Nach Beendigung der Agarosegelelektrophorese wurde die zu untersuchende Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Nach Schmelzen der Agarose in einem 50°C heißen Heizblock wurden 5 µl des Agarose-DNA-Gemisches entnommen und mit 1 µl pCR 2.1 TOPO Vektor vermischt. Die Ligation der enthaltenen PCR-Produkte in den Vektor erfolgte bei 37°C für 5 min.

### **Transformation von Plasmid-DNA**

Als Transformation wird die Übertragung eines Plasmids in eine Bakterienzelle bezeichnet. Die Zellwand kompetenter Bakterienstämme wird chemisch oder thermisch permeabilisiert. Die eingebrachten Plasmide besitzen Resistenzfaktoren gegen bestimmte Antibiotika, z.B. Ampicillin oder Kanamycin. Ihre Expression führt zur Selektion eines Klons in dem Medium, das das Antibiotikum enthält. Neben der Ampicillinresistenz besitzt der Vektor pCR 2.1 TOPO das Gen LacZ in gespaltener Form, das für ein Enzym kodiert, das die Umwandlung von X-Gal in einen blauen Farbstoff katalysiert. Werden die Enden dieses



Vektors ohne Einsetzen eines PCR-Produkts wieder verbunden, so wird das LacZ-Gen zusammengesetzt und exprimiert, was sich in einer Blaufärbung der Kolonien auf LB-Agar zeigt. Blaufärbung bedeutet nach der Transformation, dass kein Gen enthalten ist.

Puffer und Lösungen:

Kompetente Zellen	E. coli TOP-10F' One Shot (TOPO TA-Cloning Kit) E.coli DH5 $\alpha$ (Lagerung bei $-70^{\circ}\text{C}$ )
SOC-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefe Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 10 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 20 mM Glucose
LB-(Luria-Bertani) Medium	0,5 % NaCl 0,5 % Hefeextrakt 1 % Trypton mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen; umgehend autoklavieren
LB-Agar	1,5 % Bactoagar (15 g/l LB-Medium), autoklavieren
X-Gal (40 mg/ml, $-20^{\circ}\text{C}$ )	20 mg X-Gal (gelöst in 500 $\mu\text{l}$ Dimethylformamid)
Ampicillin (Stammlösung)	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ( $-20^{\circ}\text{C}$ )
Kanamycin (Stammlösung)	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ( $-20^{\circ}\text{C}$ )

Durchführung:

10  $\mu\text{l}$  von *E. coli* TOP-10F' „One Shot“ Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  des Ansatzes der TOPO-Subklonierung wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert und danach bei  $42^{\circ}\text{C}$  für genau 30 s einem Hitzeschock ausgesetzt. Es folgte eine Abkühlung der Zellen für 2 min auf Eis. Im nächsten Schritt wurden 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium ohne Antibiotikum zugegeben und die Suspension nach vorsichtigem Mischen bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 250 rpm für 30 min in einem Bakterienrüttler inkubiert. Währenddessen wurden Agarplatten mit einer Ampicillinkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  vorgewärmt und mit 40  $\mu\text{l}$  X-Gal beschichtet. Auf jede Platte wurden dann 150  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension mit einem abgeflamnten Glasspatel ausplattiert und die Agarplatten über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien ohne Blaufärbung gepickt und in 5 ml LB-Medium, das 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin enthielt, über Nacht kultiviert.

Für die Transformation der klonierten Rac1-Pseudogenpromotor Konstrukte wurden DH5 $\alpha$ -kompetente Zellen benutzt. Hier wurde zu 30  $\mu$ l aufgetauten Zellen 5  $\mu$ l Ligationsansatz gegeben, nach 30-minütiger Inkubation auf Eis die Suspension für 90 s auf 42°C erhitzt und nach der Abkühlungsphase weiter wie oben beschrieben verfahren. Da der pGl3-Vektor kein LacZ-Gen besitzt, erfolgte die Verifizierung der Klone mit Insert durch eine Restriktionsanalyse der isolierten DNA.

Für die selektive Anzucht der pCYPAC-Klone des DHGP in Vorkulturen wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kanamycinkonzentration von 25  $\mu$ g/ml verwendet.

### **Extraktion und Aufreinigung von DNA**

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienzellen werden die Verfahren der Minipräparation und der Anionenaustausch-Plasmidaufreinigung benutzt, die DNA in unterschiedlicher Menge und Reinheit zu Tage fördern. Ihnen allen liegt das Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) mit NaOH zugrunde. Durch Zugabe einer 2,6 M Kaliumazetatlösung werden nachfolgend Zelltrümmer, Proteine und SDS ausgefällt und mittels Zentrifugation entfernt. Nach Präzipitation der im Überstand vorliegenden DNA mit Isopropanol kann diese zu Restriktionsanalysen und PCR verwendet werden.

Im anschließenden Teil wird der Vorgang der Minipräparation exemplarisch abgehandelt. Die zur DNA-Aufreinigung eingesetzten Fertigkits weisen modifizierte Formen der alkalischen Lyse auf und sind zusätzlich mit Schritten der Hochaufreinigung mit Anionenaustauschersäulen kombiniert. Die gewonnene DNA besitzt ein hohes Maß an Reinheit und kann sequenziert werden.

#### **Lösungen und Puffer:**

Puffer 1	50 mM Tris-HCl; pH 7,5-8,0 10 mM EDTA; pH 8,0 100 $\mu$ g/ml RNase A (Lagerung bei 4 °C)
Puffer 2	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer 3	2,6 M Kaliumazetat; pH 5,2 (Lagerung bei 4 °C)

#### **Durchführung:**

Aus der Vorkultur wurden 2 ml entnommen und bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 200  $\mu$ l Puffer P1 resuspendiert.

Die Zugabe von 200 µl Puffer P2 setzte die Zellyse in Gang, wurde nach 5 min durch Zugabe von 200 µl des Puffers P3 beendet und die einzelnen Zellelemente für 5 min auf Eis ausgefällt. Bei 14.000 rpm und 4°C für 5 min wurden die Präzipitate abzentrifugiert und danach der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis der Überstand frei von weißem Niederschlag war. Zu dem Überstand wurden bei RT 420 µl Isopropanol (70%) gegeben, um die enthaltene DNA auszufällen. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 4°C wurde die Plasmid-DNA bei 14.000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet 2x mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und bei 14.000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Heizblock oder in der speed-vac-Zentrifuge bei 50°C getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgelöst. Die Plasmid-DNA wurde entweder photometrisch gemessen und mittels Restriktionsanalyse weiter untersucht oder bei 4°C gelagert.

### **Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration/RNA-Konzentration**

Aromatische Ringsysteme der DNA-Moleküle können Lichtwellen im Bereich von 220-320 nm absorbieren. Diese Eigenschaft macht man sich bei der spektralphotometrischen Vermessung von DNA zu Nutze. In eine Quarzküvette werden nach Leerwert Eichung mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 10 µl der DNA-Lösung gegeben, diese dem Strahlengang in einem Eppendorf-Photometer ausgesetzt und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zur Auswertung der ermittelten Absorptionswerte werden folgende Zusammenhänge benutzt:

Für Doppelstrang-DNA gilt: 1 OD<sub>260</sub> entspricht 50 µg DNA

$$c_{\text{DNA}} = \frac{\text{gemessene OD}_{260} \cdot 50 \mu\text{g}}{V_{\text{Probe}}}$$

Zur Kontrolle der Reinheit von DNA-Proben werden Absorptionsspektren bei Wellenlängen von 100-400 nm gemessen und Verhältnisse der Absorptionswerte bestimmter Wellenlängen gebildet: E<sub>260</sub>/E<sub>280</sub> und E<sub>260</sub>/E<sub>230</sub>. Diese Quotienten sind bei Verunreinigungen der Probe durch Protein verändert.

Die RNA hat ähnliche photometrische Eigenschaften wie DNA und wird zur Konzentrationsbestimmung ebenfalls bei 260 nm gemessen.

Für Einzelstrang-RNA gilt: 1 OD<sub>260</sub> entspricht 40 µg RNA

Da die RNA in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst wird muss die Leerwert Eichung der Quarzküvette hier mit DEPC-H<sub>2</sub>O erfolgen.

#### **Restriktionsanalyse**

Die Restriktionsanalyse ist ein Vorgang, bei dem doppelsträngige DNA von spezifischen Restriktionsendonukleasen an Stellen mit bestimmter Erkennungssequenz zerschnitten wird. Es können so einerseits Plasmide auf ihre Größe oder das Vorhandensein eines einklonierten Fragments überprüft werden und andererseits Vektoren und Produkte aus der Mutagenese-PCR an den Enden für eine gerichtete Klonierung vorbereitet werden. Durch eine folgende Agarosegelelektrophorese werden die geschnittenen DNA-Stücke auf ihre Größe und ihr Schnittmuster überprüfbar.

Bei der gerichteten Klonierung werden 5'- und 3'-Ende des Vektors und des einzuklonierenden Fragments mit zwei unterschiedlichen Enzymen geschnitten. Wird das Fragment dann in den Vektor eingefügt, so ist durch die verschiedenen Schnittsequenzen seine Richtung bereits vorbestimmt. Um beispielsweise einen Genpromotor auf seine Aktivität zu überprüfen, muss er vor einem Reportergen in derselben Richtung liegen wie vor seinem ursprünglichen Gen, was durch diese Methode erreicht werden kann.

#### **Durchführung:**

Für einen Kontrollrestriktionsansatz wurde 1 µg DNA mit 10 U Enzym benutzt, für einen Verdau mit nachfolgender Klonierung 3 µg Vektor und 5 µg Insert mit 20 U Enzym. Die Erhöhung der Enzymmenge bei der Klonierung trägt der Tatsache Rechnung, dass Insert und Vektor vollständig geschnitten sein müssen, um optimale Bedingungen für die spätere Ligation zu schaffen. Bei Restriktionen mit zwei Enzymen wurde die Kompatibilität auf Kombinationstabellen der Firmen geprüft. Der Ansatz wurde für 2-3 h bei 37°C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme bei 72°C für 10 min (B/M) bzw. bei 65°C für 20 min (NEB) inaktiviert. Die DNA von Vektor und Fragment wurde danach durch Phenol-Chloroform-Isoamyl (PCI) gefällt. Bei einem Kontrollverdau erfolgte nachfolgend eine Agarosegelelektrophorese.

#### **Phenol-Chloroform-Isoamyl-Fällung**

Diese Methode beinhaltet sowohl die Aufreinigung als auch die Fällung von DNA. Phenol-Chloroform-Isoamyl (PCI) besteht aus einer wässrigen (unten) und einer organischen Phase (oben). Nach Zentrifugation erscheint die DNA in der wässrigen Phase, während Proteine in der organischen Phase verbleiben. So können z.B. Bestandteile eines Restriktionsansatzes entzogen und die separierte DNA präzipitiert werden.

Durchführung:

Die Restriktionsansätze des Vektors und des Fragmentes wurden nach dieser Methode behandelt. Der Ansatz von 50 µl wurde im Verhältnis 1:1 (= 50 µl) mit PCI (25:24:1) unter dem Abzug aufgefüllt, für 15 s gemischt und bei 13.000 rpm und RT für 5 min zentrifugiert. Die untere (wässrige) Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Wiederholung des PCI-Schrittes erfolgte nach Zugabe von 5 µl 4 molarem Lithiumchlorid (0,1 Vol. der wässrigen Phase) und 125 µl Ethanol 100 % (2,5 Vol. der wässrigen Phase) die Fällung der DNA bei -20°C für 20 min. Der Niederschlag wurde bei 13.000 rpm und 4°C für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde 2x jeweils mit 500 µl Ethanol 70 % gewaschen und danach bei 13.000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Das im Heizblock getrocknete Pellet wurde in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst.

### **Dephosphorylierung von DNA**

Als Dephosphorylierung bezeichnet man einen Vorgang, bei dem die Phosphatgruppen an den 5'-Enden einer Doppelstrang-DNA durch eine Phosphatase abgespalten werden. Hierdurch kann beispielsweise bei einer Klonierung die spontane Religation eines mit Restriktionsenzymen geschnittenen Vektors verhindert werden.

Durchführung:

Der mit PCI gefällte pGI3-Vektor wurde mit der „calf-intestinale-alkaline-phosphatase“ (CIAP) dephosphoryliert. Der 50 µl Reaktionsansatz enthält 5 µl 10x CIAP-Puffer, 3 µl CIAP und 42 µl Vektor (2-3 µg) in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>. Die DNA wurde bei 37°C für 60 min dephosphoryliert, das Plasmid mittels PCI-Fällung erneut aufgereinigt und zuletzt in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst.

### **Ligation**

Das Enzym DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Einklonierung von Fragmenten in einen Vektor zunutze.

Lösungen und Puffer:

10x Ligationpuffer	660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM Dithioerythrit, 10 mM ATP; pH 7,5
--------------------	--

#### Durchführung:

Vor der Ligation wurden die DNA-Konzentrationen des dephosphorylierten Vektors und des Fragments gemessen. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert sollte 1:3 - 1:5 betragen (Sambrook *et al.*, 1989). Da die Anwesenheit energiereicher Phosphate unabdingbar ist, wurde der Reaktion zusätzlich ATP zugefügt. Die DNA und  $H_2O_{bidest}$  wurden zusammengegeben und bei 45°C im Wasserbad für 5 min inkubiert. Dadurch werden Sekundärstrukturen der DNA-Stränge, die den Ligationsvorgang behindern, aufgelöst. Danach wurden die Reaktionsgefäße sofort auf Eis gesetzt. Nach Zugabe des 10x Ligase-Puffers, ATP (10 mM) und der T<sub>4</sub>-Ligase und kurzem Abzentrifugieren erfolgte die Ligation der DNA bei 16°C für 12 h. Am nächsten Tag wurden die Ligationen in DH5 $\alpha$ -kompetente Zellen transformiert und auf Agarplatten ausplattiert (siehe Subklonierung). Von den gewachsenen Kolonien wurden Übernachtskulturen hergestellt, deren DNA mit der Minipräparation aufgereinigt und durch Restriktionsanalyse in Verbindung mit einer Agarosegelelektrophorese auf das eingefügte Fragment überprüft. Die pGI3-Promotorkonstrukte -877 bp, -1299 bp, -2053 bp und -4074 bp wurden danach mit dem Maxiprep-Verfahren hochaufgereinigt und die Ligationsbereiche sequenziert, um die Richtung der Inserts in Bezug auf das Reporter-gen und die „in-frame“-Klonierung, d.h. die Ausrichtung der Pseudogen-promotorsequenz im selben Abstand zum Reporter-gen wie zu dem Ursprungsen, zu kontrollieren. Im Anschluss daran wurden Zelltransfektionen mit den erstellten Plasmiden unternommen.

#### Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen für dieses Projekt wurden von der Firma Toplap, Martinsried, der Firma MWG-Biotech, Ebersberg und der Abteilung für molekulare Genetik des Max-Planck-Institutes in Berlin (Leitung: Dr. Reinhardt) durchgeführt. Die Sequenzierung ermöglicht die genaue Feststellung der Basenfolge von Abschnitten doppel- und einzelsträngiger DNA. Hierfür stehen Methoden zu Verfügung, die entweder radioaktive oder fluoreszierende Marker zur Detektion benutzen. Die Sequenzierung mittels Fluoreszenzfarbstoff markierter Didesoxyanaloga beginnt mit dem primerinitiierten DNA-Syntheseprozess, bei der zu den normalen Basen dATP, dTTP, dCTP und dGTP zusätzlich die 2',3'-Didesoxyanaloga der vier Basen gegeben werden. Nach deren Einbau kommt es zu einem Abbruch der Strangsynthese, da am 3'-Ende die Hydroxylgruppe für die Phosphodiesterbindung mit einem energiereichen Phosphat und damit dem Einbau einer

neuen Base fehlt. Es entstehen Fragmente unterschiedlicher Größe, die in einem Sequenziergel aufgetrennt werden. Da jede Didesoxy-Base mit einem Farbstoff markiert ist, der bei Anregung Licht einer anderen Wellenlänge aussendet, können die nach ihrer Größe im Gel aufgereihten Fragmente mit einem Laser abgetastet und die Maxima der Lichtemissionen mit einer Photoelektrode gemessen werden. Die Abfolge der Maxima der vier unterschiedlichen Wellenlängen gibt genauen Aufschluss über die Basensequenz.

### Southern Blot Analyse

Unter Southernblotting versteht man den Transfer von DNA-Fragmenten von einem Elektrophoresegel auf eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran (Bittner *et al.*, 1980). Die dort immobilisierte DNA kann dann mit radioaktiv markierten Gensonden hybridisiert werden. In dieser Arbeit wurde die Southern Blot Analyse dazu benutzt, um die Existenz des Rac1-Gens und des Rac1-Pseudogens nachzuweisen.

#### Lösungen und Puffer:

DNA-Auftragspuffer	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol 50 % Glycerin 5 % 20x TAE-Puffer
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,0
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitrat pH 7,0 mit HCl einstellen
Church-Puffer	0,5 M NaPO <sub>4</sub> , pH 7,5 1 mM EDTA 7 % SDS
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0

#### Durchführung:

Humane genomische DNA (Promega), aus RKO-Zellen extrahierte genomische DNA und als Kontrolle die in den Vektor pcDNA 3.1 einklonierte Rac1-cDNA-Sequenz (hergestellt von Dr. rer. nat. A. Fenn-Rottler 1998) dienten als Ausgangsmaterial für die Southern Blot

Analyse. Es wurde jeweils 15 µg DNA pro Ansatz mit den einzelnen Restriktionsendonukleasen AluI, HaeIII und HphI (high concentration) über Nacht bei 37°C verdaut, wobei der Kontrolle zusätzlich das Enzym EcoRI zur Entfernung des Vektors zugesetzt wurde. Am nächsten Tag wurde eine Gelelektrophorese in TAE-Puffer mit einem 1,5 % Agarosegel durchgeführt, um die Fragmente aufzutrennen. Das Ergebnis wurde mit einem angelegten Lineal unter UV-Licht (302 nm) photographiert und nachfolgend zuerst 5 min in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, dann 40 min in 0,25 M HCl-Lösung und danach 2x in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> für 3 min gewaschen. Das Gel wurde 2x für 20 min auf einem Schüttler rotierend mit Denaturierungslösung gespült, wieder 2x mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> für 3 min abgewaschen und im nächsten Schritt 2x 20 min mit Neutralisierungslösung unter Rotation gespült. Diese Waschschrte dienen zur Senkung des pH-Wertes des Gels unter 9, da sonst der DNA-Transfer erschwert ist. Für die Übertragung wurde der Kapillarblot nach folgendem Schema aufgebaut (Abb. 8):

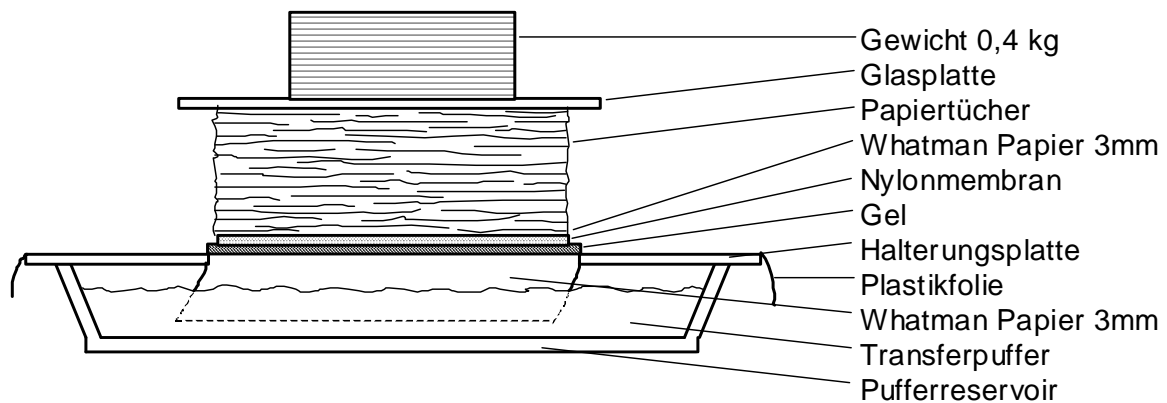


Abbildung 8: **Aufbau des Kapillarblots**

Der Transfer auf die Nylonmembran erfolgte über Nacht in 20x SSC-Puffer. Die Nylonmembran wurde nacheinander kurz mit 0,1x SSC, 1 % SDS und H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen und anschließend bei 80°C für 2 h gebacken. Zur Immobilisierung der DNA auf der Membran wird diese mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm für 12 s bestrahlt, um die kovalente Vernetzung der DNA-Moleküle zu ermöglichen. Darauffolgend muss die Nylonmembran prähybridisiert werden. Dazu wird die DNA mit tRNA-Molekülen besetzt, um unspezifische Bindungen zu vermindern (vgl. Gelatine beim Western Blot). Es wurde in ein Glashybridisierungsrohr 20 ml vorgewärmter Churchpuffer und 250 µl tRNA gegeben, die Membran eingelegt und in einem Hybridisierungssofen bei 65°C rotierend für mindestens 1 h inkubiert.



Für die folgende Hybridisierung wird nun die DNA-Sonde radioaktiv markiert. Hierzu wurde Rac1-cDNA mit den Enzymen HindIII und XhoI aus dem pcDNA-Vektor 3.1 ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Markierung des Rac1-Fragmentes wurde mit einem „random-primed-DNA-labelling“ Kit durchgeführt. Der Reaktionsansatz von 20 µl enthielt 3 µl DNA-Sonde (~25 µg), 2 µl 10x Hexanukleotide, 3 µl 10 mM dNTP's, 2 µl [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP (50 µCi), 1 µl Klenow-Enzym (=2 U) und 6 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>.

Die DNA-Sonde wurde nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> für 10 min bei 95°C denaturiert und danach auf Eis gesetzt. Die restlichen Reagenzien wurden der DNA zugegeben, kurz abzentrifugiert und bei 37°C für 60 min inkubiert. Anschließend wurden 400 µl TE-Puffer zugegeben und eine Eluation mit Sephadex G50-Säulen durchgeführt, um die DNA von den Reaktionskomponenten zu trennen und insbesondere die freien radioaktiven Nukleotide ([ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP) zu entfernen. Die eluierte Sonden-DNA wurde mit einem Szintillationszähler (Beckmann) auf ihre Aktivität hin gemessen. Sie betrug bei 2 µl Eluat in 10 ml Szintillationsflüssigkeit  $2\text{-}5\cdot 10^5$  cpm. Die DNA wurde durch Erhitzung auf 95°C für 10 min in Einzelstränge aufgetrennt.

Für die Hybridisierung wurde eine Sondenmenge eingesetzt, die umgerechnet eine Aktivität von  $1\text{-}1,5\cdot 10^6$  cpm/ml Churchpuffer besaß. Zu 20 ml Churchpuffer wurden 500 µl tRNA zupipettiert, die Prähybridisierungslösung aus dem Glasröhrchen entfernt und die vorher zubereitete Lösung zu den Blots gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C unter Rotation im Hybridisierungsöfen. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung durch mehrere hintereinander geschaltete Waschschrte von den Blots entfernt. Zuerst wurde 2x mit Waschlösung (2x SSC / 1 % SDS) für 15 min bei 62°C gespült, nachfolgend 2x mit Waschlösung für 30 min bei 62°C. Der Blot wurde mit Filterpapier getrocknet und für 3-8 Tage bei -70°C einem Röntgenfilm (Amersham) exponiert und entwickelt.

### 3.3 RNA-Analysen

#### **Extraktion und Aufreinigung von RNA aus Zellen**

Um total-RNA aus eukaryontischen Zellen zu isolieren, werden verschiedene Lösungen für die Zelllyse angeboten. Zur Gewinnung von hochreiner mRNA wurde ein RNA-Clean-System mit einem mRNA-Aufreinigungskit kombiniert.

Durchführung:

Das Ausgangsmaterial bildeten RKO-Zellen, die in 10 Kulturschalen ( $\varnothing$  10 cm) ausgesät und für 4 Tage im Brutschrank bei 37°C in DMEM-Medium kultiviert wurden.

Nach Absaugen des Mediums, Spülung der Zellen mit jeweils 4°C kalten PBS (10 ml) und erneutem Absaugen wurde 3 ml RNA-Clean zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit sterilen Zellschabern abgelöst, in Reaktionsgefäße übertragen und auf Eis gesetzt. Zu den Homogenaten wurde CHCl<sub>4</sub> (Chloroform) im Verhältnis 1:10 gegeben, für 15 s mit dem Vortexer gemischt und für 5 min auf Eis belassen. Die Phasen wurden durch Zentrifugation mit 14.000 rpm bei 4°C für 15 min getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und der Chloroform-Aufreinigungsschritt wiederholt. Die Präzipitation der RNA mit Isopropanol (70%) wurde in gleicher Weise wie bei der DNA-Extraktion (siehe Minipräp) durchgeführt. Das getrocknete Pellet wurde über Nacht vorsichtig in 50 µl Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-H<sub>2</sub>O gelöst.

Im nächsten Schritt wurde die total-RNA auf die Säulen des Aufreinigungskits gegeben und in einem Elutionssystem mit Puffern absteigenden Salzgehaltes durch Zentrifugation die mRNA von den restlichen Komponenten getrennt. Die mRNA wurde mit Isopropanol (70%) aus dem Eluat ausgefällt und nach zwei Waschschritten mit Ethanol (70%) durch Zentrifugieren als Pellet kondensiert. Nachdem das Pellet getrocknet worden war, wurde es in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Um die mRNA auf ihre Reinheit hin zu prüfen, wurde ein 1 % Formaldehydgel hergestellt. Dazu wurden 0,5 g Agarose mit 5 ml 10x MOPS-Puffer und 36,7 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gekocht und nach kurzer Abkühlungsphase unter dem Abzug 8,3 ml Formaldehyd (37 %) zugegeben. Das gegossene Gel wurde in die Elektrophoresekammer gesetzt und mit 1x MOPS-Puffer bedeckt. 5 µl mRNA wurde im Verhältnis 4:1 mit dem Auftragspuffer (siehe Agarosegelelektrophorese), der zusätzlich Ethidiumbromid (10 µg/µl) enthielt, gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese lief bei 50-60 V. Das Ergebnis wurde unter UV-Licht mit einer Polaroid-Sofortbildkamera dokumentiert. Die mRNA wurde nur verwendet, wenn die Einzelbanden der 24S-, 18S- und 5S-RNA deutlich und scharf begrenzt zu sehen waren.

#### **Primerextensionsanalyse**

Die Primerextension ermöglicht die qualitative und quantitative Erfassung der 5'-untranslatierten Region am Beginn einer RNA (Boorstein and Craig, 1989). Ein radioaktiver Primer in antisense-Richtung wird an eine RNA hybridisiert und mit einer reversen Transkriptase verlängert. Das 5'-Ende der Matrize terminiert die Synthese des Fragmentes, welches nun in Kenntnis der Gensequenz durch eine gelelektrophoretische Auftrennung auf seine Länge hin abgeschätzt werden kann.

## Puffer und Lösungen:

10x TBE-Puffer	890 mM Tris-HCl; pH 8,2 890 mM Borsäure 0,5 M EDTA; pH 8,0
----------------	--

Ladepuffer	98 % Formaldehyd 0,1 % Xylencyanol 0,1 % Bromphenolblau 10 mM EDTA
------------	---

## Primer (20 pm/μl):

- Rac1 32 as:  
5'- TCT CCC ACC ACC ACA CAC TTG ATG GCC TGC -3'
- Rac1 105 as:  
5'- AGT AGG GAT ATA TTC TCC AGG AAA TGC A -3'

## Durchführung:

Für die Primerextensionsanalyse wurde ein Kit von Promega mit integrierter Positivkontrolle benutzt und nach dessen Anleitung verfahren. Im ersten Schritt wurden die genspezifischen Primer, der Kontrollprimer und der DNA-Marker  $\phi$ X174 HinfI DNA mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP radioaktiv markiert. In einem Ansatz von 10  $\mu$ l wurden 2  $\mu$ l Primer (5  $\mu$ M), 3  $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (10 mCi/ml), 1  $\mu$ l 10x Polynukleotidkinase-Puffer, 1  $\mu$ l Polynukleotidkinase (PNK; 10 U/ $\mu$ l) und 3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zusammenpipettiert, für 10 min bei 37°C inkubiert und danach für 2 min auf 90°C erhitzt, um die PNK zu inaktivieren. Die markierten Primer wurden über Sepharosefiltersäulen aufgereinigt und ihre Aktivität in einem Szintillationszähler gemessen.

Im zweiten Schritt erfolgte die Primerextension. Es wurde 0,75-1,0  $\mu$ g hoch aufgereinigte mRNA eingesetzt. Die mRNA und 5 pmol Primer wurden zusammengegeben, für 20 min bei Annealing-Temperatur der Primer inkubiert und dann für 30 min bei RT langsam abgekühlt. Nach Zugabe von AMV-Reverse-Transkriptase, dem AMV-RT-Puffer und Natriumpyrophosphat (40 mM) wurde bei 41°C für 30 min die Primerextension durchgeführt.

Im dritten Schritt wurden die Produkte mittels Gelelektrophorese analysiert. Als Größenmarker diente ein  $\phi$ X174 HinfI DNA Marker. Es wurde ein denaturierendes Polyacrylamidgel (16x18 cm) hergestellt, welches 5 % PAA (40%), 7 M Harnstoff und 1x TBE-Puffer enthielt. Zu 40  $\mu$ l Reaktions- bzw. Markeransatz wurde 4  $\mu$ l Ladepuffer gegeben, bei 90°C für 10 min inkubiert und in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese lief bei 220-250 V für ca. 2 h. Das Gel wurde zwischen zwei Lagen Whatmanpapier gelegt und in einem Vakuumtrockner getrocknet. Auf das Gel wurde für 12-24 h bei -70°C ein Röntgenfilm aufgelegt.

### 3.4 Proteinanalysen

#### **Western Blot Analyse von Gewebeproben**

Die Western Blot Analyse (Ausubel *et al.*, 1993) wird zum differentiellen Nachweis von Proteinen angewandt. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran werden die Proteine durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion gebunden und mit unterschiedlichen Detektionssystemen sichtbar gemacht. Bei Gewebeproben müssen diese zuerst mechanisch oder chemisch aufgeschlossen werden, um die intrazellulären Eiweiße extrahieren zu können. Als Primärantikörper wurde der Mausantikörper anti-Rac (Biomol) und als Sekundärantikörper der Peroxidase gekoppelte Antikörper anti-Maus-IgG-HRP (Santa Cruz) verwendet.

#### Puffer und Lösungen:

Lysispuffer	50 mM HEPES; pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10 % Glycerin 1 % Triton X-100
frisch zugegeben:	10 mM NaF 1 mM Natrium-ortho-vanadat 10 µg/ml Aprotinin und 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
3x Lämmli-Puffer reduzierend	62,5 % Tris-HCl; pH 6,8 6 % (w/v) SDS 10 % Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 5 % β-Mercaptoethanol
10x Laufpuffer	1,95 M Glycin 0,25 M Tris-HCl 1 % SDS
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20 % Methanol
10x NET-Puffer	1,5 M NaCl 0,05 M EDTA 0,5 M Tris-HCl 0,5 % Triton X-100
1x NET-Gelatine-Puffer	100 ml 10x NET 0,25 % (w/v) Gelatine ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

#### Durchführung:

Die Gewebeprobenpaare Kolonkarzinom und normale Kolonschleimhaut wurden durch den Pathologen dem frischen Präparat entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren (Ried *et al.*, 1999; Lengyel *et al.*, 2001). Für die Western Blot Analyse wurden die Proben in gefrorenem Zustand mechanisch durch einen Hochfrequenzdismembrator 45 s pulverisiert, der Lysispuffer je nach Gewicht zugegeben und das Lysat in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach vorsichtigem Auftauen für 5 min wurde das Lysat bei 4°C mit 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß transferriert. Mit dem standardisierten Proteinassay nach Pierce wurde der Proteingehalt bestimmt. Die eingesetzten Mengen betragen 10, 50, 75 und 100 µg. Die Proben wurden auf den gleichen Proteingehalt normalisiert, mit 3x Lämmli-puffer im Verhältnis 3:1 gemischt und mit einer Hamiltonspritze in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte mit einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel (Trenngel 10,5 %, Sammelgel 4,0 %) in 1x Laufpuffer bei 150 V.

Nach Auftrennung der Proteine wurden diese mit Hilfe einer „Wetblot“-Apparatur in Transferpuffer von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Blotanordnung erfolgte in folgender Schichtung: unten – 6x Whatman-Papier – Nitrozellulosemembran – Polyacrylamidgel – 6x Whatman-Papier – oben. Alle Schichten waren in Transferpuffer getränkt. Der Proteintransfer wurde für 2 h bei 50 mA durchgeführt.

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in NET-Gelatine überführt und für 60 min geblockt. Nach Abgießen der Blocklösung wurde der Primärantikörper 1:2.000 mit NET-Gelatine verdünnt und mit der Membran für 60 min schaukelnd inkubiert. Der Primärantikörper wurde entfernt, die Membran 3x für 10 min mit NET-Gelatine gewaschen und der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:2.000 zugegeben. Einer Inkubationszeit von 60 min folgte das Abgießen und die Spülung der Membran mit NET-Gelatine 4x für 10 min. Zur Detektion der reaktiven Proteine auf Röntgenfilm wurde die ECL-Lösung nach Anleitung des Herstellers verwendet.

#### 3.5 Zellkultur und Transfektion

##### **Zelllinien**

Für die Transfektionen wurde die Kolonkarzinomzelllinie RKO und die Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3 benutzt. Sie stammen von Douglas Boyd, MD, Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA. Es gab keine Unterschiede in der Zellbehandlung. Die Zellen wurden mit den pGI3-Promotorkonstrukten und dem Leervektor nach der Lipofectamin-Methode (Ausubel *et al.*, 1993) transient transfiziert.

## Medien und Lösungen:

Komplettmedium	DMEM mit Glutamax 10 mM HEPES 272 mM Asparagin 550 mM Arginin 1000 U Penicillin-Streptomycin 10 % fötales Kälberserum
Serumfreies Medium (GAM)	DMEM mit Glutamax 10 mM HEPES 272 mM Asparagin 550 mM Arginin
Einfriermedium	95 % fötales Kälberserum 5 % DMSO
Trypsin/EDTA-Lösung	0,125 % Trypsin 0,02 % EDTA
PBS	7,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137 mM NaCl 2,7 mM KCl; pH 7,2

**Zellkultivierung**

Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert und nach 2-3 Tagen in die nächste Passage überführt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min vom Flaschenboden abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit der Pipette abgenommen und in Komplettmedium resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 1.600 rpm für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml frischem Komplettmedium resuspendiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Dann wurden die Zellen auf neue Gewebekulturflaschen oder -platten in Komplettmedium verteilt. Für eine definierte Zellaussaat wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und die Zellkonzentrationen in einer Neubauerzählkammer bestimmt. So konnte dann eine entsprechende Anzahl Zellen pro Gewebekulturgefäß ausgesät werden.

**Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden bei 80-90 % Konfluenz von den Gewebekulturflaschen abgelöst. Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen und zum Ablösen 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min zugegeben. Die abgelösten Zellen wurden in Komplettmedium resuspendiert, für 5 min bei 1.600 rpm

abzentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur Lagerung wurden diese Zellen nach 48 h in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die tiefgefrorenen Zellen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und das Kryoröhrchen kurzzeitig bei  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt. 10 ml Kompletmedium wurden in ein 15 ml Röhrchen vorgelegt und die aufgetauten Zellen zupipettiert. Dann wurden die Zellen bei 1.600 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in frischem Kompletmedium resuspendiert und in einer Gewebekulturflasche ausgesäht.

#### **Zellstimulation**

Die transfizierten Zellen wurden für 24 h auf „growth arrest medium“ (GAM) gesetzt und danach entweder mit rekombinantem Il-1 $\beta$  oder rekombinantem, humanem PDGF B/B für 8 oder 16 h stimuliert. Wenn nicht anders angegeben wurden 10 pg/ml Il-1 $\beta$  und 10 ng/ml PDGF B/B zur Stimulation eingesetzt.

#### **Transiente Transfektion**

Bei der Transfektion wird isolierte Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen eingebracht. Man unterscheidet stabile Transfektionen, bei denen die DNA nach Aufnahme in die Zelle im Zellkern in das Genom integriert wird und als dauerhafte genetische Information für die Proteinsynthese dienen kann, von transienten Transfektionen (Ausubel *et al.*, 1993), bei denen die Plasmid-DNA nach Erreichen des Zellkerns dort solange repliziert und in Protein umgeschrieben werden kann, bis das DNA-Methylierungsmuster als fremd erkannt und das Plasmid abgebaut wird. Die Promotoranalyse macht sich diesen Vorgang zunutze, indem der zu untersuchende Promotor vor ein Reportergen, das sich in einem Plasmid befindet, kloniert und mit diesem dann Zellen transient transfiziert werden. Beim Luziferasesystem (De Wet *et al.*, 1987) wird durch Promotoraktivierung die Expression eines Proteins induziert, das durch eine einfache Reaktion das Substrat Luziferin unter Mitwirkung von ATP,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{O}_2$  umsetzt und dieser Vorgang zu einem Lichtblitz ( $< 1$  s) führt. Da die Menge an Substrat stets gleich bleibt, ist die Quantität der gemessenen Lichtblitze von der Menge der Luziferasemoleküle abhängig und somit ein Maß für die Promotor induzierte Transkription des luc-Gens auf DNA-Ebene. Eine Stimulation des Promotors durch bestimmte Stoffe lässt sich ebenfalls überprüfen. Es gibt verschiedene Transfektionsmethoden (u.a. liposomal, kalziumphosphat-vermittelt, viral, polybrene), die sich in ihrer Effektivität und Toxizität voneinander unterscheiden und für das jeweilige Zellsystem ausgetestet werden

müssen. Für die Versuche wurde das Lipofectamin-Reagenz (LifeTechnologies) verwendet, das durch Liposomenbildung die Plasmidaufnahme in die Zelle ermöglicht.

Puffer und Lösungen:

TEN-Puffer	40 mM Tris-HCl; pH 8,0 1 mM EDTA 6 mM NaCl
Tris-Puffer	0,25 M Tris-HCl; pH 7,8
$\beta$ -Galaktosidase-Puffer	6,5 mM NaHPO <sub>4</sub> 16,8 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 0,15 mM MgCl <sub>2</sub>
oNPG	1,3 mg ortho-Nitrophenylgalaktopyranosid/ml in 100 mM NaHPO <sub>4</sub>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lösung	1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

Durchführung:

Es wurden auf einer 6-well-Platte pro well ( $\varnothing$  3,5 cm) 750.000 RKO- bzw. NIH3T3-Zellen in 2 ml Kompletmedium ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 h vor Transfektionsbeginn das Medium gewechselt. Die 60-70 % konfluenten Zellen wurden nach der Lipofectaminmethode transient mit den pGI3-Promotorkonstrukten -877 bp, -1299 bp, -2053 bp und -4074 bp (Abb. 9), dem Leervektor und dem  $\beta$ -Galaktosidase Expressionsplasmid transfiziert.

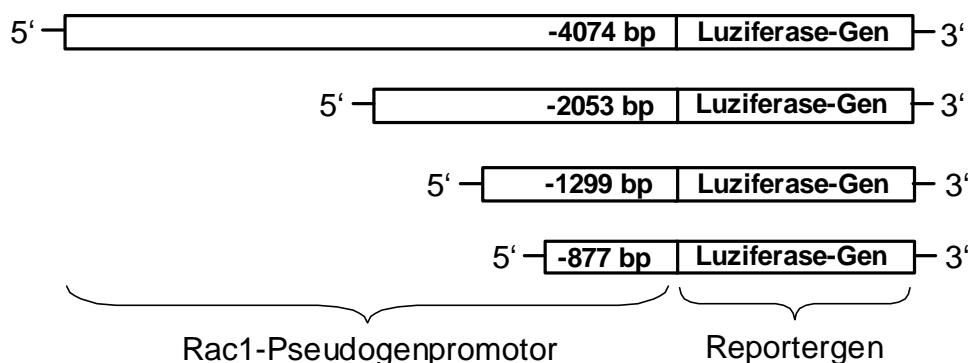


Abbildung 9: Luciferase-Reportergenkonstrukte des Rac1-Pseudogens

In Transfektionsröhrchen (6 ml) wurden 7,5  $\mu$ l Lipofectamin und 92,5  $\mu$ l GAM gegeben. 2  $\mu$ g  $\beta$ -Galaktosidase-Plasmid und 1  $\mu$ g Vektor-DNA oder 0,66  $\mu$ g Leervektor-DNA wurden auf



100 µl GAM aufgefüllt und das Transfektionsreagenz zugeführt. Der Ansatz wurde 1 h bei RT inkubiert und anschließend 800 µl GAM zupipettiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und nach dessen Entfernung das Transfekt ( $\Sigma$  1 ml) darauf gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 6 h wurde das Transfekt abgesaugt und die Zellen für 12 h auf Kompletmedium mit 10 % FCS gesetzt.

Bei Stimulation mit Il-1 $\beta$  oder PDGF B/B wurden die Zellen für 8-24 h in GAM-Medium belassen und nachfolgend die Stimulatoren zugegeben. Die Zellen wurden danach für weitere 24 h in 2 ml Kompletmedium kultiviert.

Zur Zellernte wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und pro well 1 ml TEN-Puffer zugegeben. Die Zellen wurden 10 min bei 4°C belassen, danach sorgfältig mit Zellschabern abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation mit 14.000 rpm bei 4°C für 4 min wurden die Zellen am Gefäßboden aggregiert und anschließend das Medium entfernt. Auf die Zellen wurden 100 µl 0,25 M Tris gegeben und die Zellen sorgfältig resuspendiert (Vortexer). Die Zellen wurden durch wechselndes Einfrieren auf Trockeneis und Auftauen in einem 37°C warmen Wasserbad mechanisch aufgebrochen und das Lysat nach 5 Prozeduren mit 14.000 rpm bei 4°C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert.

Im nächsten Schritt wurde zur Einschätzung der Transfektionseffizienz die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt. 10 µl Lysat (Negativkontrolle: 0,25 M Tris), 75 µl  $\beta$ -Galaktosidase-Puffer und 75 µl oNPG wurden zusammengegeben und bei 37°C für 1-2 h inkubiert bis eine Gelbfärbung auftrat. Nachdem die Reaktion durch 50 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung beendet worden war, wurde je 160 µl Probe in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und die Intensität der Färbung in einem Titertek Multiscan MCC/340 Lasergerät ermittelt.

Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden die Lösungen A und B, sowie das Luminometer LB 9501 (Berthold) verwendet. Zu 20 µl Lysat wurde 100 µl Lösung A gegeben und das Messröhrchen in das Gerät eingesetzt. Dort erfolgte dann maschinell die Zugabe von Lösung B und die sofortige Messung der Probe. Die gemessenen Werte wurden auf die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitätswerte normalisiert.

## 4. Ergebnisse

Während die Funktionen der Rho-GTPase Rac1 und dessen Regulation auf Proteinebene in vielen Einzelheiten bereits erforscht wurden, lagen zu Beginn des Projektes nur Erkenntnisse auf RNA-Ebene vor, nicht jedoch über die zugrundeliegende DNA-Sequenz von Rac1 und der das Gen umgebenden Regionen in 5'- und 3'-Richtung sowie dessen Regulation auf Transkriptionsebene. Es lagen bis dahin keine identifizierten Rac1-Pseudogene vor. Es war also naheliegend die bereits bekannte Basensequenz der Rac1-mRNA als Ausgangsbasis zur Erschließung der 5'-Sequenz zu benutzen. Die proteinkodierenden Exonsequenzen sind Teil des Transkriptes von der DNA-Matrize und müssen somit auch auf DNA-Ebene Teil des Rac1-Gens sein. Da Rac1 ein wichtiges Schlüsselprotein der Signaltransduktion ist, ob es noch andere Rac1-Isoformen oder Rac1-Pseudogene gibt und inwieweit diese reguliert werden.

### 4.1 Erschließung der DNA-Region in 5'-Richtung aus der proteinkodierenden Sequenz von Rac1

Die mRNA-Sequenz von Rac1 (NM\_006908) aus der Genbank des NCBI (National Center of biotechnological Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) stellte die Grundlage für die Erschließung dar. Sie war bereits durch Dr. med. A. Schnelzer aus unserer Arbeitsgruppe durch Sequenzierung mehrerer cDNA-Klone, die er durch reverse Transkription aus Rac1-mRNA erstellt hatte, experimentell bestätigt worden. Die Übergänge zwischen den proteinkodierenden Exonabschnitten und den Intronsequenzen auf Genebene waren zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht bekannt. Um die in 5'-Richtung gelegene, regulatorische Region zu erreichen, wendeten wir die Methode des Genomewalkings an. Hierzu wurden fünf Proben mit humaner genomischer DNA (Clontech) benutzt. Die genomische DNA liegt hier bereits in Form von geschnittenen Fragmenten vor, an deren Enden Adaptoren hängen (Abb. 10 A). Die Adaptoren (50 bp) enthalten Sequenzen für die Primer *AP1* und *AP2*. Es wurden aus der bekannten Rac1-mRNA die Primer *rac1 32 as (GSP2)* und *rac1 62 as (GSP1)* konstruiert. Es erfolgte eine PCR mit der Primerkombination aus *AP1* und *GSP1*, deren Amplifikat in eine „nested“ PCR mit der Primerkombination *AP2* und *GSP2* eingesetzt wurde um die Erstellung eines spezifischen Produktes zu erhöhen. Das Bild der Agarosegelelektrophorese (Abb. 10 B) zeigt das Ergebnis der „nested“ PCR. Man sieht mehrere Produkte (~1800 bp, ~1400 bp, ~400 bp) auf Bahn 1, jeweils ein Produkt auf Bahn 2 (~900 bp), 3 (~300 bp), und Bahn 5 (~550 bp) und kein Produkt auf Bahn 4, wohl aber die Primerbande (< 50 bp). Da die „nested“ PCR in der Probe 1 mehrere Ampifikate

unterschiedlicher Größe ergeben hat, ist von einer Primerbindung an unterschiedlichen Stellen der Matrize und damit einer partiellen Amplifikation der Sequenz auszugehen. So wurde die mit ~900 bp größte Einzelbande (Bahn 2) ausgeschnitten, aus dem Gel eluiert und über eine Subklonierung ungerichtet in den TOPO-Vektor pCR 2.1 eingefügt. Das Fragment wurde jeweils von 5'- und 3'-Richtung sequenziert und die endgültige Basenfolge im Programm Generunner erstellt. In Kenntnis der Klonierungsregion des TOPO-Vektors ergab sich eine Länge der gefundenen Sequenz von 956 bp. Diese Sequenz wurde mit den Daten der Genbank des NCBI verglichen. Sie enthielt am 3'-Ende ein Stück von 32 bp, das mit dem Kodon ATG, der ersten zu translatierenden Base Methionin begann und mit der proteinkodierenden Sequenz von Rac1 zu 100 % übereinstimmte.

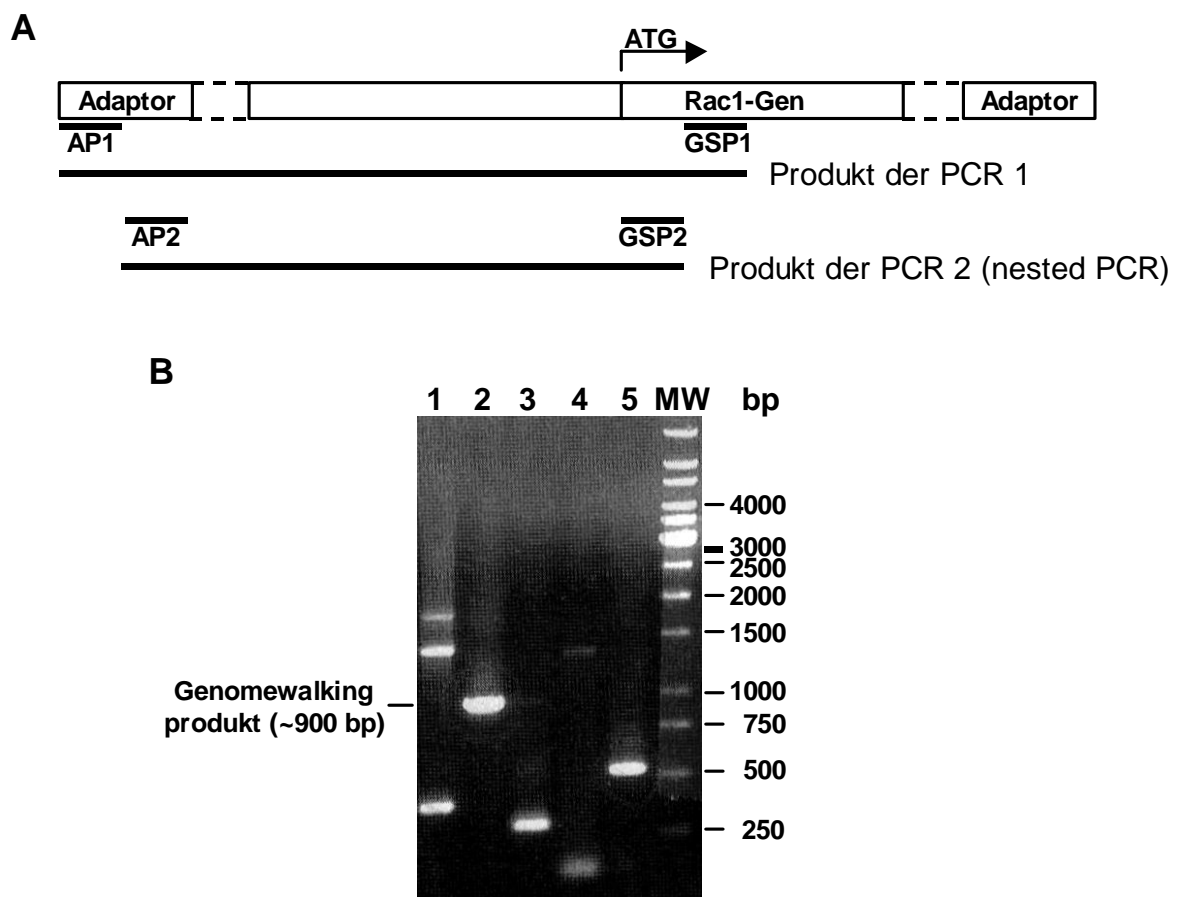


Abbildung 10: **Ergebnis des Genomewalkings.** (A) Prinzip des Genomewalkings mit Darstellung der Primerkombinationen und der erwarteten Produkte. (B) Agarosegelelektrophoresebild der „nested“ PCR. Aufgetragen sind die PCR-Produkte aus den Proben (Bahn 1-5) mit geschnittener genomischer DNA und der „molecular weight marker“ (MW). Am rechten Rand sind die Größen in Basenpaaren (bp) angegeben.

Davor lag ein Fragment von 924 bp, welches potentiell für die 5'-Region des Rac1-Gens in Frage kam. Das BLAST-Programm konnte eine weitere Sequenz aus einem humanen DNA-

Klon (AL\_022576) von Chromosom X q26.2-27.2 identifizieren, die neben der Übereinstimmung der proteinkodierenden Sequenz eine direkt vor dem ATG gelegene Basenpaarfolge (59 bp) mit 90 % Übereinstimmung besaß. Für die restliche Sequenz war kein signifikantes Alignment möglich.

Da die gefundene Sequenz im nächsten Schritt zu einem Screening verschiedener DNA-Bibliotheken des Deutschen Humanen Genomprojekts (DHGP) verwendet werden sollte, war vorher noch zu klären, ob mit dem 32 bp Fragment eine eindeutige Unterscheidung zwischen Rac1 und seinen nah verwandten Proteinen Rac2 und Rac3 möglich ist. Die Aufstellung (Abb. 11) zeigt, dass sich die Sequenzen der drei Proteine auf einer Länge von 150 bp in bestimmten Basen unterscheiden. Im Anfangsbereich von +1 bis +32 bp sieht man bei dem Vergleich von Rac2 zu Rac1 keinen Unterschied und von Rac3 zu Rac2 lediglich drei „mismatches“. Deshalb bestand eine große Wahrscheinlichkeit, dass bei der Amplifikation das Gen von Rac2 als „template“ diente. Ebenfalls hätte es sich auch um das Rac3-Gen handeln können, da sich die Fehlpaarungen nur an einer Seite des Primers befinden und ein Annealing des restlichen Primers theoretisch möglich ist.

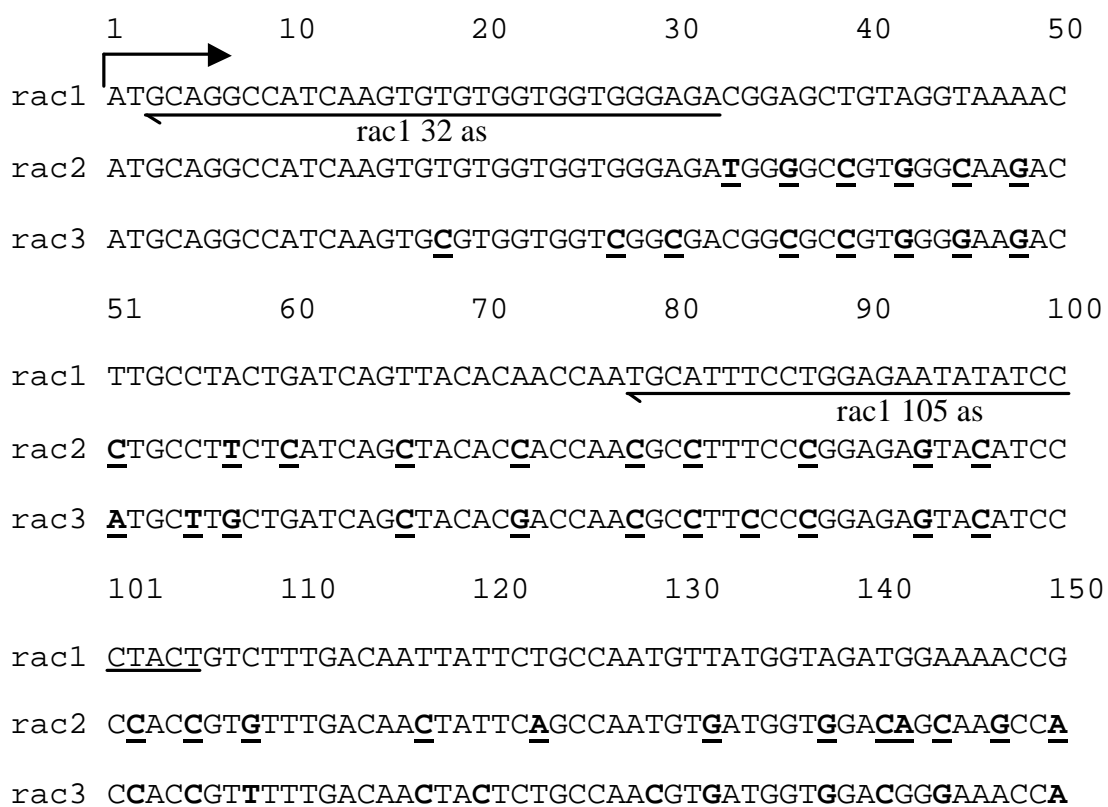


Abbildung 11: Vergleich der proteinkodierenden Sequenzen für Rac1, Rac2 und Rac3. Quelle der Sequenzen: NCBI; Rac1: NM\_006908, Rac2: XM\_015212, Rac3: NM\_005052. Die abweichenden Basen von Rac2 und Rac3 sind unterstrichen und markiert. Der Primer *rac1 32 as* kann sich an Rac2 anlagern und besitzt bei Rac3 drei „mismatches“. Der Primer *rac1 105 as* besitzt 7 „mismatches“ zu Rac2 und 8 „mismatches“ zu Rac3.

Um sicher auf das *Rac1*-Gen zu gelangen, wurde ein PCR-Produkt von humaner genomischer DNA erstellt, das neben der bereits gewonnenen 5'-Region ein längeres Segment von *Rac1* enthält. Zu diesem Zweck wurde ein antisense-Primer (*rac1 105 as*) im Bereich von +100 bp konstruiert, da hier die Basenpaarfolgen der drei Gene größere Abweichungen voneinander aufweisen (Abb. 11). Er unterscheidet sich durch 7 Basen von *Rac2* und 8 Basen von *Rac3*. Der sense-Primer liegt bei -880 bp. Die PCR auf der Matrize der genomischen DNA ergab ein spezifisches Produkt von ~980 bp (Abb. 12 A), welches ungerichtet in den TOPO-Vektor pCR 2.1 inkloniert und sequenziert wurde. Es zeigte sich im Vergleich zur Genomewalkingsequenz, dass sich die neue Sequenz von der alten nur durch eine auf 105 bp verlängerte, proteinkodierende Sequenz unterschied und ansonsten in der 5'-Region mit der Genomewalkingsequenz identisch war.

Das nächste Ziel war, eine größere zusammenhängende DNA-Sequenz zu bekommen, die das gefundene Fragment enthält und von dort aus in 5'- und 3'-Richtung sequenzierbar ist, einerseits um den Promotor des *Rac1*-Genes zu finden und andererseits Teile der bis dahin unbekanntenen Exon- und Intron-Sequenzen von *Rac1* in ihrer Länge und Lage erschließen zu können. Dazu wurde die bestimmte DNA-Sequenz (-880 bp bis +105 bp) an das Resourcecenter des Deutschen Humanen Genomprojektes (DHGP) in Berlin geschickt, um einen Vergleich mit PAC-Klone einer humanen DNA-Bibliothek durchführen zu lassen. Unter PAC („P1-phage-derived artificial chromosomes“), YAC („yeast artificial chromosomes“) und BAC („bacterial artificial chromosomes“) versteht man Vektorsysteme, die die vollständige Einklonierung der genetischen Information komplexerer Genome wie z.B. dem humanen Genom zum Zwecke der Sequenzierung und Analyse ermöglichen. Unterschiede ergeben sich in den verwendeten Wirtszellsystemen, der DNA-Topologie, den Selektionsmedien, der Größe und Stabilität einklonierbarer Fragmente und den Methoden der DNA-Extraktion (Detrich *et al.*, 1994). Der Vektor pCYPAC2 (18 kb) war die Basis für die PAC-Klone (Ioannou *et al.*, 1994) der hier verwendeten DNA-Bibliothek RPCI 1,3-5 des DHGP. Das DNA-Fragment (-880 bp bis +105 bp) wurde markiert und mit den gesamten Klonen der Bibliothek auf Hybridisierung geprüft. Das Ergebnis waren zehn auf das Fragment positive PAC-Klone, die wir als Einstichkulturen in Agarröhrchen vom DHGP erhielten.

Bevor die PAC-Klone zur weiteren Sequenzierung eingesetzt werden konnten, mussten sie mittels PCR auf das Vorhandensein der Sequenz überprüft werden. Die PAC-DNA wurde nach einem geringgradig modifizierten Protokoll der alkalischen Lyse aus den Bakterienklonen isoliert und aufgereinigt. Für die Kontroll-PCR wurden die Primer *rac1 -880 se* und *rac1 105 as* benutzt. Man sieht im Elektrophoresebild (Abb. 12 B), dass die

PAC-Klone 5, 6 und 9 (Bahn 5, 6, 9) und die humane genomische DNA der Positivkontrolle (Bahn +) ein ~950 bp langes Amplifikat zeigen, während dies bei den Klonen 1-4, 7, 8 und 10 (Bahn 1-4, 7, 8, 10) nicht der Fall ist. So wurde für die weiteren Sequenzierungen und Klonierungen nur die DNA der Klone 5, 6 und 9 verwendet, weil bei den anderen nicht sicher von spezifischen Klonen des Rac1-Gens ausgegangen werden konnte.

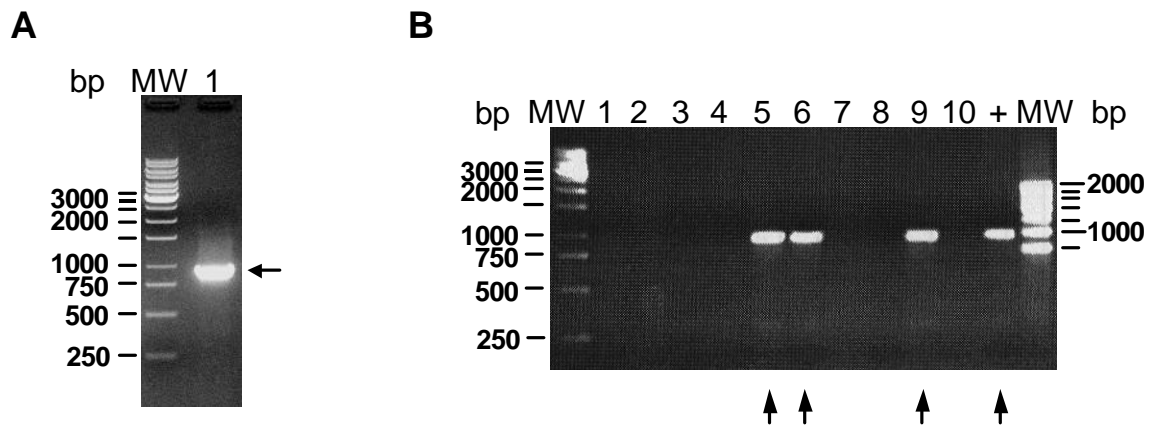


Abbildung 12: **Amplifizierung des Fragmentes –880 bp bis +105 bp von humaner genomischer DNA (A) und Überprüfung der PAC-Klone 1-10 auf das Fragment –880 bp bis +105 bp (B).** Bild A zeigt den „molecular weightmarker“ (MW) 1kb und das Produkt von ~980 bp (Pfeil) der PCR mit den Primern *rac -880 se* und *rac1 105 as*. In Bild B sind aufgetragen von links nach rechts: „molecular weightmarker“ (MW) 1kb, PCR-Produkte der PAC-Klone 1-10, humane genomische DNA als Positivkontrolle (+) und „molecular weightmarker“ (MW) 200 bp. Ein spezifisches Amplifikat von ~980 bp Größe (↑) ist auf Bahn 5, 6, 9 und bei der Positivkontrolle zu sehen.

#### 4.2 Das Sequenzierungsergebnis der PAC-Klone 5, 6 und 9

Das Ziel der Arbeit war, die Sequenz des Rac1-Promotors zu erschließen, um Promotorkonstrukte zur Charakterisierung seiner Aktivität durch Zellkulturexperimente klonieren zu können. Die Sequenzierung der PAC-Klone wurde in Kooperation mit Dr. Reinhardt und seine Kollegen vom Max-Planck-Institut, Abteilung für Molekulargenetik in Berlin, durchgeführt, da sie viel Erfahrung im Umgang mit PAC-Klonen und deren Sequenzierung besitzen. Dort wurde eine Doppelstrangsequenzierung der Klone 5, 6 und 9 mit erneuter Überprüfung unserer Ausgangssequenz durchgeführt und die Größe der Klone bestimmt. Parallel zur Sequenzierung wurde damit begonnen, die bekannten Anteile des putativen Promotors über Mutagenese-PCR, Restriktion und Ligation in das Reportergenvektorsystem pGl3 für die später geplante Transfektion von Zelllinien einzuklonieren.

Die Ergebnisse der drei Doppelstrangsequenzierungen wurden zu einer Konsensussequenz zusammengefasst, die eine Gesamtlänge von 5544 bp hatte. Die Größen

der Klone 5, 6 und 9 betragen 129 kb, 149 kb und 132 kb. Die Sequenz wurde im BLAST-Programm mit den Daten der Genbank des NCBI verglichen. Sie besteht aus einem Anteil von 4316 Basenpaaren, der eine von Rac1 in 5'-Richtung gelegene Region repräsentiert und einem Anteil von 1228 bp, der von dem Startkodon ATG aus in 3'-Richtung liegt. Sie zeigt eine Homologie von 97 % auf einer Länge von 579 bp mit der proteinkodierenden mRNA-Sequenz von Rac1 (NM\_006908), wobei die Basenpaarfolge nicht durch Introns unterbrochen wird. Fernerhin gibt es eine erneute Übereinstimmung von 93 % mit dem humanen DNA-Klon (AL\_022576) von Chromosom X q26.2-27.2 auf einer Länge von 849 bp. Enthalten ist auch hier die proteinkodierende Sequenz von 579 bp. Die angrenzende 3'-Region hat in einem Bereich von 211 bp die gleiche Folge und ein Stück von 59 bp in 5'-Richtung ebenfalls.

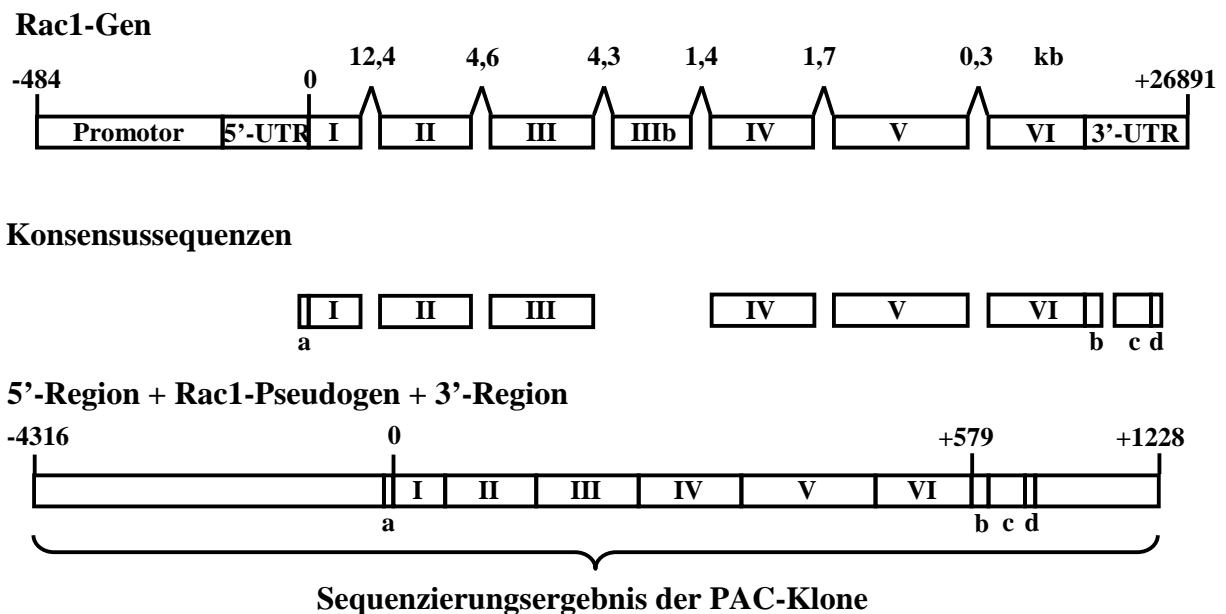


Abbildung 13: **Vergleich der Sequenzen des Rac1-Genes und des Sequenzierungsergebnisses der PAC-Klone.** Oben: Rac1-Gen mit dem Promotor, der 5'-untranslatierten Region, den Exonabschnitten I, II, III, IIIb, IV, V, VI und der 3'-untranslatierten Region unter Längenangabe in bp. Die Spitzen ( $\wedge$ ) stehen für die Intronabschnitte, Längenangabe der Introns in kb. Mitte: Abschnitte des Sequenzierungsergebnisses (*grau*), die mit dem Rac1-Gen übereinstimmen und weitere Segmente (a-d), die nicht zu den Exonsequenzen gehören, aber gleiche Basenfolge zeigen. Unten: Sequenzierungsergebnis der PAC-Klone und Aufteilung der Abschnitte unter Längenangabe in bp ohne Berücksichtigung der absoluten Längenverhältnisse.

Diese BLAST-Ergebnisse deuten daraufhin, dass es sich bei der erfassten Sequenz um ein Pseudogen von Rac1 und seine anliegenden Bereiche handelt, da es sich bei Pseudogenen oft um posttranslational modifizierte, in das Genom reintegrierte mRNA-Sequenzen handelt, die keine Introns besitzen (Mighell *et al.*, 2000). Diese Annahme konnte durch den BLAST-Vergleich (Abb. 13) mit der im Juni 2000 von der Arbeitsgruppe P. Jordan im Zuge einer

Veröffentlichung (Matos *et al.*, 2000) eingereichten Rac1-Gensequenz (AJ\_132695) bestätigt werden, welche die vollständigen Intron- und Exonsequenzen, den 3'-untranslatierten Bereich und die 5'-Region mit dem Promotor enthält.

Die Übereinstimmungen mit der vorliegenden Sequenz (5544 bp) beschränkt sich auf die Exonabschnitte I, II, III, IV, V, VI und kurze Bereiche vor und hinter dem Gen. Der Exonabschnitt IIIb, der für das Aminosäureinsert der Splicevariante Rac1b sowohl bei Mammakarzinomen (Schnelzer *et al.*, 2000) als auch bei Kolontumoren (Jordan *et al.*, 1999) gefunden wurde, fehlt in der Sequenz. In der 5'-Region (-4316 bp bis 0 bp) liegt ein Stück (Abb. 13 a) von 45 bp, das mit der Rac1-Gensequenz (AJ\_132695) übereinstimmt. Im 3'-untranslatierten Bereich finden sich drei weitere Konsensusfolgen (Abb. 13 b-d). Die Erste (62 bp) liegt unmittelbar hinter dem Exon VI, die anderen beiden (496 bp, 60 bp) schließen sich nach einer Unterbrechung von 40 bp an.

Position (Base)	Nukleotid-austausch	Position (Aminosäure)	Aminosäure-austausch
276	T→A	92	Asn→Lys
304	C→G	-	-
305	G→A	102	Arg→Glu
354	T→A	118	Asp→Glu
368	A→C	123	Lys→Thr
378	C→T	-	-
419	C→T	140	Pro→Leu
435	G→C	145	Met→Ile
436	G→A	146	Ala→Thr
466	G→A	156	Glu→Lys
477	G→A	-	-
511	G→A	171	Glu→Lys
515	C→A	172	Ala→Glu
521	G→A	174	Arg→Gln
537	G→A	-	-

Tabelle 1: **Mutationsanalyse des Rac1-Pseudogens.** Verglichen wurden die proteinkodierenden Sequenzen von Rac1 (AJ\_132695) und deren erschlossenen Pseudogensequenz.

Bei genauerer Betrachtung der Exonabschnitte des Rac1-Gens und des Pseudogens finden sich 15 Abweichungen einzelner Basen (Tab. 1) in der proteinkodierenden Sequenz, die auch bei dem humanen DNA-Klon von Chromosom X q26.2-27.2 auffallen. Bei der Translation (Tab. 1 und Abb. 14) würde in 11 Fällen eine veränderte Aminosäuresequenz resultieren. Bis auf zwei Fälle in der Insertregion (AS 117-137) liegen sie nicht in funktionell bedeutsamen Bereichen von Rac1 (Hirshberg *et al.*, 1997), wie der Effektor-domäne



(AS 26-40) und der „switch“ II Domäne (AS 57-75). Die von Schnelzer *et al.* (Schnelzer *et al.*, 2000) beschriebenen *in vivo* Punktmutationen in extrahierter mRNA, die Auswirkung auf die Aminosäuresequenz haben, befinden sich an anderen Stellen der Exonsequenzen. Durch die Mutationen entsteht kein Stopkodon.

```

Rac1-Gen:  1 MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGL  55
Pseudogen: 1 MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGL  55
                                     Effektordomäne

56 WDTAGQEDYDRLRPLSYPTVGETYGKDITSRGKDKPIADVFLICFSLVSPASFE 110
56 WDTAGQEDYDRLRPLSYPT-----DVFLICFSLVSPASFE  91
    Switch-II Domäne

111 NVRAKWYPEVRHHCNTPPIILVGTKLDLRDDKDTIEKLKEKLTPIITYPQGLAMA 165
92  KVRAKWYPEVEHHCNTPPIILVGTKELRDDTDTIEKLKEKLTPITYLQGLAIT 146
                                     Insertregion

166 KEIGAVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRAVLCPPPVKRKRKCLLL# 212
147 KEIGAVKYLKCSALTQRGLKTVFDKEIQAVLCPPPVKRKRKCLLL# 193

```

Abbildung 14: **Aminosäuresequenzen von Rac1-Gen und Pseudogen.** Die Sequenz aus dem Rac1-Gen einschließlich Exon IIIb (Rac1b-Splicevariante) wurde der Genbank unter AJ\_132695 entnommen. Von den 11 abweichenden Aminosäuren (unterstrichen und markiert) liegen nur zwei (Pos. 118, Pos. 122) in einer funktionell bedeutsamen Region (Rahmen). Das Stopkodon (#) befindet sich an Pos. 193 bzw. Pos. 212.

### 4.3 Nachweis der Existenz von Rac1-Gen und Rac1-Pseudogen auf genomischer DNA

Nach der Erkenntnis, dass unsere Sequenz Entsprechungen mit dem Rac1-Gen nur in den Bereichen proteinkodierender Sequenzen besaß, sollte die Koexistenz von Gen und Pseudogen auf humaner genomischer DNA noch einmal mittels eines anderen Ansatzes nachgewiesen werden. Dazu wurde nach der Southern Blot Methode eine Rac1-cDNA Sonde mit jeweils drei Proben humaner genomischer DNA von Promega und aus RKO-Zellen, die mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut wurden, hybridisiert, um anhand des Bandenmusters eine Unterscheidung in Gen und Pseudogen zu erreichen (Louie *et al.*, 1989). Da beide DNA-Sequenzen schon im voraus bekannt waren, ließ sich *a priori* das Bandenmuster und die Fragmentgrößen durch Simulation der Restriktionen mit den drei Enzymen im Programm Generunner bestimmen und anhand des danach durchgeführten Southern Blots überprüfen. Die Gensonde wurde aus dem Vektorkonstrukt Rac1wt-(wildtyp)-pcDNA 3.1 (hergestellt von Dr. rer. nat. A. Fenn-Rottler, 1998) herausgeschnitten und radioaktiv markiert. Die Sonde wurde mit den auf die Nylonmembran geblotteten DNA-

Fragmenten hybridisiert. Da die Rac1-cDNA mit der Pseudogensequenz übereinstimmt, wurde sie als Positivkontrolle für das pseudogenspezifische Schnittmuster verwendet.

	<b>Rac1-cDNA = Rac1-Pseudogen</b>						<b>Rac1 Gen</b>						
Sonde	Rac1 cDNA						Rac1 cDNA						
Restrikt. enzyme	AluI		HaeIII		HphI		-						
Southern-blot-Bande	Nr	bp	Nr	bp	Nr	bp	Nr	bp					
	-	37	-	7	-	162	-	1545	-	40	<b>17</b>	578	Exon I
	-	138	<b>9</b>	485	<b>15</b>	240	<b>7</b>	966	<b>13</b>	1388	<b>16</b>	405	Exon II
	<b>2</b>	224	-	88	-	177	-	68	<b>12</b>	1130	-	292	Exon III
	<b>1</b>	180					-	63			<b>18</b>	682	Exon III
							<b>4</b>	387	<b>10</b>	781	<b>19</b>	748	Exon IIIb
							<b>5</b>	516	<b>11</b>	1065	<b>20</b>	986	Exon IV
							-	305	<b>8</b>	373	-	158	Exon V
							<b>1</b>	176			<b>20</b>	954	Exon V
							<b>6</b>	607	-	127	<b>20</b>	954	Exon VI
									<b>14</b>	1875			Exon VI
Anzahl	4		3		3		9		8		9		-
Artifizielle Bande	Nr	bp			Nr	bp							
	<b>3</b>	360			<b>16</b>	400							
	<b>6</b>	580											

Tabelle 2: Auflistung der zu erwartenden Fragmente und deren Größe, die bei Restriktion mit AluI, HaeIII und HphI entstehen für das Rac1-Gen (AJ\_132695) und die Rac1-cDNA (=Rac1-Pseudogen). Die Auflistung enthält nur Fragmente, an die sich die cDNA-Sonde anlagern kann, d.h. proteinkodierende Sequenzen. Die Fragmentanzahl und -größe wurde über das Programm Generunner errechnet. Die erkennbaren Southern Blot Banden wurden mit fettgedruckten Zahlen (**1-20**) numeriert und die Zuordnung zu den vorher errechneten versucht (**Nr**). Als artifizielle Banden (**3, 6, 16**) wurden jene bezeichnet, deren Zuordnung nicht möglich ist, deren Zustandekommen aber durch unvollständigen Verdau erklärt werden kann.

Wenn man die theoretisch erwarteten Fragmenten (Tab. 2) mit den Bandenmustern der Southern Blot Bilder betrachtet, so lassen sich nach Ablesen der Größe am Marker die Einzelbanden (Abb. 15 A Bahn 1-3 und B Bahn 1-3) zum größten Teil zweifelsfrei zuordnen. Es zeigt sich, dass die Banden 2, 9 und 15 in ihrer Größe nur im Schnittmuster des Rac1-Pseudogens vorkommen, während die Banden 4, 5, 7, 8, 10-14, 17-19 und 20 eindeutig zu den Fragmenten des Rac1-Gens zugeordnet werden können. Für die Banden 3, 6 und 16 ist die Differenzierung nicht möglich. Die Hybridisierung mit der genomischen DNA aus RKO-Zellen (Abb. 15 B Bahn 4-6) zeigt ein schwächeres, jedoch gleiches Bandenmuster. Die artifiziellen Banden 3, 6 und 16 (Abb. 15 A, B) sind in ihrer Größe durch unvollständige Restriktion erklärbar.

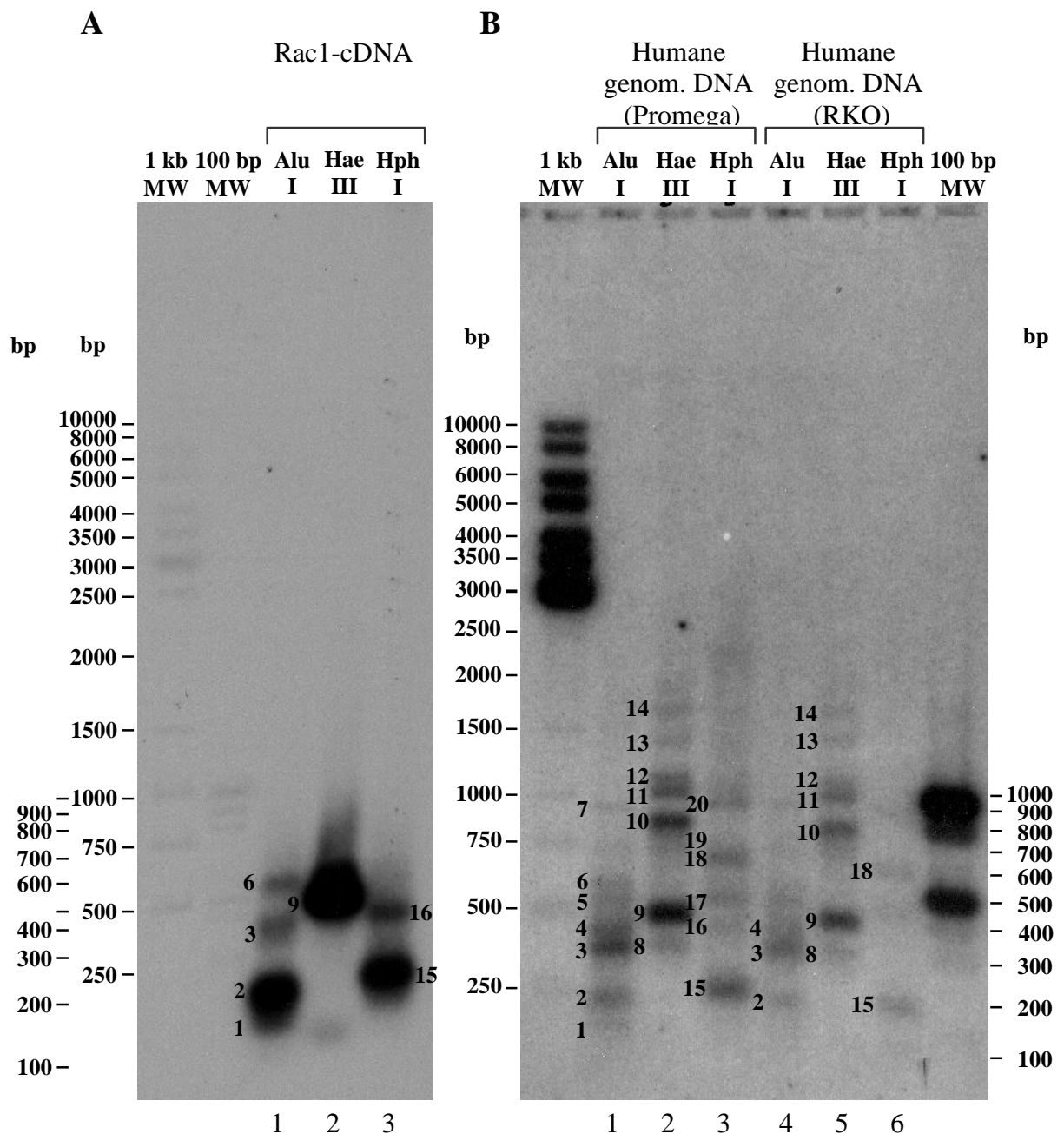


Abbildung 15: **Southern Blot von humaner genomischer DNA.** Nummerierung der Bahnen unter den Blots. Das Bandenmuster der Hybridisierung von Rac1-cDNA mit der Gensonde (**A**, Bahn 1-3) lässt sich in der Hybridisierung von genomischer DNA von Promega (**B**; Bahn 1-3) vollständig und aus RKO-Zellen (**B**; Bahn 4-6) teilweise wiederfinden. Weiterhin sind die Banden des verdauten Rac1-Gens (Tab. 1) nach Größe mit Hilfe der „molecular weightmarker“ (MW) 1 kb und 100 bp in dem Southern Blot (**B**) identifizierbar.

#### 4.4 Nachweis der Sequenz –4100 bp bis +579 bp auf humaner, genomischer DNA

Dem Beweis für das Vorliegen der Pseudogensequenz auf humaner genomischer DNA schloss sich die Frage an, ob sich die von uns erschlossene 5'-Region tatsächlich unmittelbar vor dem Pseudogen befindet. Bei der Erstellung der PAC-Klone werden unter anderem zwei

Probleme beschrieben (Ioannou *et al.*, 1994). Erstens werden Genomfragmente ohne Kenntnis der darin enthaltenen Gene in den pCYPAC-Vektor eingefügt. Liegt ein Gen in den Randbereichen, so ist es möglich, dass sich seine vollständige Sequenz nicht auf einem Klon befindet, sondern sich auf zwei verschiedenen Klone aufteilt. So könnte die 5'-Region Anteile des pCYPAC2-Vektors enthalten. Zweitens ist bei der Klonierung die Bildung von DNA-Chimären beschrieben. Ein solcher Klon enthält dann möglicherweise zwei verschiedene, hintereinander liegende Genfragmente. In unserem Fall könnte dies bedeuten, dass die 5'-Region Teil eines anderen Genabschnitts ist.

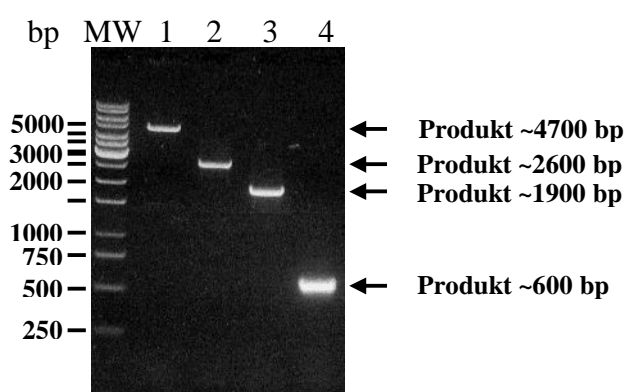


Abbildung 16: **PCR von humaner, genomischer DNA zum Nachweis der zusammenhängenden Sequenz bis zu einer Länge von -4100 bp bis +579 bp.** Es wurden die sense-Primer *rac1-4100 se*, *rac1-2000 se*, *rac1-1300 se*, *rac1 5' se* und der antisense-Primer *rac1 3' as* verwendet, welche die Produkte der Größe ~4700 bp, ~2600 bp, ~1900 bp und ~600 bp ergeben.

Deshalb wurde versucht, mittels PCR Abschnitte verschiedener Größe (-4100 bp bis +579 bp / -2000 bp bis +579 bp / -1300 bp bis +579 bp), die aus 5'-Region und *Rac1*-Pseudogen bestehen, aus humaner genomischer DNA zu amplifizieren. Zur Kontrolle wurde die Pseudogenesequenz (0 bp bis +579 bp) synthetisiert. Das PCR-Bild zeigt die erwarteten Produkte der Größe ~4700 bp, ~2600 bp, ~1900 bp und ~600 bp (Abb. 16, Bahn 1-4). Sie haben eine Größe, die sich aus dem Pseudogen und der davor liegenden 5'-Region ergibt.

#### 4.5 Analyse der 5'-Region des *Rac1*-Pseudogens

Genome von Eukaryonten enthalten neben dem Originalgen zumeist ein oder mehrere Pseudogene (Mighell *et al.*, 2000). Diese Pseudogene wurden im Laufe der Evolution aus noch nicht genau bekannter Ursache entweder in das Genom reintegriert und besitzen die mRNA-Sequenz in posttranslational modifizierter Form als Exonreihung („processed pseudogenes“) oder unverändert mit vollständigen Introns („duplicated pseudogenes“) (Mighell *et al.*, 2000). Obwohl Pseudogene oft funktionell inaktiv sind, wurde ihre

Transkription in mehreren Fällen beschrieben (Chakrabarti *et al.*, 1995; Renaudie *et al.*, 1992; Sorge *et al.*, 1990; Sun *et al.*, 1998). Deswegen stellte sich uns die Frage, ob die erfasste 5'-Region des Pseudogens Transkriptionsfaktorbindungsstellen enthält und eine Promotoraktivität *in vitro* nachgewiesen werden kann (siehe 4.7).

Der Promotor eines eukaryontischen Gens (Abb. 17) liegt normalerweise in der 5'-Region und ermöglicht dem RNA-Polymerasekomplex die Erkennung des Transkriptionsstarts und die Anlagerung an die DNA. Die RNA-Polymerase benötigt für ihre Funktion Hilfsproteine (Transkriptionsfaktoren), nach deren Erkennung und Bindung sie die Synthese des primären „messenger“-RNA Transkriptes durchführt. Es enthält die 5'-untranslatierte Region („leader“), die Exon-Intron-Sequenz und die 3'-untranslatierte Region („trailer“) mit dem PolyA-Signal (AATAAA) (Lodish *et al.*, 2000). Promotoren besitzen als proximale Elemente Erkennungsmotive wie zum Beispiel die TATA-Box, die CCAAT-Box, die GC-Box oder die SP-1 Konsensusbindungsstelle. Diese Motive liegen zumeist 50-100 bp vor dem Transkriptionsstart.

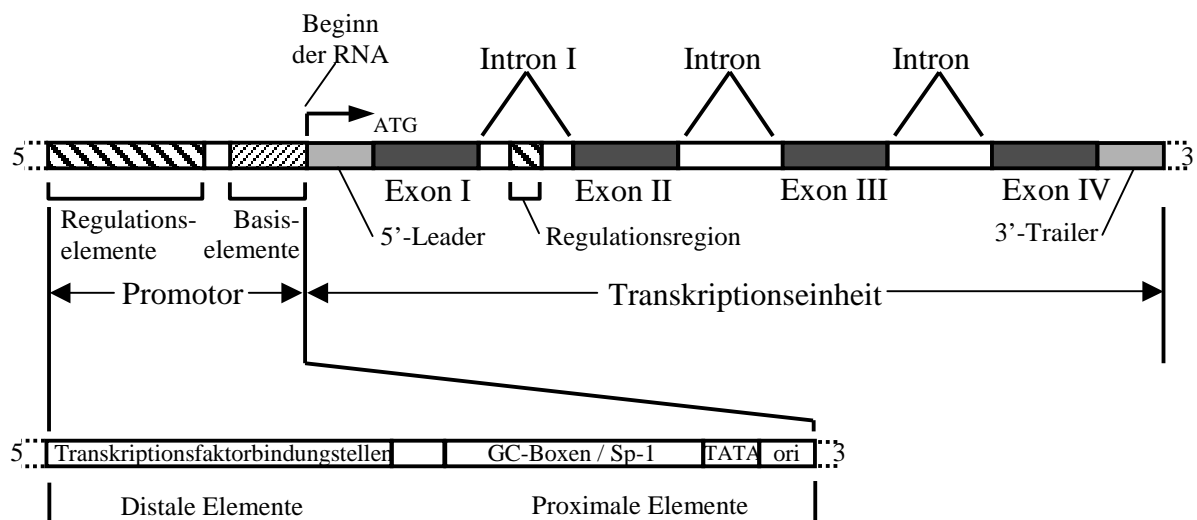


Abbildung 17: **Aufbau und Struktur eines proteinkodierenden Gens aus Eukaryoten.**

Der Transkriptionsstart kann an einer oder mehreren Stellen vorkommen, befindet sich in unterschiedlichem Abstand zum Translationsstart und determiniert die Länge der 5'-untranslatierten Region. Ab diesem Punkt beginnt die Synthese des Primärtranskriptes durch den Polymerasekomplex. Zu den distalen Promotorelementen gehören die Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Es handelt sich hierbei um Motive, die von Transkriptionsfaktoren erkannt werden und deren Bindung eine Regulation der Transkription im Sinne von Stimulation („enhancer“) oder Hemmung („silencer“) induzieren kann (Singer

and Berg, 1991). Regulative Promotorelemente befinden sich normalerweise vor dem Gen. Ihre Entfernung vom Transkriptionsstart kann jedoch stark differieren. Diese Einheiten werden dann zur Aktivierung durch Bildung einer Schlaufe („loop“) in die Nähe des proximalen Promotorabschnittes gebracht. Weiterhin können Regulationssequenzen auch in den Intronabschnitten des Gens oder hinter ihm liegen.

Es wird nun die von uns sequenzierte 5'-Region von 4316 bp (Abb. 18) auf Promotorelemente untersucht. Definitionsgemäß wird die erste Base des RNA-Primärtranskriptes mit +1 benannt. Da jedoch der Transkriptionsstartpunkt für das Rac1-Pseudogen nicht experimentell ermittelt werden konnte und auch die Klonierung von der proteinkodierenden Rac1-mRNA Sequenz ausging, wurde in diesem Fall die Base A des für die die erste Aminosäure kodierenden Triplets ATG mit +1 bezeichnet. Zur Ermittlung des möglichen Transkriptionsstartpunktes wurde mittels BLAST nach „early sequence tags“ (ESTs) gesucht. ESTs sind cDNA-Fragmente aus der 5'-untranslatierten Region von Genen, die durch reverse Transkription von mRNA gewonnen wurden (Hillier *et al.*, 1996). Es finden sich in der NCBI-Datenbank unter „human EST“ zwei Sequenzen, die die längste übereinstimmende Folge (~700 bp) mit unserer Sequenz aufweisen: EST BI\_914750 (91 % Übereinstimmung) und EST BM\_453413 (90 % Übereinstimmung). Beiden ESTs fehlt ein Abschnitt von 59 bp, der in unserer Sequenz direkt vor dem Exon 1 liegt. Somit würden sich für den putativen Promotor zwei Startpunkte, -824 bp und -776 bp, ergeben. Das Motiv der TATA-Box (TATAAA) kommt in unserer Sequenz viermal vor, wobei die an Position -945 bp gelegene Box in ihrer Lage 50-100 bp vor den beiden Transkriptionstartpunkten passen würde. Weiterhin findet sich eine CCAAT-Box bei -207 bp. Wiederholungseinheiten („repeat elements“) von 10 bp Länge sind bei -1537 bp und -3636 bp gelegen. Der GC-Gehalt des Promotors beträgt 40 %. Bereiche mit CG-Folgen, die als Zielsequenzen für DNA-Methylierung und auch als unmethylierte CpG-Inseln zum Erhalt der Genexpression dienen (Bird, 1986), sind nicht vorhanden, auch nicht in den Regionen um die Transkriptionsstartpunkte. Es findet sich eine GC-reiche Region (GC-Gehalt: 62,5 %) in 5'-Richtung vor der TATA-Box (-1064 bp bis -1017 bp).

	10	20	30	40	50	60	70
-4316	AGTAGGGCTT	TCTGAGTGAA	GCTTTGCAGG	GAGCACACAC	ACACATTTAC	CCCAAAGGT	TGTTTAAAT
-4246	TTTGACCTAG	ATAGCTATAA	TGTGCTTGTT	TCTCTCTTTC	CCTCTTCACT	CTTTTCTTTT	ATCCAGATGA
-4176	TGCTAGTATG	GAATAAATAA	TATGGTGAAG	CGGCTTTGCT	TTTTATGGTT	TCATAAGGCT	ATGATCTATT
				(-4074 bp)			
-4106	TCACAAAGAT	TAGTTCCACT	GGAAGGCCCA	GGTTTCCTGT	TTCTATTATC	CACACTTCAC	ACGGTGGTTT
-4036	AGACTAAATT	GTCCATTGCA	GAGTTTGGAA	ACCAGTCTGT	TTAATGCAGT	AAATTGTGCT	GCTACTTCCA

-3966 TACCCATCTC TCACAGCCCA CGTTCTGGGG CTGATCAGAT ACACATTCAC TAACACAGAA CAAATAAATG  
 -3896 CTTCATTTCT CACCTATTTT TGAAGTAACC TCTTCTTTAA GGTTTACTAC TTCAGTCATG TTTATTTGGC  
 -3826 CTGTTGAGTG GACATETS**CAGGA** AACAGGTAAC ATGGAAAGAG AGATGACGAT TGGAAATGTAA TTTCCCTTTT  
 -3756 ATCCAGAGGA GCCCCTTCAC AATTGGGACT GTCCCACTCC TGACTAGTGG TGCTGAGGGC TCAGTAATGA  
 -3686 GCTCAGCTTG CCTAGTGAAT CCGGAGTAGG GAAAGCAAAC ATCTCTAGAT >repeat element<**GCAAATATGA** CCTGAAGTTA  
 -3616 ACCAGATTAA ATCCCTGGTG AACTCTTGTA AATAGAATTT CACTTCTAGA GGATTGTCAG CATGCTCAGC  
 -3546 AGAGTACAAA GTTATCTATT CAATGTGCAT GGTAAATTTAG CTAGTCAGCA GCAGGAGAAA TGGTAATAGG  
 -3476 TACACAGTGA TTTATAATAA CTGGTAATGA GGTAGACACA GCAGGTAATC TCAGCACAGA ATAACTTGGC  
 -3406 AGAGGAGACG GGAAGGGCAG ATTCAGACAT TGTTCGATG AGGCTACGGT TTAAGCTGGG GAGTGAACAG  
 -3336 CAAGCGGCCG CATCGGTGCT GTCCGCTCTG AGCACTGTGC AGACTGGCTT CATGTCCAGT GCTGCAGCCT  
 -3266 GTGGCCACTC ATCTGTCTTC CCAGCAGACG ACAACTGTCC CAGCCTCAG ACTCCTCGAA ACAACTACTG  
 -3196 TTGCTGTTTT TCTTCTGTTT CREB**TCGTCACTTT** GATAATATGT CAGTAATGTG TTCTGTCCCA TAAATGGCGG  
 -3126 TGAATTTAGA AAACAAAACC GAAAGCAGCT CAGTAGCTGT CAGTGAAGAG CTTTATGTGT CCAGGCATTC  
 -3056 AGGGACCCCA GAGATAGCAT Octamer**TTGCATGTTG** TGCTCACTGC AAACCTGGGC AGTCATAATC TTGGAGGCAT  
 -2986 TGTGTCTCTC ATTTTATAAG CAACAGTAAA ACATTACCTT TATAGTAGAC TGGATTGTTA ETS**AATCCAGGAA**  
 -2916 GATTTCATGCC CTGTTAATCT TGTCCCCTGC TACCATGACT CCAAGTATTT TTAATTCCAC AAAGCCTTTT  
 -2846 TGCAGTTTTT ATCACCTTCT TGTTTTCCCT GACTGCTTCC TTATTCTGGT ATTTTGCTGA NF-E1**GTCATGATAA**  
 -2776 GGTATCAGAG AACCAACATG TAGGAACAAG TAAAGAGAAT CCTAATGTTT TAATATTTTG GAGGAGGATA  
 -2706 TGATCCATAT GATTACATTT TGTTTGGGTT GGGTTTCTCA GACCTCCTTT GACCTGTAAC CAAAAAATTC  
 -2636 TTCAGCAGTA TTTACAATTC TGCCCGTCTG CACCCAAATG GTTTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGCATACAC  
 -2566 ACACACGCCT GCACGCACAC c-myc**ACGTGCACAT** GCATGAGTAT GTGCTTCCTT CTTGTACTGT ATAATAGGTC  
 -2496 TGTAGCATA CAGCTGTTAA GTCATTTTAT GGAAGTTCTG TGGAAATGCT AATGTATACT AGCAATTGTG  
 -2426 ATCAACAP-4 / AP-1**ACAG CTGTTAATCA** TCAATGTTTC TGATCTCCA AAAAAGCCAA CAAACCTGAG AACTGTCGCT  
 -2356 GATTTTAACA ATTGACAATA CTGCCATTGG TAAGAGTCTG ACATGATTGT TTGAGATACA TTTGGATCTT  
 -2286 CTCCATTTAT TCTTTTGCTA TATATCAGTC ATAGAATATG AAATsilencer-binding-site**TATTAA** AATTAGAAAC AGGTAACTCT  
 -2216 AATGGTAGGA AAACAACCTCA AATCCCTAGG ACACGAAGAA GAGAGTGAAC ACATGAGAGA GAAAATAAGC  
 -2146 TATTTATTCC ATTCCCTGAG TAATATAATA CTGAAAGGGA AATGAGTATA AACTGAAAG TAAACTGGAA  
 (-2053 bp)  
 -2076 GGGAAAGGGT TATGCTCTCT GAAACATTA CCTGGGTATG AATGTGTTCA TGGTTTACAT TTTTTCAGAT  
 -2006 GTACATTTGT GCAACTAAAC ATCCTTCCTT CTCCGTAGGC TCCATCTGTA CTCAGGGACA TACATGACCA  
 -1936 GTGATTGGTG AGTGAAGGTG TAAGAAGGTG GCCATACGTG CCTTTTCTCT AAGCGCACAG CACTTGGGGA  
 -1866 AAACCATAAG AAATTTGTGC AP-3**TTTGTGGGA** TGACTGGTA GATGAATGAG GTAGAAGGAG AAGAAAATAG  
 -1796 ACTCACTGCT CCTTTATAGT GTTACAGGAC AGAGATGAAG TGGATGGGGG AATCCTGGAT AATTAATTGA  
 -1726 GATATATCAG CAGAAGAAAA TATATCCCTG TTTCTGAGAT TTGCTGCTTT CACCACAGGT TGGGAGGCCT  
 -1656 TGAGTTCAAA TTTTGATTCT CAGCTCTTGA TGTCTTAGT CAACTCTCCT AAATATATCT GAGAAGGCCT  
 -1586 GTTAGTTTGT GTATGGAGAG GGTAAGCTGA TGGCAGGCAG AAAAATGGGC >repeat element<**AAATATGAAG** TTAGAATTGC

```

-1516 ATCATTATAA TAATACTTTT TAATTTTTTTG GTATCTGCTT GATCAAAGTT CGCAATATAA AATATGCTTA
-1446 AAATGCTCTT TTCTGGTATT CATATTAGTT TGTGTATATT ATGTTATTTT TCAATAGCCT CGGCTGATAA
      AP-3
-1376 CGTCTGGTTG GTACTCACCA CTGTGGCCCC ATTGGCGGTG AAAACATTTA AATAATTATA AACAGCTGCT
      (-1299 bp)
-1306 GCTCCAACTC CCTGAGTAGC TCCTTGCTGA CCCAACCCCTT CCAGCTCAAC CGGCTCAGGC ATCCTCCATA
      Il-1 response-element
-1236 GGACCCCCAG CACCTTCCCT GTTCTTCATT CCAACATTAA ATTGTCAACA CCTAGCAAAG CAAGGCCCTC
-1166 CAGAGCTCCT GTTACAGGAG GGGGCTCTAT TTAACTTAGT TGGTATCTGT GCCCTGCCAG TTACTAAATA
-1096 TTTCGAATAT CGCACTTAAA TGAAATAAGA AAGTGTGTGC ACAGGCACAC GTGCACACAC ACACACACAC
      c-myc CACC-Box
-1026 CCCGCTGAGC ATAAATTTAA AAAGCATATT TGTTAAGGGT TGAGCATTGT GCTTCAACAC TCTTTCTTTG
      TATA-Box
-956 AAGGAACTTA CTATAAATTT TTGTAGTCAA TAACTTCTAC TTTTTTAGTA CTTTTTGATA TTATCATTCT
      (-877 bp)
-886 ACCTTAAGTT GGACATTTCT TCACAAAGCA GCTCAAATA TTTGAGTGGC AGCTTTTTTTT AAATGATTCAG
      .....>
-816 GGATTTATTA GGTCATACAT GCAAAACACA CTGCTAATTG CATTAGCAAA AGATCAACGT AAAAAACTC
      .....>
-746 CACAATTCTG CAACTGTCAA CTTAAAAATT TTTGTTCTAG TGGTTGAAAG GTCCTCCCTT GTACTCTTGC
-676 CAGTGAGTTA AGTTGTATAG AACATCGTCA GCACCAGCAC AGTTTACAGA ACCTCACAAA CCCAAAGGAA
-606 CATCATTAGA CTAAGCAACT ACAAGGAGGC ATGTGTCCAC ACGCGGGTGA GGTAAGAGG GTCAGTATTG
-536 GTCAAGTGAC AGTGTCAGTA ATCTGGCAAG ACAGCGATGT TAAGAAGGTT CATAGTTTAA GAATTATCTA
-466 AAATATTTTA AAAACTATAA AATTGCAACA CATGATTTTT ACACCTAGTT ACTGGAAAAC TAAGGAAAGC
-396 ACTTATTAGC TTGAATAAAA GTAACATGGA AAGCACTTTT ACCGATCTAC AAAAAAACCT TCTAATGCAT
-326 TATGAGAAAG ATTTCATAAT ACAAGGAGGC ATATTGCTCA TTAAGAAAGG GTTCTATAAG AAAAGCACTT
      CCAAT-Box
-256 ACTAAGTTAG AACTAAGGG AACGACCAGT TTAAAGATGA ATTAAATGCC CAATTTGGGG AGGGATGGCT
-186 GATGTAAGAG AAAGGAAAAG CTTAAGTAAA CACTTCCTGA TAACACCAAC CTTTCTTTAA TCATCTACTG
-116 CATTTGACAG AAATTAACCT TTTAGAGTTT TTACCCTTGA CACTTTTATT CTTGTACCC GCCGCTTCTG
      Rac1
-46 GTCTCAGCGC CCTGCTGCTG CCCCTGCGGC CCAGCGAGCG GCCCAGATGC AGGCATCAA GTGTGTGGTG

```

Abbildung 18: Sequenz der 5'-Region des Rac1-Pseudogens mit dem putativen Promotor. Hervorgehoben (fett und darüber markiert) sind der Translationsstart (ATG), „repeat elements“ (><), mögliche Transkriptionsinitiationsstellen (→) und promotortypische Motive für Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Die pG13-Promotorkonstrukte und deren erste Base sind markiert ( ).

Zu den häufigsten regulativen Elementen in Promotoren zählen die GC-Box (CCGCCC), die CACC-Box (CACCC) und die „SP-1 binding site“ (GGGCGG). In den meisten funktionalen Genen befindet sich eine Folge von fünf bis sechs GC-Boxen vor dem TATA-Motiv, die gleichzeitig die Erkennungsequenz für den Transkriptionsfaktor SP-1 („stimulating protein“), einem wichtigen Steuerungsfaktor für die Transkriptionsgeschwindigkeit, beinhaltet. Es findet sich weder eine GC-Box noch ein SP-1 Motiv, aber eine CACC-Box (-1029 bp) in der Sequenz. Der putative Promotor enthält weiter distal Konsensusmotive für „enhancer“, die bereits in anderen eukaryontischen Genpromotoren identifiziert und auf ihre Wirkung überprüft worden sind (Harrison *et al.*, 1996; Kelner *et al.*,



2000). Mit den Programmen GCG und Generunner sowie der Datenbank Transfac finden sich unter der Maßgabe der vollständigen Übereinstimmung (0 „mismatches“) Konsensusbindungsstellen für NF-E1 (-1382 bp, -2782 bp), für das Onkogen ETS (-2922 bp, -3811 bp), für das Onkoprotein c-myc (-1049 bp, 2545 bp), ein „IL-1 response element“ (-1208 bp), ein CREB-Motiv („cAMP responsive element binding protein“; -3177 bp) und eine Oktamersequenz (-3038 bp). Es gibt eine „silencer binding site“ (-2242 bp), die nach Bindung verschiedener Proteine zur Abnahme der Transkription führen kann. Es wurden weiterhin Konsensusbindungsstellen für die jun/fos enthaltenden, Homo- oder Heteromerkomplex bildenden Transkriptionsfaktoren AP-1 (-2412 bp), AP-3 (-1355 bp, -1843 bp) und AP-4 (-1315 bp, -2421 bp) gefunden. Bei der Untersuchung der 3'-Region (+649 bp bis +1228 bp), die theoretisch auch regulative Promotorelemente enthalten könnte, wurden keine Motive für Transkriptionsfaktoren gefunden.

#### 4.6 Klonierung der Rac1-Pseudogenpromotor-Fragmente -877 bp, -1299 bp, -2053 bp und -4074 bp in den Luziferase Reporter-genvektor pGl3

Das Ziel der Experimente war, die putative Promotorsequenz vor dem Rac1-Pseudogen auf eine transkriptionelle Aktivität *in vitro* zu untersuchen. Um die Voraussetzungen für die dazu notwendige Reporter-genanalyse zu schaffen, wurden vier verschiedene Reporter-genkonstrukte der Längen 877 bp, 1299 bp, 2053 bp und 4074 bp erstellt. Der pGl3-Basic Vektor (Promega) bildete die Ausgangsbasis der Klonierung (Abb. 19 A). Er enthält das luc-Gen, welches nach Transkription durch Translation in das Protein Luziferase umgeschrieben werden kann. Vor dem Gen liegt der Bereich der „multiple cloning site“, in dem Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsendonukleasen enthalten sind. Weiterhin gibt es neben der bakteriellen Replikationstartregion ORI („origin of replication“) eine Ampicillinresistenz zur Expression des Vektorplasmids in *E.coli*. Die Konstrukte -1299 bp, -2053 bp und -4074 bp wurden durch Mutagenese-PCR von den PAC-Klonen 5 und 6 erstellt und nach deren Restriktion mit den Enzymen XhoI und NcoI gerichtet in den durch Restriktion und Dephosphorylierung modifizierten pGl3-Vektor ligiert.

Nach Transformation der Vektoren, Kultivierung der gewachsenen Kolonien in LB-Medium und Aufreinigung der DNA wurde die Klone durch Restriktion auf positiv einklonierte Fragmente und deren Größe überprüft (Abb. 19 B). Konnte ein Fragment in der Insertgröße identifiziert werden, erfolgte die Sequenzierung zur Kontrolle der hergestellten Konstrukte.

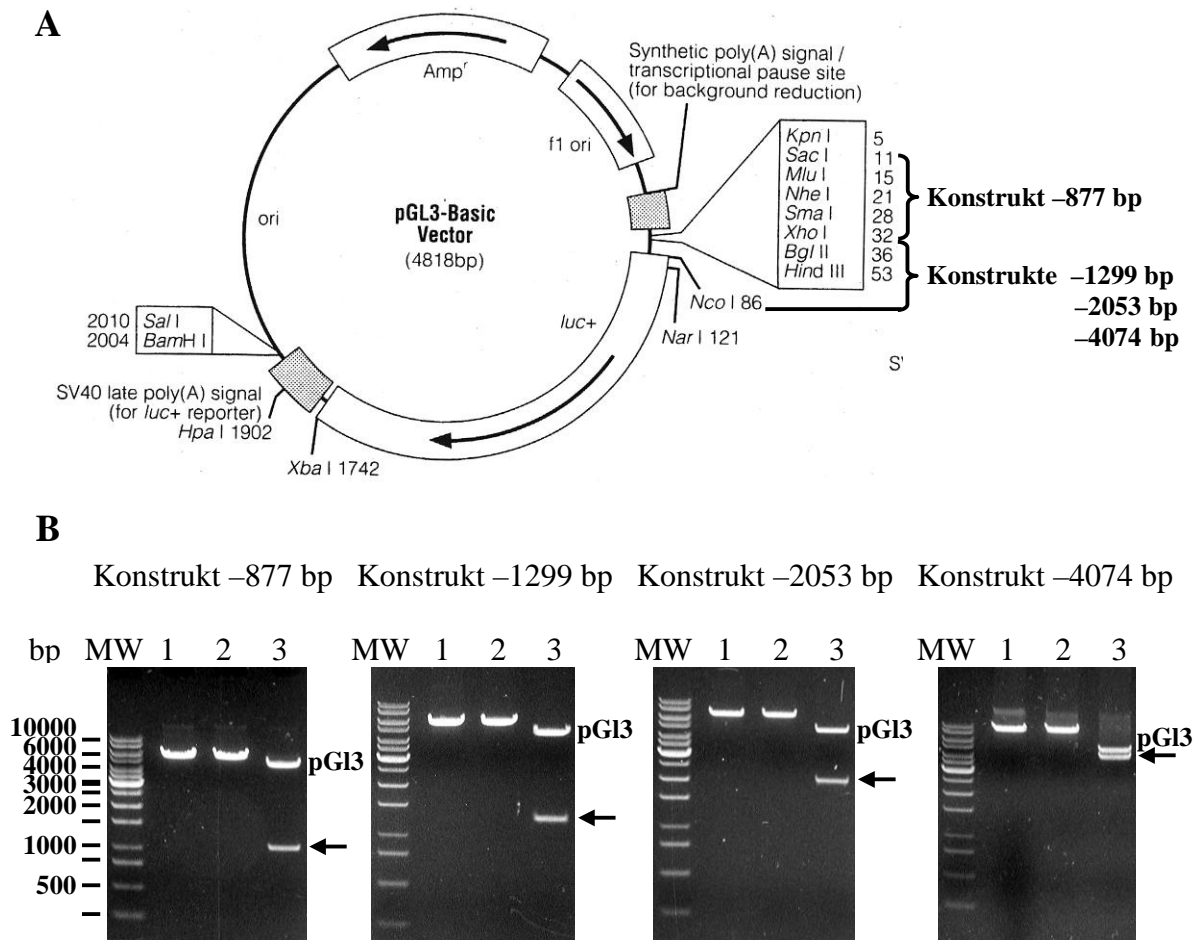


Abbildung 19: **Vektorkonstrukte des Rac1-Pseudogenpromotors in dem Reportervektor pGL3.** (A) Vektorkarte von pGL3 mit der „multiple cloning site“, über die die gerichtete Klonierung der Konstrukte durchgeführt wurde. (B) Die Restriktionsanalysen der 4 Konstrukte zeigen die Größen der Fragmente nach Restiktion mit einem (Bahn 1, 2) und beiden Enzymen (Bahn 3, ←) anhand des „molecular weightmarkers“ (MW).

Die Konstrukte -1299 bp, -2053 bp und -4074 bp wurden „in frame“ kloniert, das heißt, der Promotor hat exakt denselben Abstand zum Reportergen wie zum Ursprungsgen. Das Konstrukt -877 bp wurde aus dem subklonierten Produkt -880 bp bis +105 bp mittels Restriktionsendonukleasen XhoI und SacI ausgeschnitten und ebenfalls gerichtet in den pGL3-Vektor eingefügt. Die vier Vektorplasmide wurden in hochaufgereinigter Form in den nachfolgenden Transfektionsexperimenten eingesetzt.

#### 4.7 Charakterisierung der Aktivität der Rac1-Pseudogenpromotor-Konstrukte

Es wurden zwei verschiedene Zelllinien für die Transfektionsversuche eingesetzt. Zum einen wurde die Fibroblastenzelllinie NIH3T3 benutzt, da in der Mehrzahl der Studien über die zellulären Auswirkungen erhöhter Rac1-Expression für die *in vitro* Experimente murine Fibroblastenzelllinien verwendet wurden (Anand-Apte *et al.*, 1997; Keely *et al.*, 1997). Zum

anderen wurde die Kolonkarzinomzelllinie RKO eingesetzt, weil andere Arbeitsgruppen berichtet haben, dass in Tumoren des Darmes eine erhöhte *in vivo* Expression vorkommt (Fritz *et al.*, 1999; Jordan *et al.*, 1999). Beide Zellreihen wurden mit den erstellten Promotorkonstrukten –877 bp, –1299 bp, –2053 bp –4074 bp oder dem pGl3-Leervektor nach der Lipofectamin-Methode transient transfiziert und mittels Messung der Luziferaseaktivität die Aktivität des Promotors ermittelt.

Zur Prüfung der Transfektionseffizienz der NIH3T3- und der RKO-Zelllinie wurden beide mit 2 µg β-Galaktosidase nach der Lipofectamin-Methode transient transfiziert. Nach 36 h Stunden erfolgte die β-Galaktosidase-Färbung der Zellen. Das Substrat X-Gal, das von den positiv transfizierten Zellen exprimiert wird, ist als Blaufärbung des Zytoplasmas unter dem Mikroskop erkennbar.

Es wurde zuerst die konstitutionelle Aktivität der Promotorkonstrukte untersucht, die ein Maß für die Basisaktivität der Transkription und Proteinexpression darstellt. Hierzu wurden RKO- und NIH3T3-Zellen entweder mit 1 µg des jeweiligen Konstruktes oder 0,66 µg des Leervektors transient transfiziert. Da die Luziferaseexpression durch den vor dem Gen liegenden Promotor gesteuert wird, erwartet man Unterschiede zwischen den Aktivitäten von Konstrukt und Leervektor.

Wenn man die Luziferaseaktivität in RKO-Zellen (Abb. 20 A) betrachtet, stellt man fest, dass alle Konstrukte eine erhöhte Aktivität gegenüber dem pGl3-Leervektor aufweisen, wobei diese mit zunehmender Länge des Promotors zunimmt. So ergibt sich relativ zur Aktivität des Leervektors eine 2,5-fache Induktion für das Promotorkonstrukt –877 bp, eine 3,4-fache für –1299 bp, eine 4,3-fache für –2053 bp und eine 5,4-fache für das längste Konstrukt –4074 bp. Das Ergebnis in NIH3T3-Zellen (Abb. 20 B) zeigt ebenfalls erhöhte Aktivitäten der Konstrukte im Vergleich zum transfizierten Leervektor. Eine lineare Zunahme der Aktivität ist hier jedoch nicht feststellbar. Die Aktivität steigt bei –877 bp um das 3,0-fache und bei –1299 bp auf das 5,8-fache gegenüber dem Leervektor pGl3, bleibt dann jedoch trotz weiterer Längenzunahme der Konstrukte auf einem Plateau der 5,0-fachen Induktion.

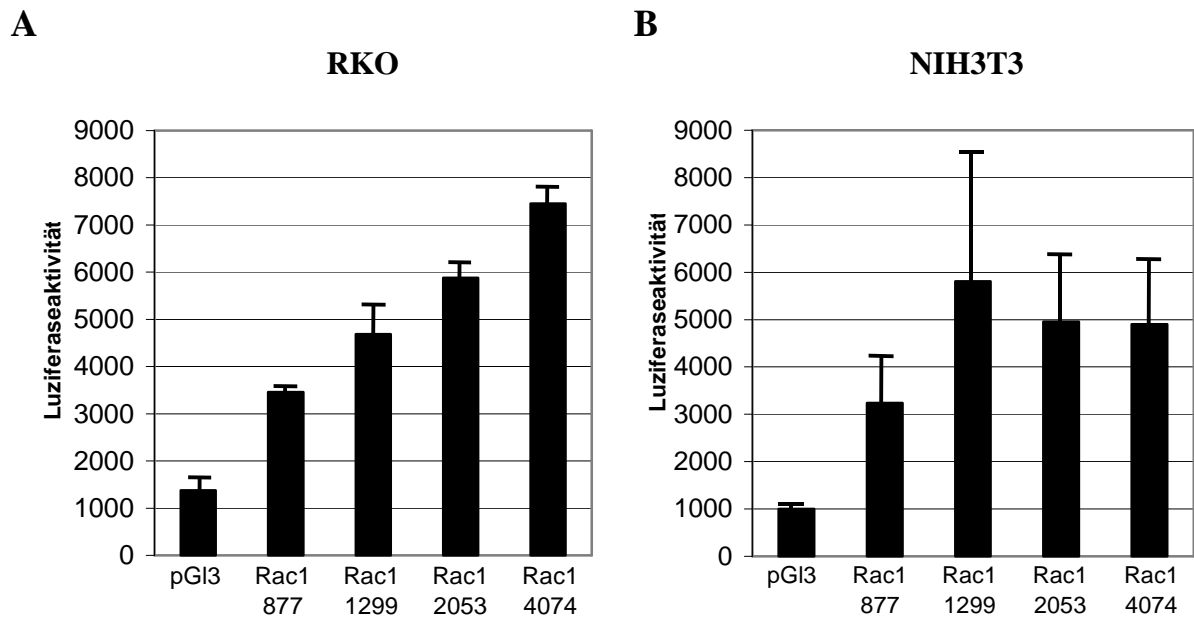


Abbildung 20: **Konstitutionelle Aktivität der Rac1-Pseudogenpromotor-Konstrukte –877 bp, –1299 bp, –2053 bp und –4074 bp in RKO- und NIH3T3-Zellen.** RKO-Zellen (A) und NIH3T3-Zellen (B) wurden mit jeweils 1 µg Promotorkonstrukt (Rac1 877, Rac1 1299, Rac1 2053, Rac1 4074) oder 0,66 µg des Kontrollvektors (pGI3) transfiziert. Nach Absaugen des Transfektes 6 h später wurden die Zellen 12 h auf DMEM gesetzt, danach lysiert und die Luziferaseaktivität gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte plus Standardabweichungen. Der Versuch wurde bei den RKO-Zellen 2 mal, bei den NIH3T3-Zellen 3 mal wiederholt.

Aufbauend auf der Erkenntnis, dass alle Konstrukte des klonierten Pseudogenpromotors eine konstitutive Aktivität besitzen, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Sequenz durch Stimulation mit Wachstums- und Stressfaktoren in ihrer Aktivität beeinflussbar ist. Dies wäre ein weiterer Hinweis auf transkriptionelle Aktivität des Rac1-Pseudogens. Hierzu wurde das Zytokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und der Wachstumsfaktor „platelet derived growth factor B/B“ (PDGF B/B) in rekombinant gewonnener Form eingesetzt. Interleukin-1 $\beta$  ist ein Zytokin, das zelluläre Entzündungsreaktionen vermittelt, und induziert Rac1-Aktivierung innerhalb des JNK/p38-Signaltransduktionsweges in Zellen des Immunsystems und in Bindegewebszellen (Bagrodia *et al.*, 1995a; Whitmarsh *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1995). PDGF B/B ist eine von drei Isoformen eines Mitogens für Bindegewebs- und Epithelzellen, das von Thrombozyten freigesetzt wird, und unter anderem Membranumbauvorgänge und Zellmigration über Rac und den MAPK-Signaltransduktionsweg induziert (Anand-Apte *et al.*, 1997; Fleming *et al.*, 1996). In den genannten Studien wurden beide Faktoren zur Stimulation bei Transfektionsexperimenten verwendet. Aus diesem Grund fanden diese Faktoren auch bei uns Anwendung.

Vorab galt es, die optimale Stimulationszeit der Zellen (Abb. 21) und die einzusetzende Konzentration der Stimulantien festzulegen. Es wurden RKO-Zellen entweder

mit dem Promotorkonstrukt  $-2053$  bp oder mit dem pGl3-Leervektor transfiziert und nach 24 h auf „growth arrest medium“ (GAM) für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 16 h in zwei Untersuchungsreihen mit 10 pg/ml Il-1 $\beta$  und 10 ng/ml PDGF B/B stimuliert. In Abbildung 21 A und B sieht man vergleichend den Verlauf der Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von den Stimulationszeiten und die unstimulierten Kontrollen. Unter Il-1 $\beta$  (Abb. 21 A) ist die Aktivität des Promotors stets höher als ohne. Sie steigt bis auf das 4,7-fache bei 8 h Stimulationszeit an. Eine weitere Verlängerung der Einwirkdauer bringt keine höhere Induktion. Der Leervektor wird hingegen durch Il-1 $\beta$  nur minimal stimuliert.

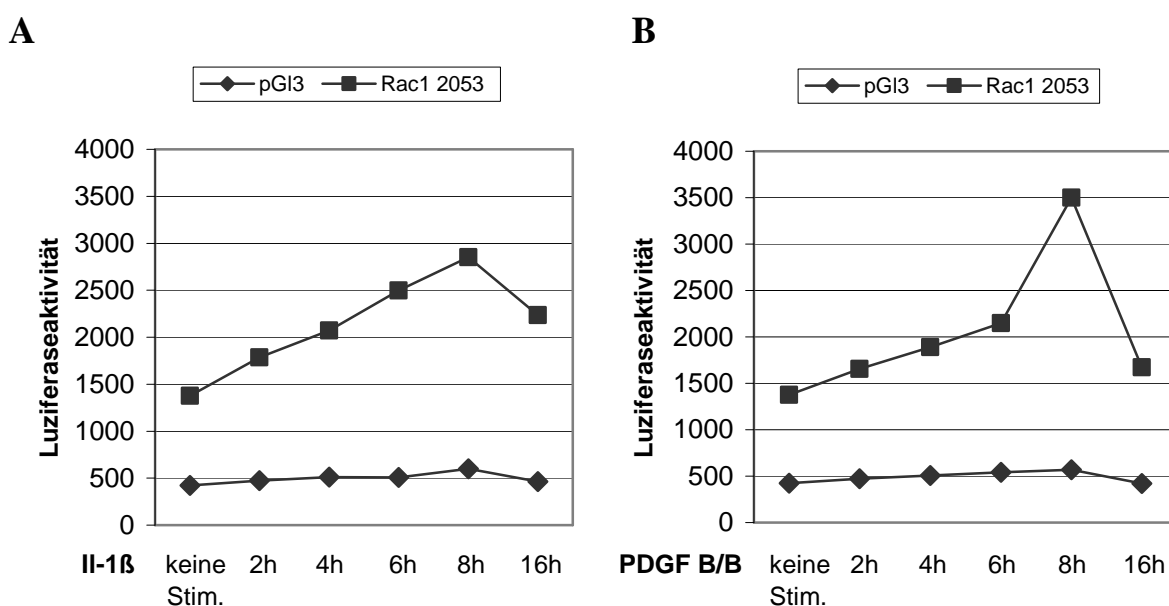


Abbildung 21: **Zeitlicher Verlauf der Stimulation des Rac1-Pseudogenpromotors durch IL 1 $\beta$  und PDGF B/B.** RKO-Zellen wurden mit 1  $\mu$ g Promotorkonstrukt (Rac1 2053) oder 0,66  $\mu$ g Kontrollvektor transfiziert, für 24 h auf GAM gesetzt und danach mit 10 pg/ml Il-1 $\beta$  (A) oder 10 ng/ml PDGF B/B (B) für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, und 16 h stimuliert. Nach Kultivierung für weitere 24 h in Vollmedium wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt.

Unter Einwirkung von PDGF B/B (Abb. 21 B) zeigt sich ebenfalls erhöhte Aktivität in stimulierten Zellen gegenüber den unstimulierten. Hier ist nach einem schwächeren Anstieg das Maximum von 6,1-facher Induktion auch nach 8 h erreicht, wohingegen der Leervektor in äquimolarer Konzentration nicht stimulierbar ist.

Die Konzentrationen der eingesetzten Stimulantien wurden der Literatur entnommen. Sie beträgt 10 pg/ml für Il-1 $\beta$  und 10 ng/ml für PDGF B/B. Die Stimulantien wurden wenn nicht extra vermerkt nur in den genannten Konzentrationen verwendet.

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der Stimulation mit Il-1 $\beta$  und PDGF B/B auf die Aktivität des Pseudogenpromotors untersucht. Da sich die konstitutionellen Aktivitäten der Konstrukte je nach Länge des klonierten Promotors in den

beiden Zelllinien unterscheiden (siehe Abb. 20), wurde die Stimulation mit den Faktoren für jede Zelllinie gesondert betrachtet. Es wurden Fibroblasten der Zelllinie NIH3T3 mit jeweils 1 µg der Konstrukte -877 bp, -1299 bp, -2053 bp und -4074 bp transfiziert und mit 10 pg/ml Il-1β oder 10 ng/ml PDGF B/B für 8 h und 16 h stimuliert, während die Vergleichsgruppe zur Ermittlung der basalen Promotoraktivität unstimuliert blieb.

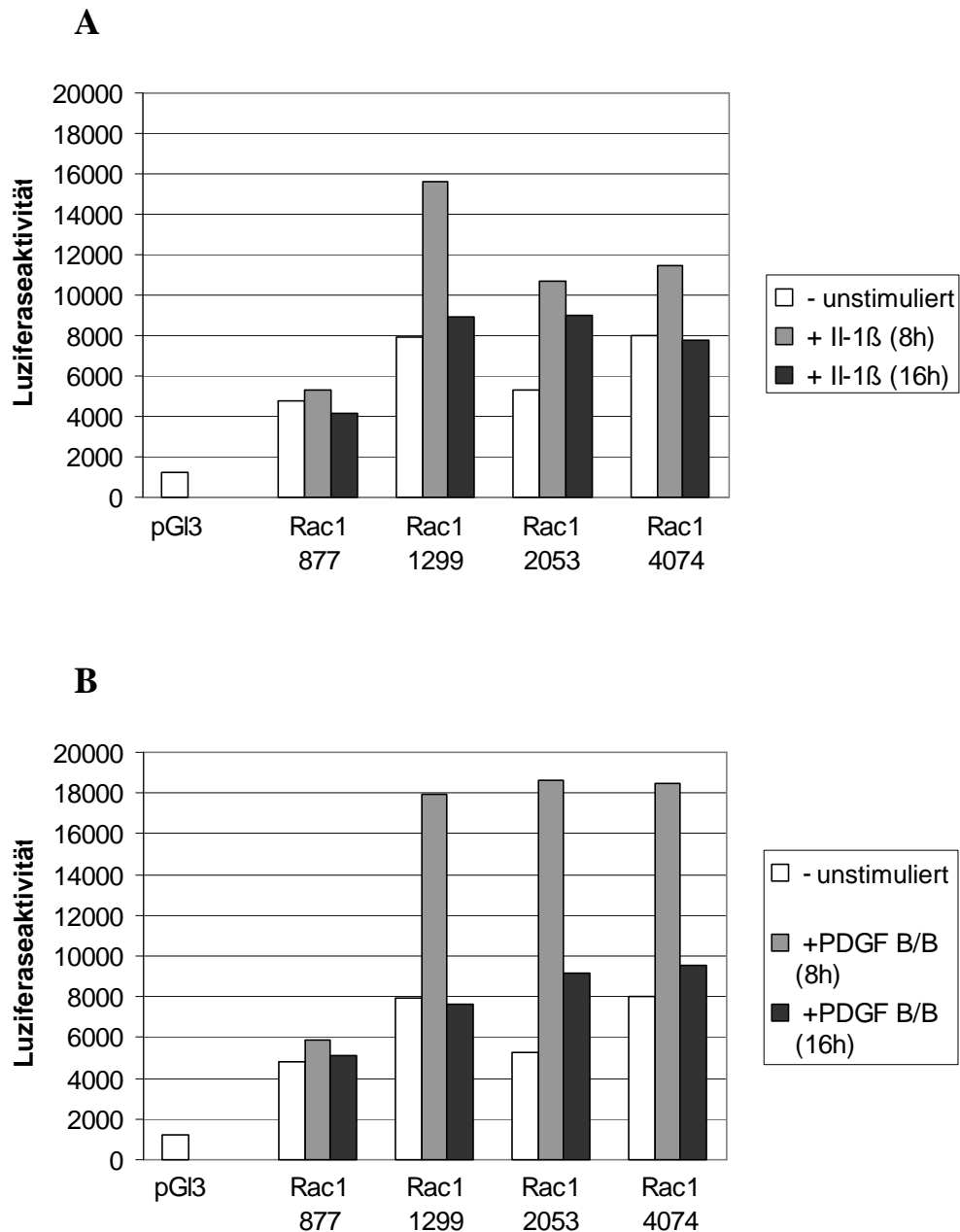
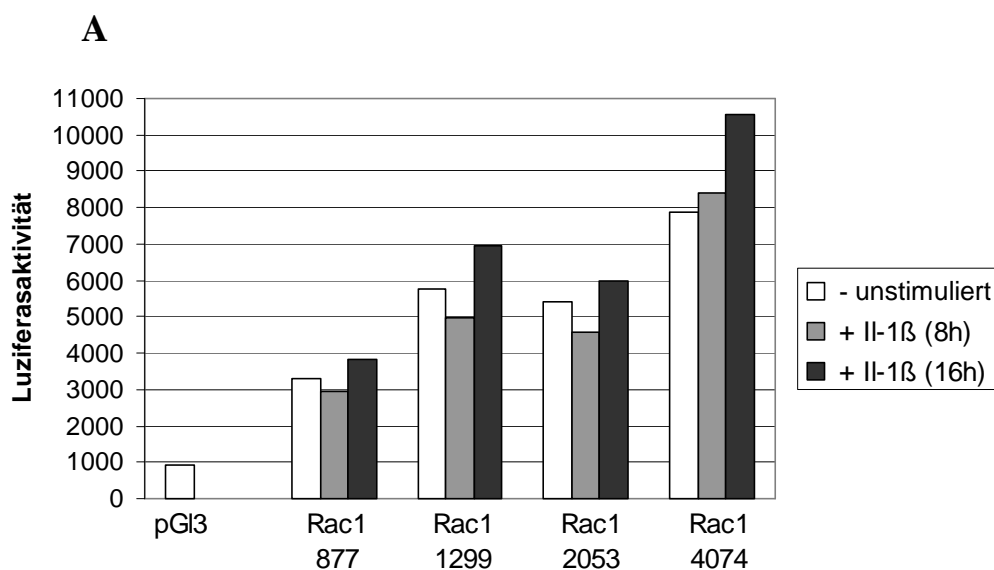


Abbildung 22: **Stimulation des Rac1 Pseudogenpromotors durch Il-1β und PDGF B/B in NIH3T3-Zellen.** Es wurden NIH3T3-Zellen mit jeweils 1 µg der Promotorkonstrukte Rac1 877, Rac1 1299, Rac1 2053, Rac1 4074 oder mit 0,66 µg Leervektor pGI3 transfiziert. Die Konstrukte blieben entweder unstimuliert (weiße Balken) oder wurden nach 24 h auf GAM mit 10 pg/ml Il-1β (**A**) bzw. 10 ng/ml PDGF B/B (**B**) für 8 h (graue Balken) und 16 h (schwarze Balken) stimuliert. Nach Kultivierung auf Vollmedium für weitere 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität gemessen.

Dabei zeigt sich bei Stimulation mit Il-1 $\beta$  (Abb. 22), dass die unstimulierten Konstrukte (weiße Balken) eine weitgehend zunehmende Induktion um das 3,8-fache, 6,3-fache, 4,3-fache und 6,5-fache relativ zum Leervektor zeigen, wie sie auch annähernd bei der konstitutionellen Aktivität (siehe Abb. 20 B) beobachtet wurde. Abweichend von den bisherigen Ergebnissen (siehe Abb. 20 B) ist der Wert für die basale Aktivität des längsten Promotorfragments –4074 bp erhöht. Unter Stimulation mit Il-1 $\beta$  für 8 h (Abb. 22 A, graue Balken) ist die Aktivität der Promotorfragmente –1299 bp, –2053 bp und –4074 bp deutlich gegenüber den Basalwerten erhöht. Die Induktion beträgt 2,0, 2,0 und 1,4. Nach 16 h (schwarze Balken) sind die Aktivitäten weitgehend rückläufig.

Die Stimulans PDGF B/B für 8 h (Abb. 22 B, graue Balken) führt zu einer Erhöhung der Promotoraktivität derselben Fragmente wie bei Il-1 $\beta$ , wobei eine Induktion um das 2,3-fache, 3,2-fache und 2,3-fache relativ zu den Basalwerten zu sehen ist. Nach 16 h (schwarze Balken) sind die Aktivitäten größtenteils auf die Ausgangsebene zurückgekehrt.

Betrachtet man die Kolonkarzinomzelllinie RKO (Abb. 23 A), so ist bei der basalen Aktivität (weiße Balken) eine weitgehend zunehmende Induktion von 3,5-fach, 6,1-fach, 5,7-fach und 8,4-fach im Vergleich zum Leervektor vorhanden. Eine Erhöhung der Aktivität des Promotors durch Stimulation ist weder nach 8 h (graue Balken) noch nach 16 h (schwarze Balken) zu sehen. Die Induktion relativ zu den Basalwerten der Konstruktaktivitäten bewegt sich zwischen 0,8-fach und 1,3- und ist damit sehr gering. Sie erhöht sich nicht mit der Länge des Promotors.



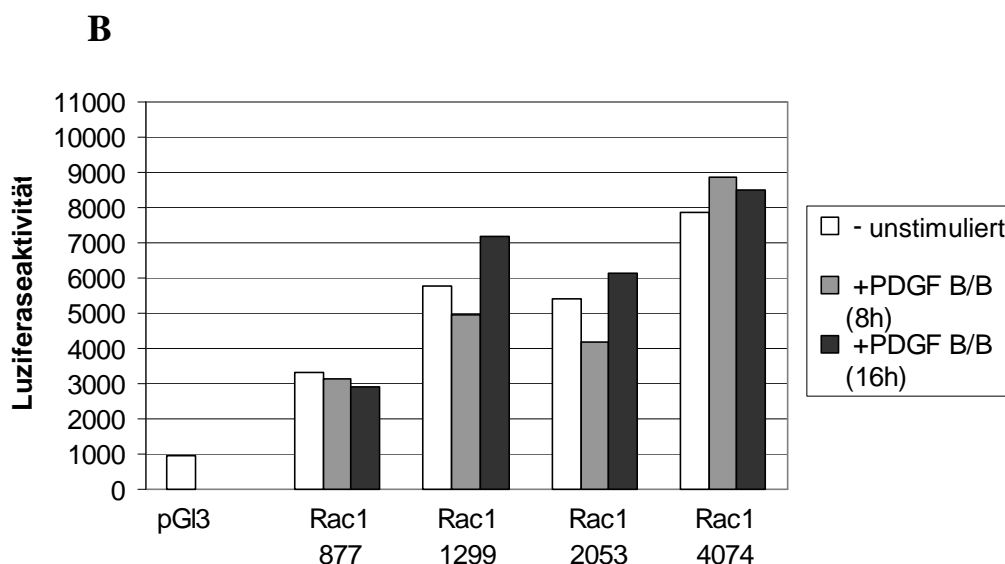


Abbildung 23: **Stimulation des Rac1 Pseudogenpromotors durch Il-1 $\beta$  und PDGF B/B in RKO-Zellen.** Es wurden RKO-Zellen mit jeweils 1  $\mu$ g der Promotorkonstrukte Rac1 877, Rac1 1299, Rac1 2053, Rac1 4074 oder mit 0,66  $\mu$ g Leervektor pGI3 transfiziert. Die Konstrukte blieben entweder unstimuliert (weiße Balken) oder wurden nach 24h auf GAM mit 10 pg/ml Il-1 $\beta$  (A) bzw. 10 ng/ml PDGF B/B (B) für 8 h (graue Balken) und 16 h (schwarze Balken) stimuliert. Nach Kultivierung auf Vollmedium für weitere 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität gemessen.

Bei der Stimulation mit PDGF B/B (Abb. 23 B) zeigt sich bei gleicher basaler Aktivität der Promotorkonstrukte (weiße Balken) ebenfalls keine Induktion nach 8 h (graue Balken) oder 16 h (schwarze Balken). Die Induktion rangiert hier zwischen 0,9-fach und 1,2-fach. Auch hier besteht keine Korrelation zwischen Länge des Promotors und Zunahme der Induktion.

Insgesamt findet der bereits aufgezeigte zeitliche Verlauf in den Stimulationsversuchen bei NIH3T3 für Il-1 $\beta$  und PDGF B/B Bestätigung. Weiterhin stellt sich die Induzierbarkeit des Rac1-Pseudogenpromotors in NIH3T3-Fibroblasten deutlicher als in RKO-Zellen dar (vgl. Abb. 22 und Abb. 23).

#### 4.8 Ermittlung des Transkriptionsstartes für das Rac1-Gen

Ein weiterer Bestandteil unserer Rac1-Promotoranalyse war es, die Länge der untranslatierten Region des Rac1-Gens zu ermitteln, um die Stelle des Transkriptionsstartes für die Synthese der mRNA und den Endpunkt des Promotors zu determinieren. In bisherigen Versuchen war es nicht gelungen, die 5'-Region zu amplifizieren, da der GC-Gehalt des Abschnitts sehr hoch ist (Matos *et al.*, 2000). So konnte Matos nur auf Grund von BLAST-Vergleichen zwischen humanen ESTs und der Rac1-Gensequenz vier mögliche Positionen für den Transkriptionsstart angeben, -174 bp, -190 bp, -201 bp und -321 bp.



Es wurde eine Primerextensionsanalyse von hochaufgereinigter mRNA aus RKO-Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Primer *rac1 105 as* und *rac1 32 as* mit  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markiert. Es lässt sich mit Hilfe der Primerlänge die Größen der zu erwartenden Fragmente nach den Vorgaben von Matos berechnen. Sie betragen für den Primer *rac1 105 as* 279 bp, 295 bp, 306 bp und 426 bp, für den Primer *rac1 32 as* 206 bp, 222 bp, 233 bp und 333 bp.

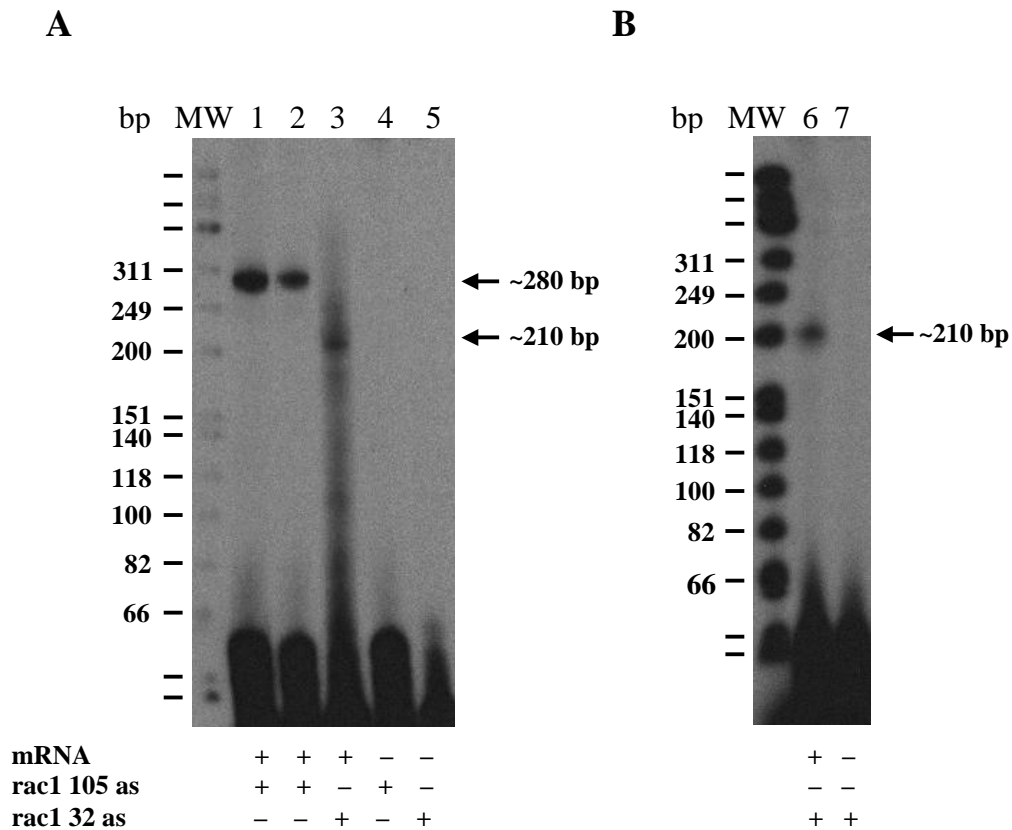


Abbildung 24: **Ergebnis der Primerextensionsanalysen zur Ermittlung des Transkriptionsstartes.** (A,B) Die Primer *rac1 105 as*, *rac1 32 as* und der DNA-Marker  $\phi\text{X174}$  *HinfI* DNA „molecular weight marker“ (MW) wurden mit  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  radioaktiv markiert, an 2  $\mu\text{g}$  (Bahn 1, 3) oder 1  $\mu\text{g}$  (Bahn 2, 6) mRNA angelagert und mit einer reversen Transkriptase verlängert. Als Negativkontrolle wurde statt mRNA  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  verwendet (Bahn 4, 5, 7). Danach erfolgte die Produktaufreinigung in einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Die Ergebnisse wurden auf Röntgenfilm dokumentiert.

Auf dem Polyacrylamidgel (Abb. 24 A und B) sind unter Zuhilfenahme des Größenmarkers eine Bande von ~280 bp (Bahn 1, 2) für den Primer *rac1 105 as* und eine Bande von ~210 bp (Bahn 3, 6) für den Primer *rac1 32 as* zu sehen, jedoch keine vergleichbar großen Banden in den Negativkontrollen ohne mRNA (Bahn 4, 5, 7). Am Unterrand des Gels liegen die überzeichneten Banden der Primer (Bahn 1-7). Die Größen der beiden Amplifikate stimmen mit den Errechneten für den Transkriptionsstart an Position -174 bp überein.

#### 4.9 Vergleich der Rac1-Expression in Kolonkarzinomgewebe und normaler Kolonschleimhaut

Neben den Untersuchungen zu Gen und Pseudogen der Rho-GTPase Rac1 wurde noch ein anderer Aspekt untersucht - die Proteinexpression. In unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass die Rac1-Proteinexpression in malignem Mammagewebe um das 2,7-fache gegenüber dem benignen Gewebe und die Rac1-mRNA Transkription um das 1,4-fache für das 2,4 kb Transkript bzw. das 2,0-fache für das 1,1 kb Transkript erhöht ist (Schnelzer *et al.*, 2000). Weiterhin wurde Rac1b, eine Splicevariante der Rac1 mRNA, in benignen Mammageweben, in Magengewebe und in der Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 entdeckt (Schnelzer *et al.*, 2000), die auch in Kolongewebe mit erhöhter Expression beschrieben wurde (Jordan *et al.*, 1999). Dies legte die Überlegung nahe, ob Rac1 in Kolonkarzinomzellen auf Proteinebene ebenfalls hochreguliert ist.

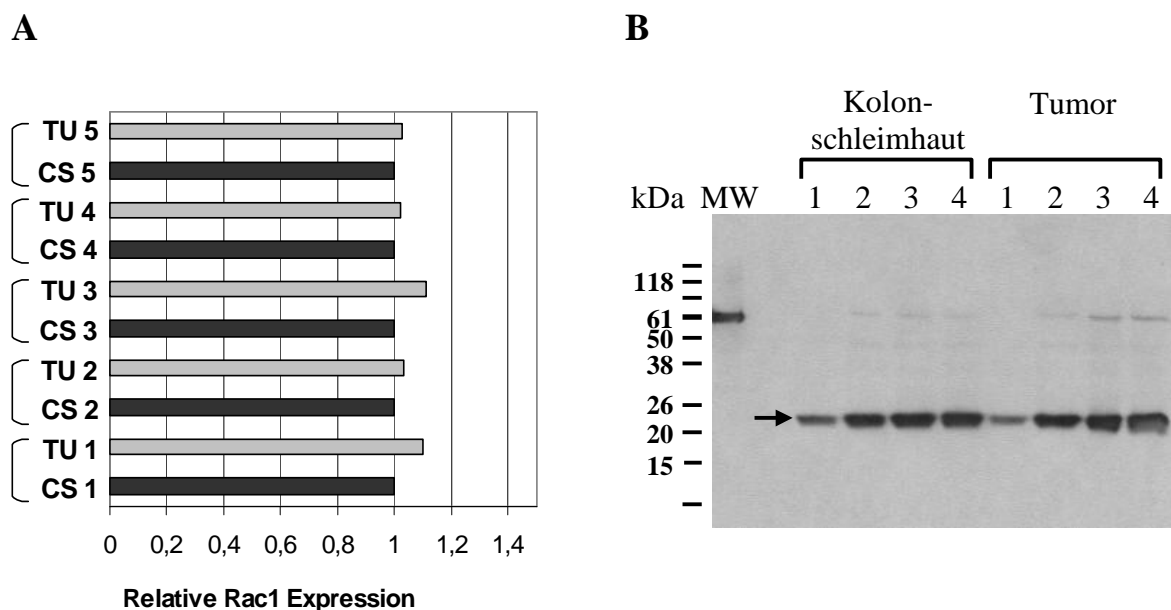


Abbildung 25: **Quantitativer Vergleich der Rac1-Expression in 5 Gewebeprobe aus Adenokarzinomen des Kolons (TU) und normaler Kolonschleimhaut (CS).** Die Gewebeprobe wurden in gefrorenem Zustand mechanisch zerschlagen und nach Lyse auf ihren Proteingehalt hin überprüft. (B) Es wurden jeweils die Proteinmengen 10 µg (Bahn 1), 50 µg (Bahn 2), 75 µg (Bahn 3) und 100 µg (Bahn 4) in die Western Blot Analyse eingesetzt. Rac1 wurde mit dem monoklonalen Primäntikörper mouse-anti-rac (1:2000, Biomol) und dem Peroxidase gekoppelten, polyklonalen Sekundäntikörper anti-mouse (1:2000, Santa Cruz) detektiert. (A) Die exponierten Röntgenfilme wurden gescannt und die Banden mit Hilfe des Programms Sigma ScanPro quantifiziert. Daraus wurde für jedes Probenpaar (1-5) die relative Rac1-Expression im Tumorgewebe (TU) zum Normalgewebe (CS) berechnet.

Es wurden dazu von fünf Adenokarzinomen des Kolons, die bereits in endoskopisch gewonnenen Biopsieproben histologisch gesichert worden waren, dem intraoperativen Schnellschnittpräparat durch den Pathologen jeweils makroskopisch erkennbares Karzinomgewebe und normale Dickdarmschleimhaut entnommen. Die Gewebe wurden nach Lyse auf ihren Proteingehalt untersucht, und äquivalente Mengen des Lysates einer Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen Rac1 unterzogen. Die Größe von Rac1 beträgt 21 kDa (Didsbury *et al.*, 1989). Der quantitative Vergleich der Western Blot Banden von Kolonschleimhaut und Tumorgewebe der fünf Proben (Abb. 25 A) zeigt die relative Rac1-Expression im Tumorgewebe (graue Balken) zum Normalgewebe (schwarze Balken). Die Proteinexpression ist in den Tumorgeweben nicht erhöht. Abbildung 25 B zeigt eine repräsentative Analyse eines Probenpaares. Es ist eine klare Bande der Größe von ~21 kDa (→) sowohl in unauffälliger Kolonschleimhaut als auch im Tumor zu erkennen.

## 5. Diskussion

Die Erforschung der Rho-GTPasen und speziell von Rac1 ist in den letzten Jahren sehr intensiv vorangetrieben worden. Die Beteiligung an der Entstehung von verschiedenen Krankheitsbildern auf den Gebieten Krebserkrankung und neurodegenerative Leiden ist bekannt (Boettner and van Aelst, 2002). Ihre Bedeutung und Funktion auf zellulärer Ebene in der Regulation von Umbauvorgängen des Zytoskeletts, von verschiedenen Signaltransduktionswegen, von der Progression des Zellteilungszyklus sowie von Zellbewegung und Invasivität wurden wiederholt nachgewiesen (van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). Die Untersuchungen der spezifischen Regulation der GTPasen durch Nukleotidaustauschfaktoren wie GEFs, GAPs und GDIs, ihre Identifizierung und die Erschließung immer neuer Einflußfaktoren, die oberhalb der Aktivierungskaskaden liegen, ergeben ein breitgefächertes Spektrum an Ergebnissen (Zohn *et al.*, 1998). Es zeigt sich eindeutig, dass die zellulären Prozesse nicht hintereinander geschaltete Abläufe sondern ein riesiges Netzwerk sind, das verschiedenste Querverbindungen der Einheiten untereinander aufweist. Das Hauptproblem der meisten Forschungsergebnisse im Bereich der GTPasen liegt darin, dass die Funktionen hauptsächlich in Zellkulturexperimenten mit Zelllinien und Experimenten an Mausmodellen charakterisiert wurden. Sie ermöglichen zwar eine Abschätzung des *in vitro* Potentials für physiologische und pathophysiologische Vorgänge in Zellen, können aber nicht einfach auf die *in vivo* Situation im Organismus übertragen werden. Gerade die Untersuchungen der Tumorbilogie werden durch die Tatsache erschwert, dass neben den Tumorzellen auch Fibroblasten, Zellen des Immunsystems, Endothelzellen und andere Zelltypen Einfluß auf Tumorentstehung und Progression nehmen.

Die maligne Transformation einer Zelle geht mit einer Veränderung von Protoonkogenen einher, die durch Mutation, Amplifikation oder Proteininstabilität zu Onkogenen werden (Kinzler and Vogelstein, 1996). Ras sowie Rac1, RhoA und Cdc42 sind Mitglieder der Ras-Superfamilie GTP-bindender Proteine und Elemente von Signaltransduktionswegen, die wichtige Funktionen im Bereich der Signalvermittlung zum Kern zur Folge haben (Hunter, 1997). Der MAPK-Signaltransduktionsweg ist in 50 % bösartiger Brusttumoren konstitutiv aktiv (Santen *et al.*, 2002; Sivaraman *et al.*, 1997). Für Ras konnte gezeigt werden, dass Mutationen in der Nukleotidbindungstasche zu einer konstitutiv-aktiven Form führte, dass diese Mutation in verschiedenen, malignen Tumoren in bis zu 80 % der Fälle, im Mammakarzinom aber nur in 8 % der Fälle nachweisbar ist (Bos, 1989) und dass Ras in Mammakarzinomen gegenüber benignem Gewebe überexprimiert ist (Miyakis *et al.*, 1998). Für Rac1, RhoA und Cdc42 konnte bis jetzt keine der Mutationen in malignem

Mamma- und Kolongewebe *in vivo* nachgewiesen werden (Rihet *et al.*, 2001; Schnelzer *et al.*, 2000), die bei *in vitro* Versuchen zu einer konstitutiven Aktivierung und zu maligner Transformation in Mausfibroblasten führten (Rac1V12, Rac1L61, Rac1I115) (Anand-Apte *et al.*, 1997; Keely *et al.*, 1997). Dafür konnte gezeigt werden, dass Rac1 eine erhöhte Expression sowohl auf Protein als auch RNA-Ebene in malignem Mammagewebe gegenüber den benignen Proben aufweist (Schnelzer *et al.*, 2000). Weiterhin wurde die Überexprimierung der GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 in bösartigen Tumoren der Lunge, des Kolons and der Mamma nachgewiesen (Fritz *et al.*, 1999). Diese Daten weisen daraufhin, dass sich eine mögliche Komponente der Fehlregulation der Rho-GTPasen bei der malignen Transformation auf Transkriptionsebene befindet.

### 5.1 Isolation und Charakterisierung von Rac1-Pseudogen und Rac1-Gen

Zur Erschließung von Regionen, die neben bekannten Sequenzen auf DNA-Ebene liegen, bieten sich verschiedene Strategien an. Wir wählten 1999 den Weg des Genomewalkings, da das menschliche Genom noch nicht erschlossen war. Ausgehend von der Rac1-mRNA wurden Fragmente humaner genomischer DNA mit einem genspezifischen Primer (*GSP1*) und einem Adapterprimer (*API*) mittels PCR auf mögliche Produkte geprüft und in einem zweiten Schritt mit einer „nested“ PCR selektiert (siehe Abb. 10). Das Ergebnis war ein Fragment (956 bp), dessen Sequenzierung ein 32 bp Abschnitt von Rac1 und ein 924 bp Abschnitt aus der gesuchten 5'-Region ergab. Nachdem durch Verlängerung der Sequenz die Rac1-Spezifität gegenüber den nahverwandten Rac2 und Rac3 gesichert worden war (siehe Abb. 11), wurde die Sequenz mit PAC-Klonen einer humanen DNA-Bibliothek des DHGP hybridisiert und 10 positive Klone gefunden. Die Doppelstrangsequenzierung der PAC-Klone 5, 6 und 9 ergab eine Sequenz von 5544 bp, welche die intronlose, proteinkodierende Sequenz für Rac1 (579 bp), einen 4316 bp Abschnitt der 5'-Region und einen 649 bp Abschnitt der 3'-Region enthält. Der Vergleich mit der im Juni 2000 veröffentlichten, vollständigen Sequenz des Rac1-Gens (AJ\_132695) (Matos *et al.*, 2000) wies darauf hin, dass die von uns erschlossene Sequenz dieser nur in bestimmten Bereichen entsprach (siehe Abb. 12) und höchstwahrscheinlich zu einem Pseudogen von Rac1 gehört, welches auf dem Chromosom X q26.2-27.2 lokalisiert wurde (AL\_022576). Pseudogene sind zumeist Kopien des „echten“ Gens in posttranslational modifizierter Form ohne Intronsequenzen. Gleichzeitig konnte Matos *et al.* durch FISH („fluoreszenz *in situ* hybridization“) zeigen, dass das Rac1-Gen auf Chromosom 7p22 liegt. Ihre erschlossene Region von 30 kb enthält das vollständige Rac1-Gen mit sämtlichen Exon- und

Intronsequenzen, das für das Insert der Splicevariante Rac1b (Jordan *et al.*, 1999; Schnelzer *et al.*, 2000) kodierende Exon IIIb, die 5'- und 3'-untranslatierte Region und den Rac1-Promotor (siehe Abb. 13). Betrachtet man die Strategie von Matos *et al.*, so stellt man fest, dass sie ebenfalls Klone einer DNA-Bibliothek zum Screening verwendeten, jedoch unterschieden sich ihre drei Hybridisierungssonden von unserer dadurch, dass sie jeweils aus Intronabschnitt und flankierenden Exonfragmenten bestanden und sich damit im Falle einer Hybridisierung nur an Genstrukturen anlagern konnten, die Intron- und Exonsequenz besitzen (Davies *et al.*, 1989) Mit dieser Methode ist zwar prinzipiell eine Unterscheidung zwischen Gen und Pseudogen möglich, jedoch existieren auch Pseudogene, die weiterhin Exon- und Intronabschnitte enthalten (Mighell *et al.*, 2000; Ploos van Amstel *et al.*, 1990), so dass die Selektion durch oben genannte Sonden ebenfalls ein Pseudogen detektieren kann. Die Konstruktion der hier verwendeten Hybridisierungssonde berücksichtigte nicht die Kombination von Intron- und Exonsequenzen, wodurch die Spezifität für das Rac1-Gen nicht gewährleistet werden konnte. Erneute Versuche des Genomewalkings mit genspezifischen Primern aus der Sequenz des ersten Introns von Rac1 ergaben keine spezifischen Produkte in der Agarosegelelektrophorese. Diese Schwierigkeiten bei der Erschließung der 5'-Region von Rac1 traten ebenso bei Matos *et al.* auf (Matos *et al.*, 2000). Sie sind wahrscheinlich auf den hohen GC-Gehalt der 5'-Region und des Promotors zurückzuführen.

Vergleicht man im nächsten Schritt die proteinkodierenden Sequenzen von Gen und Pseudogen, so fallen in der erschlossenen Sequenz 15 Einzelpunktmutationen auf, von denen in 11 Fällen bei der Translation in Protein eine veränderte Aminosäuresequenz resultieren würde (siehe Tab. 1 und Abb. 14). Die Mutationen wurden in allen drei PAC-Klonen entdeckt. Zwei Mutationen würden zu Veränderungen in einer funktionell bedeutsamen Region (AS 118, AS 122), der Insertregion (AS 117-137), führen. Die Insertregion kodiert für eine Aminosäuresequenz, deren Sekundärstruktur aus zwei  $\alpha$ -Helices und einer Schlaufe bestehen. Sie ist in mobiler, exponierter Lage und bei den Rho-Proteinen Rac2, RhoA/B/C/G und Cdc42 ebenfalls vorhanden, jedoch nicht bei H-Ras (Hirshberg *et al.*, 1997). Sie hat sehr geringen Einfluss auf die GTPasefunktion und GTP-Bindungsfähigkeit (Thapar *et al.*, 2002), aber eine Bedeutung in der Interaktion mit Zielproteinen von Rho-GTPasen (Karnoub *et al.*, 2001). Es gibt keine Übereinstimmung mit den *in vivo* Punktmutationen, die von Schnelzer *et al.* beschrieben wurden (Schnelzer *et al.*, 2000). Weiterhin konnten die Mutationen, die zu einer konstitutiven Aktivierung von Rac1 *in vitro* führten (Rac1V12, Rac1L61, Rac1I115) in der erschlossenen Sequenz nicht festgestellt werden. Es kann nicht gesagt werden, welche Folgen die Mutationen im Rac1-Pseudogen auf die Funktionsfähigkeit des Rac1-Proteins

hätten. Hierzu müsste die Sequenz in ein bakterielles Expressionssystem zur Herstellung von rekombinantem Protein inkloniert werden, um die GTPase-Funktion durch einen Hydrolyse-Assay (Knaus *et al.*, 1992) und die Nukleotidaustauschfunktion durch einen Nukleotidaustausch-Assay (Knaus *et al.*, 1992) beurteilen zu können. Weiterhin fehlt in unserer Sequenz das Exon IIIb, welches für eine Insertion von 19 Aminosäuren zwischen AS 75 und AS 76 der Splicevariante Rac1b kodiert (Schnelzer *et al.*, 2000). Diese Splicevariante wurde *in vivo* sowohl in Brustdrüsengewebe, als auch in vielen anderen Geweben gefunden und eine Überexpression von Rac1b in Kolonkarzinomgeweben beschrieben (Jordan *et al.*, 1999; Schnelzer *et al.*, 2000). Die Proteinstruktur liegt direkt hinter der „switch“ II Domäne (AS 60-75) bietet eine potentielle Threonin-Phosphorylierungsstelle für Kaseinkinase II und Proteinkinase C (Jordan *et al.*, 1999). Der Umstand, dass das Exon IIIb in unserer Sequenz und der Rac1-mRNA fehlt, stärkt die Vermutung, dass es sich um ein „processed pseudogene“ handelt. Jedoch besitzt auch ein Teil der Rac1-mRNA Transkripte das Exon IIIb nicht (Schnelzer *et al.*, 2000).

Die Tatsache, dass so eine Sequenz auf DNA-Ebene in Form eines Pseudogens konserviert wird, führt unweigerlich zu der Frage, warum es Pseudogene überhaupt gibt und wie sie entstehen bzw. entstanden sind. Pseudogene sind Sequenzen in genomischer DNA, die eine so hohe Ähnlichkeit zu den Originalgenen besitzen, dass sie als nicht-funktionale Kopien oder als nahe Genverwandte bezeichnet werden (Mighell *et al.*, 2000).

Für die Entstehung von Pseudogenen gibt es heute zwei akzeptierte Mechanismen (Harrison and Gerstein, 2002). Die eine Möglichkeit besteht darin, dass bei der Duplikation von Genen während der Zellteilung die Kopie durch Mutation, Deletion, Insertion oder „frame shift“ so modifiziert wird, dass bei der Transkription oder Translation kein funktionsfähiges Genprodukt (mRNA oder Protein) mehr entsteht. Diese Gene werden „non-processed“ oder „duplicated pseudogens“ genannt und enthalten weiterhin Exon- und Intronabschnitte. So fehlt z.B. dem MTX-Pseudogen gegenüber seinem funktionalen Gen lediglich der Promotorabschnitt, Exon I und Intron I, wohingegen die 3'-Region vollständig konserviert vorliegt (Long *et al.*, 1996). Die andere Möglichkeit besteht darin, dass nach der posttranslationalen Modifizierung der mRNA („splicing“, etc.) das Transkript durch endogene, reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und in das Genom reintegriert wird („retrotransposition“). Es wird dann ein „processed pseudogene“ genannt und zeichnet sich durch das Fehlen von funktionalen Einheiten wie Introns, dem 5'-Promotor, flankierenden Wiederholungseinheiten (z.B. AluSeq-repeats) und des 3'-Polyadenylierungsabschnitts aus (Vanin, 1985). Aber auch hier gibt es Ausnahmen (Trojanovsky and Leube, 1994). Die von

uns erschlossene Rac1-kodierende Sequenz besitzt keine Intronsequenzen, keine flankierenden Wiederholungseinheiten, keinen 3'-Polyadenylierungsabschnitt, hat eine Homologie von 97 % zur Rac1-mRNA und zeigt damit die Struktur eines „processed pseudogenes“. Die Frage, ob es sich bei der von uns erschlossenen 5'-Region um einen Promotor handelt, wird gesondert behandelt (siehe 5.2).

Die Anzahl von Pseudogenen zu einem funktionalen Gen kann zwischen 1 und 100 rangieren. Ribosomale Gene besitzen eine große Anzahl paraloger Pseudogene. Gene, die in allen Zellen exprimiert werden, sogenannte „house keeping genes“, weisen eher eine geringe Anzahl auf (Mighell *et al.*, 2000). Pseudogene können nahe dem Locus des funktionalen Gens liegen oder weit entfernt auf anderen Chromosomen. Beide Phänomene können zwar beobachtet jedoch nicht erklärt werden. Die vorliegende Sequenz besitzt 93 % Ähnlichkeit zu einem humanen DNA-Klon von Chromosom X q26.2-27.2 (AL\_022576). Hier könnte sich der Ort für unser Rac1-Pseudogen befinden. Ob es sich hierbei um den einzigen Ort handelt oder ob weitere Pseudogene existieren, ist nicht klar. Dazu müssten mit einer Rac1-Pseudogen-Sonde chromosomale Lokalisierungsversuche mittels FISH durchgeführt werden. Da sich aber die 93-prozentige Übereinstimmung nur auf 847 bp bezieht, liegt die Sequenz wahrscheinlich in einem anderen Genomabschnitt. Es existiert also vermutlich das Rac1-Gen auf Chromosom 7q22, ein Rac1-Pseudogen auf Chromosom X und unser erschlossenes Rac1-Pseudogen an einer anderen Stelle im Genom. Wir haben die Sequenz (0 bp bis 5544 bp) am 3. September 2002 in der NCBI Datenbank eingereicht (Access-Nr. AF\_542527).

Es gibt unterschiedliche Gründe für die Existenz von Pseudogenen im Genom eukaryontischer Lebewesen. Das Vorhandensein allein jedoch beweist schon, dass diese DNA-Sequenzen eine Funktion besitzen müssen, da im Gegensatz dazu im Genom von Prokaryonten eine gezielte Entfernung von Pseudogenen stattfindet, möglicherweise um die Genomgröße in bestimmten Grenzen konstant zu halten und dem Selektionsdruck der Evolution widerstehen zu können (Harrison and Gerstein, 2002). Scheinbar ist der Druck in eukaryontischen Organismen geringer, denn hier werden Pseudogene erhalten. Die Verteilung von Pseudogenen im Genom scheint ebenfalls nicht zufällig zu sein. Sie liegen tendenziell in der Nachbarschaft zu Genfamilien, die Zellantworten auf die Umwelt vermitteln. Sie könnten ein Reservoir von genetischem Arbeitsmaterial für die Zelle darstellen, um bei Veränderungen der Umwelt zu Anpassungsvorgängen wieder eingesetzt zu werden (Harrison and Gerstein, 2002). Für diese Theorie spricht auch, dass in Pseudogenesequenzen genetische Veränderungen (Mutationen, Deletionen, Insertionen, etc.) als Teil der genetischen Drift häufiger passieren als in funktionalen Genen, die auf Grund des Selektionsdruckes zufällige



aufgetretene Genveränderungen zum Funktionserhalt korrigieren müssen (Blake *et al.*, 1992; Ophir and Graur, 1997). Auf Pseudogenebene wird sozusagen mit dem genetischen Material „gespielt“. Weitere Erklärungen für die Existenz von Pseudogenen werden sich erst nach deren vollständiger Detektierung, Genom übergreifenden Lageanalysen und Sequenzvergleichen zwischen Gen und Pseudogenkopien ergeben.

Nachdem wir erkannt hatten, dass es sich bei der erschlossenen Sequenz um ein Pseudogen von Rac1 handeln könnte, wurde im nächsten Schritt die Koexistenz von Rac1-Gen und Pseudogen auf DNA-Ebene nachgewiesen. Dies ist mit der Southern Blot Methode möglich (Louie *et al.*, 1989). Hierzu wurde eine radioaktiv markierte Rac1-cDNA Sonde mit humaner genomischer, durch drei Restriktionsendonukleasen geschnittener DNA von Promega und RKO-Zellen hybridisiert und das Bandenverteilungsmuster auf dem Röntgenfilm mit dem theoretisch erwarteten Muster verglichen (siehe Tab. 2 und Abb. 15). Da die Rac1-cDNA Sequenz weitgehend der Pseudogensequenz entspricht, können Banden, die mit der Sonde detektiert werden und das erwartete Schnittmuster aufweisen, dem Pseudogen zugeordnet werden. Das Ergebnis zeigt für beide Proben humaner genomischer DNA das gleiche Bandenmuster, wobei bei den meisten Fragmenten in ihrer Größe jeweils eindeutig eine Unterscheidung zwischen Gen und Pseudogen möglich ist.

Da bei Restriktion der genomischen DNA nicht immer gesichert ist, dass alle Moleküle vollständig geschnitten sind, kann es zu Fragmenten und damit zu artifiziellen Banden kommen, die zusätzlich auftreten und nicht eindeutig zugeordnet werden können (Ausubel *et al.*, 1993). Bei uns traten diese Banden auch auf (siehe Tab. 2), konnten aber durch die Addition der Fragmentlängen dann dem unvollständigen Verdau zugeordnet werden.

Als weitere Möglichkeit können Pseudogene über Amplifikation von genomischer DNA nachgewiesen werden (Nguyen *et al.*, 1991). Hierzu werden PCR Primer verwendet, die entweder am Anfang und am Ende der proteinkodierenden Exonsequenz oder auf zwei nebeneinander liegenden Exonsequenzen eines Genes liegen. Da bei Genen die Exonabschnitte durch unterschiedlich große Introns unterbrochen sind, besitzen die Produkte eine größere Länge oder können wegen der zu großen Distanz (> 10 kb) zwischen den Exonabschnitten nicht mehr synthetisiert werden, während sich bei Pseudogenen durch Fehlen der Introns die Sequenzen meist problemlos erschließen lassen. So zeigte sich in einer PCR von humaner, genomischer DNA (Promega), dass die proteinkodierende Sequenz von Rac1 (0 bp bis +579 bp) mit einem sense-Primer aus Exon I und einem antisense-Primer aus Exon VI amplifiziert werden konnte (siehe Abb. 16). Würde man die Längen der

Intronsequenzen von Rac1 (AJ\_132695) addieren, so käme man auf eine Länge von 25,6 kb. Diese Distanz zusammen mit den Exonabschnitten ist für die PCR längenmäßig nicht zu überwinden. Wir konnten weiterhin zeigen, dass die Sequenz -4100 bp bis +579 bp von humaner genomischer DNA amplifizierbar ist (siehe Abb. 16), also *in vivo* auf dem humanem Genom vorliegt.

## 5.2 Analyse der 5'-Region des Pseudogens – der Rac1-Pseudogenpromotor

Die 5'-gelegene Region eines eukaryontischen Gens enthält normalerweise die Promotoreinheit (siehe Abb. 17). Sie ist das zentrale Steuerelement der Genexpression, da sie einerseits durch die proximalen Elemente die Erkennung des Gens und den ordnungsgemäßen Start der Transkription durch die Polymerase und ihrer Aktivierungsfaktoren möglich macht und andererseits durch distale Elemente für regulative Proteinkomplexe die Häufigkeit der Transkriptionsinitiation und damit die Expression von RNA und Protein Zelltyp-spezifisch beeinflusst (Kornberg, 1999). Pseudogene dagegen sind zu meist funktionell inaktiv, beinhalten also keine funktionsfähige, 5'-gelegene Promotoreinheit, die ihre Expression ermöglicht (Vanin EF, 1985). Trotzdem finden sich einige Pseudogene, deren Transkription beschrieben wurde (Chakrabarti *et al.*, 1995; Renaudie *et al.*, 1992; Sorge *et al.*, 1990; Sun *et al.*, 1998). Sie besitzen zwar nicht vollständige Promotoren, jedoch werden Kontrollelemente für die Transkription in der 5'-Region gefunden (McCarrey *et al.*, 1996). Chakrabarti R *et al.* wiesen für das Pseudogen des „glutamine synthetase-like“ Enzyms die Existenz auf humaner genomischer DNA, transkriptionelle Aktivität, eine funktionelle Promotoreinheit und den Transkriptionsstartpunkt in der 5'-Region des Pseudogens nach (Chakrabarti *et al.*, 1995). Weiterhin kann die Transkription eines Pseudogens auch durch einen Promotor eines anderen funktionalen Gens induziert werden, wie für CYP21A1 gezeigt wurde (Bristow *et al.*, 1993). Es wurde also die 5'-flankierende Region des Rac1-Pseudogens in Zellkulturexperimenten auf eine *in vitro* Promotoraktivität untersucht. Zuvor wurde die Sequenz (4316 bp) analysiert und nach typischen Promotorelementen eukaryontischer Gene (Harrison *et al.*, 1996; Kelner *et al.*, 2000; Singer and Berg, 1991) mit Hilfe der Programme GCG, Genrunner und der Datenbank Transfac durchsucht (siehe Abb. 18).

Die erschlossene Promotorsequenz hat eine Länge von 4,3 kb. Viele der bis jetzt klonierten Promotoren haben eine Länge von < 500 bp, z.B. der Rac2-Promotor mit 188 bp (Ou *et al.*, 1999), einige erreichen jedoch auch Längen von über 6 kb (Hamalainen *et al.*, 2001). Die Festlegung der absoluten Länge von Promotoren wird durch die Tatsache erschwert, dass immer neue regulative Sequenzen entdeckt werden, die oft weit vom

Transkriptionsstart entfernt in 5'-Richtung liegen und nur über eine Schlaufenbildung mit dem Transkriptionsfaktorenkomplex nahe dem Transkriptionsstartpunkt interagieren. Der GC-Gehalt bewegt sich mit 40 % im normalen Bereich. Die putativen Transkriptionsstartpunkte (-824 bp, -776 bp) liegen 800 bp vom Translationsstart entfernt. Die TATA-Box als Erkennungssequenz für die RNA-Polymerase liegt in einer Entfernung von 50-100 bp in typischer Lage. Es findet sich zwar eine GC-reiche Region in 5'-Richtung vor der TATA-Box, jedoch wird diese Region in der vorliegenden Sequenz nicht von CG-Folgen („CpG-islands“) umgeben, wie es sonst für Gene der Fall ist, die in diesen Bereichen durch Methylierung modifiziert und damit in ihrer Expression verändert werden können (Bird, 1986). Die Methylierung der DNA trägt entscheidend zur Genexpression bei, indem unmethylierte Gene abgeschrieben werden, während die Transkription methylierter Gene unterdrückt wird (Siegfried *et al.*, 1999).

Wichtige Promotormotive für die Regulation der Transkription sind die GC-Box und die SP-1 Konsensusbindungsstelle. In Untersuchungen am SV40-Promotor (Singer and Berg, 1991) der als beispielhaft für den Aufbau von Promotoren eukaryontischer Gene gilt, führte die Deletion der GC-Boxen zu einem vollständigen Verlust der Transkription, während schon eine GC-Box Transkriptionsaktivität induzieren konnte. Der Transkriptionsfaktor SP-1 kann an den GC-Boxen, die zumeist gleichzeitig das SP-1 Motiv enthalten, binden, ermöglicht die Anheftung weiterer Transkriptionsfaktoren und induziert die Maximalgeschwindigkeit der basalen Transkription (Kadonaga *et al.*, 1988). Diese Motive sind in der erschlossenen Sequenz nicht vorhanden. Diese Tatsache wäre nicht weiter verwunderlich, da Pseudogene zumeist funktionell nicht aktiv sind. Andererseits konnte zum Beispiel für das Pseudogen des „glutamine synthetase-like“ Enzyms transkriptionelle Aktivität gezeigt werden, obwohl es in der 5'-gelegenen Promotorregion des Pseudogens keine GC-Boxen sondern lediglich „repeat elements“ gibt (Chakrabarti *et al.*, 1995). Diese wiederkehrenden Sequenzen von 8-10 bp, die zumeist vor dem Gen oder aber davor und danach liegen, ermöglichen vermutlich in Promotoren ohne TATA-, CCAAT- oder GC-Boxen die Transkription (Chakrabarti *et al.*, 1995; McCarrey, 1987). In der erschlossenen Sequenz finden sich zwei 10 bp „repeat elements“ in der 5'-gelegenen Region.

Die Erkennungssequenzen für additionalen Regulatoren, wie „enhancer“ und „silencer“, liegen im distalen Teil des Promotors. Transkriptionsfaktoren verschiedener Familien können in diesen Bereichen Einfluß auf die Transkription nehmen. Ausgehend von der vorliegenden Sequenz konnten wir für einige davon potentielle Konsensusbindungsstellen identifizieren: Zwei NF-E1 Motive für GATA-Proteine (Van Esch and Devriendt, 2001), zwei Motive für

die Ets-Onkogenfamilie (Sharrocks, 2001), ein Motiv für c-myc (Marcu *et al.*, 1992), eine Oktamersequenz (Rosales *et al.*, 1987), ein „Il-1 response element“ (Schmid *et al.*, 2001), ein CREB-Motiv (Jameson *et al.*, 1987), Motive für AP-1, AP-3 und AP-4 (Karin, 1995) sowie eine unspezifische „silencer binding site“. Diese Transkriptionsfaktoren bilden die Endstrecke vieler Signaltransduktionswege von der Oberfläche zum Zellkern und kommen in unterschiedlichsten Gewebe- und Zelltypen vor. Einige Faktoren haben auf Zellvorgänge Proliferation und Transformation einen Einfluss (Angel and Karin, 1991). Insgesamt muss für die Sequenzanalyse festgehalten werden, dass die Maßgaben für Konsensussequenzen sehr streng eingestellt wurden (0 „mismatches“). Das Vorhandensein weiterer Konsensusbindungsstellen bei Lockerung der Maßgaben ist also durchaus möglich.

Die Entdeckung verschiedener Erkennungs- und Regulationssequenzen der eukaryontischen Transkription in der Promotorsequenz ist ein Hinweis auf eine mögliche Transkription des Rac1-Pseudogens und auf die Existenz eines Rac1-Pseudogenpromotors. So stellt sich als nächstes die Frage, ob dieser Pseudogenpromotor *in vitro* transkriptionelle Aktivität besitzt. Wir haben hierzu vier Pseudogenpromotorfragmente der Längen 877 bp, 1299 bp, 2053 bp und 4074 bp über eine gerichtete Klonierung in den Luziferase-Reportergenvektor pGl3 eingefügt (siehe Abb. 18 und 19) und nach Überprüfung von Lage und Richtung der inserierten Sequenzen durch Sequenzierung die erstellten Konstrukte in transienten Transfektionen zur Charakterisierung der Rac1-Pseudogenpromotoraktivität eingesetzt. Dies stellt ein gängiges Verfahren zur Promotoranalyse dar, weil das exprimierte Protein eines Reportergens im Gegensatz zum Ursprungprotein besonders leicht in den Zellen zu detektieren ist. Die Reportergene für Chloramphenicoltransferase (CAT), „green fluorescent protein“ (GFP) (Alam and Cook, 1990) und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) sind weitere Erfassungssysteme für die Messung einer Promotoraktivität (Ausubel *et al.*, 1993).

Es wurden die Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3 und die Kolonkarzinomzelllinie RKO für die Transfektionsexperimente verwendet. Folgende Ergebnisse (1)-(3) sprechen für die Existenz und funktionelle Aktivität des Rac1-Pseudogenpromotors:

(1) Es wurde gezeigt, dass der Rac1-Pseudogenpromotor eine basale Aktivität besitzt (siehe Abb. 20). Sie ist größer als die des Leervektors und erhöht sich mit zunehmender Länge. Dabei nimmt sie in RKO-Zellen stetig zu, während in NIH3T3-Zellen das Konstrukt 1299 bp bereits das Maximum der Aktivität zeigt. Dieser Unterschied ist vermutlich dadurch bedingt, dass neben den Basiselementen die Regulationselemente des Promotors durch verschiedenste Faktoren beeinflusst werden, die sich von Zelllinie zu Zelllinie unterscheiden. Auch unter *in vitro* Bedingungen werden in den Zellsystemen Transkriptionsfaktoren auf

Genebene wirksam, deren Einfluß nur schwer zu differenzieren ist, weil es nicht möglich ist, alle regulativen Einflußfaktoren in der Zelle auszuschalten. Vermutlich werden in RKO-Zellen Regulationselemente des Rac1-Pseudogenpromotors wirksam, die in der gesamten untersuchten Sequenz liegen. Der Promotor könnte über das Motiv für c-myc aktiviert werden, da c-myc in RKO-Zellen überexprimiert ist (Taylor *et al.*, 1992), nicht aber in NIH3T3. Für die NF-E1- und Ets-Motive, die ebenfalls in diesem Abschnitt liegen, gibt es in beiden Zelllinien Hinweise auf mögliche regulative Einflüsse.

(2) Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulationsfaktoren PDGF B/B und Il-1 $\beta$  den Promotor in beiden Zelllinien induzieren konnte (siehe Abb. 22 und 23), diese Induktion jedoch nicht sehr stark war. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass nicht die optimalen Stimulatoren eingesetzt wurden. Es werden anscheinend trotzdem Konsensusbindungsstellen durch Transkriptionsfaktoren in der Endstrecke der durch PDGF B/B und Il-1 $\beta$  stimulierten Signalvermittlungswege aktiviert und führen somit zu einer Induktion des Promotors, – als Beleg für regulative Einheiten (in diesem Fall „enhancer“) in der Promotorsequenz.

(3) Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Stimulation durch PDGF B/B und Il-1 $\beta$  in NIH3T3-Zellen die Promotoraktivität des Rac1-Pseudogenpromotors induzierte, während die Stimulation von RKO-Zellen zu einer sehr geringen Induktion gegenüber den Basalwerten führte. Dieser Umstand weist grundsätzlich daraufhin, dass nicht jede Zelllinie stimulierbar ist, also der Promotor nur in bestimmten Zelllinien durch die Stimulationsfaktoren überhaupt induziert werden kann. Die RKO-Kolonkarzinomzellen gehören zu Geweben epithelialer Herkunft, während NIH3T3-Fibroblasten Teil mesenchymaler Gewebe sind. Weiterhin ist es möglich, dass nicht die optimalen Agentien zur Stimulation in RKO-Zellen benutzt wurden. Die spezifische Stimulierbarkeit des Promotors in NIH3T3-Zellen ist mit den Beobachtungen von Whitmarsh *et al.* vereinbar, die in der selben Zelllinie eine erhöhte Genexpression aufgrund von Il-1 induzierter Genaktivierung via MAPK-Signaltransduktionsweg feststellten (Whitmarsh *et al.*, 1997). Die vorliegende Sequenz bietet ein „IL-1 response element“ zur Vermittlung der Wirkung von Il-1 an, für das auch experimentell eine Regulation der Transkription gezeigt werden konnte (Schmid *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass diese Sequenz bei –1208 bp und damit im Promotorkonstrukt 1299 bp liegt, könnte die Ursache für die maximal erreichbare basale und stimulierbare Aktivität des Rac1-Pseudogenpromotors sein (siehe Abb. 20 B und 22 A). Die Stimulierbarkeit der Genexpression von Fibroblasten durch PDGF B/B über den MAPK-Signaltransduktionsweg und den Transkriptionsfaktor Ets wurde ebenfalls beschrieben (Lim *et al.*, 1998). Auch c-myc kann durch PDGF-Stimulation die Aktivierung der Gentranskription induzieren (Barone and Courtneidge, 1995). Da sich ein

c-myc Motiv bei -1049 bp und die Ets-Motive bei -2922 bp und -3811 bp befinden, und dabei die PDGF B/B vermittelte Induktion bereits in dem Konstrukt 1299 bp ihr Maximum erreicht hat (siehe Abb. 22 B), könnte der Transkriptionsfaktor c-myc eine Rolle für die Aktivität des Rac1-Pseudogenpromotors spielen. Es fanden sich keine Untersuchungen, die den Effekt von PDGF B/B und Il-1 auf die Transkription in RKO-Zellen beschreiben, aber von PDGF in NIH3T3-Zellen.

Methodisch muss bei der durchgeführten Charakterisierung eingewandt werden, dass die Aktivität des Rac1-Pseudogenpromotors nur im Vergleich mit dem Rac1-Promotor richtig beurteilt werden kann. Im Moment wird versucht, den Rac1-Promotor zu klonieren (Dr. med. M. Gerhard, II. Med. Klinik), um das Bild der Regulation von Rac1 auf Transkriptionsebene zu vervollständigen, denn bis zum jetzigen Zeitpunkt ist diese Frage immer noch nicht genau geklärt. Die hier beobachteten Aktivitäten der Promotorkonstrukte gegenüber dem Leervektor bewegen sich zwischen 2,5- und 5,8-facher Erhöhung. Vergleicht man diese Werte mit der Aktivität anderer funktioneller Genpromotoren, so sind sie nicht sehr hoch. Der Rac2-Promotor zeigt eine 36-fach höhere Aktivität in RAW264.7 Zellen und eine 219-fach höhere Aktivität in NIH3T3-Zellen als der Leervektor (Ou *et al.*, 1999). Der CK-17 Promotor („cytokeratin“) besitzt eine 100-fach höhere Aktivität in HeLa-Zellen als der CK-17 Pseudogenpromotor (Trojanovsky and Leube, 1994). Dieser Umstand ist mit den Ergebnissen vereinbar, dass der Rac1-Pseudogenpromotor ebenfalls eine zwar geringe aber messbare funktionelle Aktivität besitzt, wie es für Pseudogenpromotoren zumeist der Fall ist, wohingegen die Aktivität des Rac1-Promotors vielleicht deutlich höher ausfällt. Es wäre jedoch auch möglich, dass weitere Promotorelemente in 5'-Richtung weiter distal liegen, die sich unserer Erschließung entzogen haben. Die maximalen, beobachteten Aktivitäten von Pseudogenpromotoren liegen zwischen 5- und 40-facher Induktion (Chakrabarti *et al.*, 1995; Kylo *et al.*, 1995; Thiele *et al.*, 2000; Trojanovsky and Leube, 1994). Weiterhin ist in der Zelle neben der Höhe der Signalintensität zur Aktivierung eines Promotors die Dauer des auslösenden Signals von Bedeutung.

### 5.3 Der Transkriptionsstart für das Rac1-Gen liegt bei -174 bp

Die Stelle des Transkriptionsstartes terminiert das Ende des Promotors und den Beginn der Sequenz für das mRNA-Primärtranskript (siehe Abb. 17). Da es Matos *et al.* nicht gelungen war, mittels 5'-Race die 5'-Region zu amplifizieren und den Transkriptionsstartpunkt mit einer Primerextensionsanalyse zu terminieren, existieren nur vier humane EST-Sequenzen aus BLAST, die mögliche Transkriptionsstartpunkte für Rac1 darstellen (Matos *et*

*al.*, 2000), -174 bp, -190 bp, -201 bp und -321 bp. Es konnte in mRNA von RKO-Zellen mit der Methode der Primerextensionsanalyse der Transkriptionsstartpunkt genauer festgelegt werden. So war es möglich, mit zwei unterschiedlichen antisense-Primern aus der proteinkodierenden Sequenz von Rac1 Produkte zu erstellen, die die mögliche Lage bei -174 bp bestätigen (siehe Abb. 24). Weitere Produkte für andere Startpunkte wurden nicht entdeckt. Da jedoch neben den Produkten kein Sequenziergel mit der Basenfolge aufgetragen wurde, lässt sich der Startpunkt nicht auf die Base genau bestimmen. Die erwähnte 5'-Race ist eine Methode, bei der im ersten Schritt an die mRNA-Moleküle Adaptoren gehängt werden. Im zweiten Schritt erfolgt dann die PCR mit einem Adaptorprimer (AP) und einem genspezifischen Primer (GSP) analog zur Genomewalking-Methode auf DNA. Diese Methode hat den Vorteil, ohne Radioaktivität auszukommen, führt aber je nach GC-Gehalt nicht immer zu einem Produkt, da bei hohem GC-Gehalt die DNA-Polymerase Schwierigkeiten bei der Überwindung der Sekundärstruktur der DNA hat.

Die genaue Festlegung des Transkriptionsstartpunktes ist eine wichtige Voraussetzung für eine funktionelle Promotoranalyse. Bei der Herstellung von 5'- und 3'-Deletionen einer Promotorsequenz sollte die 5'-untranslatierte Region möglichst als funktionale Einheit erhalten werden, weil in diesem Bereich oft wichtige Elemente eukaryontischer Zellen für den weiteren Konstruktionsvorgang bis hin zum funktionsfähigen Protein enthalten sind. Eine bestimmte Erkennungssequenz ermöglicht das Anhängen der Cap-Struktur an das 5'-Ende der mRNA innerhalb der posttranslationalen Modifikation (Shatkin, 1976). Die Cap-Struktur schützt die mRNA vor Degradation im Kern und dient zur Ausschleusung der mRNA aus dem Nukleus zu den Translationseinheiten des endoplasmatischen Retikulums im Zytoplasma. Weiterhin wird dort bei der Initiation der Translation eine bestimmte Basenfolge der 5'-Sequenz zur Erkennung des ATG-Tripletts der ersten Aminosäure Methionin in der Gesamtsequenz durch das Ribosom benötigt (Shatkin, 1985).

#### 5.4 Rac1 ist im Kolonkarzinom nicht überexprimiert

Für das Mammakarzinom konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Expression von Rac1 auf Proteinebene in malignen gegenüber benignen Geweben erhöht ist (Fritz *et al.*, 1999; Schnelzer *et al.*, 2000). Es wurde dabei in den immunhistochemischen Färbungen durch Schnelzer *et al.* festgestellt, dass Rac1 bereits in Geweben des präinvasiven DCIS starke Expression und auch in den benignen, hyperplastischen Veränderungen der Mamma erhöhte Expression zeigt. Da beim Mammakarzinom die Entwicklungsstadien histologisch und genetisch nicht so genau abgegrenzt werden können wie beim

Kolonkarzinom (Kinzler and Vogelstein, 1996), stellte sich die Frage, ob nicht die Höhe der Rac1-Expression beim Kolonkarzinom, ebenfalls ein Tumor epithelialer Herkunft, mit den Stadien Dysplasie – polypöses Adenom - villöses Adenom - invasives Adenokarzinom einhergeht. Dazu wurde vorab die Rac1-Proteinexpression in histologisch gesicherten Adenokarzinomen des Kolons und normaler Kolonschleimhaut mit der Western Blot Methode untersucht (siehe Abb. 25). Es war in allen fünf malignen Läsionen keine Überexpression von Rac1 feststellbar. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Fritz *et al.* überein, die ebenfalls in Kolonkarzinomen keine Rac1-Überexpression fanden (Fritz *et al.*, 1999). Erstaunlicherweise konnten sie jedoch für die GTPase RhoA eine signifikante Überexpression in bösartigen, epithelialen Tumoren der Brust, der Lunge und des Kolons zeigen. Zusätzlich fanden sie auch Cdc42 in Mammakarzinomen überexprimiert. Diese *in vivo* Ergebnisse in Zusammenschau mit dem *in vitro* Potential der Rho-GTPasen, multiple zelluläre Vorgänge zu beeinflussen (van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997), weisen daraufhin, dass die Rho-GTPasen in dem Prozess der malignen Transformation von Zellen eine wichtige Rolle spielen.

### 5.5 Ausblick

Die molekularbiologischen Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Erkenntnisse zum funktionalen Bild der Rho-GTPase Rac1 auf genetischer Ebene erweitern. Durch den Erschließungsversuch des Rac1-Gens und dessen Promotors sowie durch die Charakterisierung des neu gefundenen Rac1-Pseudogens und des Rac1-Pseudogenpromotors wird die Komplexität der Regulation von funktionalen Genen und ihrer Verwandten, den Pseudogenen, in eukaryontischen Zellen erst bewusst. Das Zusammenspiel und ihre gegenseitige Beeinflussung stellen den Gegenstand weiterer Untersuchungen dar. Dazu ist die Suche nach weiteren Pseudogenen von Rac1 im humanen Genom sowie deren Vergleich und Charakterisierung eine weitere wichtige Fortführung dieser Arbeit. Der fragliche Einfluss der Transkription und deren regulativen Faktoren auf die Überexpression von Rac1 auf RNA- und Proteinebene konnte bis jetzt nicht geklärt werden, da die Klonierung des Rac1-Promotors, die funktionelle Analyse seiner Einheiten und damit die Erschließung von *in vitro* und *in vivo* Einflussfaktoren in benignen und malignen Geweben noch nicht gelungen ist. Erst die Klärung der transkriptionellen Regulation von Rac1 kann bei der Frage weiterhelfen, ob es transkriptionelle oder posttranskriptionelle Effekte (GEFs, GAPs und GDIs) sind, die bei der malignen Entartung eine Bedeutung für Rho-GTPasen haben. Es ist jedoch leichter, zuerst die Variable der transkriptionellen Regulation von Rac1 zu untersuchen und möglicherweise



auszuschließen, als die Variable der Proteinfaktoren, aus der immer weiter zunehmenden Anzahl, vollständig zu erschließen und den Faktor zu identifizieren, der sowohl in gutartigen als auch transformierten Zellen die wichtigste Rolle in der Regulation von Rac1 auf Proteinebene spielt. In der Charakterisierung eines Promotors ist die Untersuchung der Aktivität der Basiselemente sowie der Regulationselemente ein wichtiger Bestandteil. Hierzu wären genauere Deletionsmutanten notwendig, welche die einzelnen Regulationselemente und die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren gesondert untersuchbar machen. Es wurde die Existenz einer funktionellen Promotorsequenz vor einem Pseudogen von Rac1 aufgezeigt und dessen funktionelle Aktivität unter *in vitro* Bedingungen charakterisiert. Um zu beweisen, dass das Rac1-Pseudogen tatsächlich *in vivo* transkribiert wird, müsste man aus Gewebeproben mRNA extrahieren, mittels reverser Transkription cDNA herstellen, diese subklonieren und die einzelnen Klone durch Sequenzierung nach Rac1-Pseudogen-mRNA durchsuchen.

Es stellt sich neben den vielen molekularbiologischen Erkenntnissen zu den Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 im klinischen Bereich die Frage, inwieweit sich deren Lokalisation und Intensität innerhalb der Zellkompartimente, aber auch die Morphologie mit den klinisch-relevanten Stufen des invasiven Mammakarzinoms und dessen Metastasen, aber auch der Vorstufe „duktales Carcinoma in situ“ (DCIS) *in vivo* in Patientengewebe korrelieren lassen und klinisch-prognostische Relevanz bezüglich des „Outcome“ der Patientinnen besitzen. Hierzu werden bereits 40 Gewebe von Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom und lymphogenen Metastasen und 40 Gewebe von Patientinnen mit DCIS immunhistochemisch unter der Leitung von PD Dr. med. Ernst Lengyel und PD Dr. med. Nadia Harbeck in Zusammenarbeit mit Dr. med. Dieter Prechtel vom Institut für Pathologie und pathologische Anatomie der Technischen Universität München auf die Expression und Lokalisation der Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 untersucht und die Ergebnisse mit den klinischen Faktoren Alter, Tumorstaging (pT, pN), Tumorgrading, Hormonrezeptorstatus, rezidivfreies Überleben, aber auch molekularbiologischen Faktoren wie uPA, PAI1, HER2/neu, c-met, HGF, Ki-67 korreliert. Denn nur die Kombination aus molekularbiologischen Grundlagen und klinischen Anwendungsmöglichkeiten in Diagnostik oder Therapie stellen eine sinnvolle Form des Kampfes gegen die Erkrankung Krebs zum Wohle des Patienten dar.

## **6. Zusammenfassung**

Die Informationsübermittlung von der Zelloberfläche zum Zellkern über Signaltransduktionswege stellt ein zentrales Steuerelement in der physiologischen und pathophysiologischen Regulation von Zellprozessen dar. In Tumorerkrankungen wurden Veränderungen in den Kaskaden des MAPK-Signaltransduktionsweges mit der Entwicklung eines malignen, zellulären Phänotyps nachgewiesen. Die Familie der kleinen Rho-GTPasen, zu der Rac1, RhoA und Cdc42 gehören, regulieren den MAPK-Signaltransduktionsweg und sind zusätzlich Regulatoren zellulärer Vorgänge in den Bereichen der Zytoskelettorganisation, der Zellzyklusprogression sowie der Zellbewegung und Invasion. Konstitutiv-aktive Mutanten der Rho-Proteine führten *in vitro* zur malignen Transformation von Zellen und die Überexpression der Rho-GTPasen in malignen Tumoren konnte für das Mamma- und Kolonkarzinom *in vivo* gezeigt werden. Rac1 ist an der Membrankräuselung und Lamellipodienausbildung, der intrazellulären Signalweiterleitung, an Zellbewegungsvorgängen, an Integrin vermittelten Matrix-Zell- und Zell-Zell-Kontakten, sowie der Erzeugung toxischer Zellsubstanzen (ROS) maßgeblich beteiligt. Da Rac1 ein so wichtiges Schlüsselprotein innerhalb der Zelle ist, stellte sich die Frage ob es noch andere Rac1-Isoformen oder Rac1-Pseudogene gibt und inwieweit diese reguliert werden.

Es wurde versucht, die Rac1-Gensequenz mit der Promotoreinheit auf Genebene zu erschließen. Durch die Kombination aus Genomewalkingverfahren und dem Screening von DNA-Bibliotheken mit der gewonnenen Rac1-Sonde (-880 bp bis +105 bp) gelang uns die Sequenzierung einer Gensequenz von 5544 bp. Wir konnten zeigen, dass es sich bei unserer Sequenz nicht um das Rac1-Gen sondern um ein „processed“ Pseudogen von Rac1 und dessen angrenzende 5'- und 3'-Regionen handelt. Die Sequenzanalyse ergab das Fehlen des Exons IIIb, das für die Splicevariante Rac1b kodiert, und weitere 15 Mutationen, die jedoch bis auf zwei Mutationen in funktionell unbedeutenden Bereichen der proteinkodierenden Sequenz liegen. Wir konnten durch Southern Blot Analysen zeigen, dass die Sequenzen vor Rac1-Gen und Pseudogen auf humaner genomischer DNA nachweisbar sind.

Da die Transkription von Pseudogenen ein nicht so häufiges aber interessantes Phänomen darstellt, wurde die sequenzierte 5'-gelegene Region des Rac1-Pseudogens auf typische Promotorelemente untersucht und eine Charakterisierung der *in vitro* Aktivität des Rac1-Pseudogenpromotors mittels Zellkulturexperimenten durchgeführt. Hierzu wurden vier Promotorkonstrukte der Längen 877 bp, 1299 bp, 2053 bp und 4074 bp in den Luziferase-Reportergenvektor kloniert und durch Transfektionen in NIH3T3-Fibroblasten und RKO-Kolonkarzinomzellen auf ihre basale und stimulierbare Aktivität hin untersucht. Die

Basalaktivität von einer 2,5- bis 5,8-fachen Induktion. Sie konnte in NIH3T3-Zellen durch das Zytokin Il-1 $\beta$  um den Faktor zwei und durch den Wachstumsfaktor PDGF B/B um den Faktor drei gesteigert werden, während die Stimulation in RKO-Zellen keine Wirkung zeigte. Die Ergebnisse zeigen die funktionelle Aktivität des Rac1-Pseudogenpromotors.

Der theoretisch durch BLAST-Vergleich ermittelte Transkriptionsstartpunkt für das Rac1-Gen bei -174 bp konnte durch Primerextensionsanalysen bestätigt werden.

Weiterhin wurde die Proteinexpression von Rac1 in Kolonkarzinomen und deren benignen Schleimhautkontrollen von fünf Patienten mittels Western Blot Analyse gemessen. Rac1 war hierbei im Karzinomgewebe nicht überexprimiert.

Die molekularbiologischen Ergebnisse konnten erstmals durch die Entdeckung und Beschreibung eines Rac1-Pseudogens und eines funktionellen Pseudogenpromotors einen Einblick in die komplexe Organisation des humanen Genoms und dessen funktionalen Einheiten der Gene und Pseudogene in ihren Übereinstimmungen und Unterschieden geben. Zudem wird eine kritische Zusammenschau der methodischen Möglichkeiten und Wege zur Erschließung von funktionellen Genen auf DNA-Ebene, deren Sequenzanalyse und der funktionellen Charakterisierung von Promotoreinheiten gezeigt.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C.G., and Segal, A.W. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. (1991) *Nature*, **353** : 668-670.
- Adam, T., Giry, M., Boquet, P., and Sansonetti, P. Rho-dependent membrane folding causes *Shigella* entry into epithelial cells. (1996) *European Molecular Biology Organization*, **15** : 3315-3321.
- Alam, J. and Cook, J.L. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. (1990) *Annals of Biochemistry*, **188** : 245-254.
- Allen, W.E., Jones, G.E., Pollard, J.W., and Ridley, A.J. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. (1997) *Journal of Cell Science*, **110** : 707-720.
- Anand-Apte, B., Zetter, B.R., Viswanathan, A., Qiu, R.G., Chen, J., Ruggieri, R., and Symons, M. Platelet-derived growth factor and fibronectin-stimulated migration are differentially regulated by the rac and extracellular signal-regulated kinase pathways. (1997) *Journal of Biological Chemistry*, **272** : 30688-30692.
- Angel, P. and Karin, M. The role of jun, fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. (1991) *Biochimica et Biophysica Acta*, **1072** : 129-157.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors. (1999) *Current Opinion in Cell Biology*, **11** : 255-260.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., and Smith, J.A. Current protocols in molecular biology. New York, John Wiley and Sons, Interscience, New York, 1993.
- Aznavoorian, S., Murphy, A.N., Stetler-Stevenson, W.G., and Liotta, L. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. (1993) *Cancer*, **71** : 1368-1383.
- Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R.J., and Cerione, R.A. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. (1995a) *Journal of Biological Chemistry*, **270** : 27995-27998.
- Bagrodia, S., Taylor, S.J., Creasy, C.L., Chernoff, J., and Cerione, R.A. Identification of a mouse p21<sup>Cdc42/Rac</sup> activated kinase. (1995b) *Journal of Biological Chemistry*, **270** : 22731-22737.
- Barone, M.V. and Courtneidge, S.A. Myc but not Fos rescue of PDGF signalling block caused by kinase-inactive Src. (1995) *Nature*, **378** : 438-439.
- Barsky, S.H., Siegal, G.P., Jannotta, F., and Liotta, L. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not their benign counterparts. (1983) *Laboratory Investigation*, **49** : 140-147.

- Bendeck, M.P., Zempo, N., Clowes, A.W., and Reidy, M.A. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinases expression after arterial injury in the rat. (1994) *Circulation Research*, **75** : 539-545.
- Bird, A.P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. (1986) *Nature*, **321** : 209-213.
- Birnbaumer, L., Codina, J., Mattera, R., Cerione, R.A., Hildebrandt, J.D., Sunyer, T., Rojas, F.J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., and Iyengar, R. Regulation of hormon receptors and adenyl cyclases by guanine binding N proteins. (1985) *Recent Prog Horm Res*, **41** : 41-99.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. A rapid alkaline extraction prozedure for screening recombinant plasmid DNA. (1979) *Nucleic Acids Research*, **7** : 1513-1523.
- Bittner, M., Kupferer, P., and Morris, C.F. Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. (1980) *Annals of Biochemistry*, **102** : 459-471.
- Blake, R.D., Hess, S.T., and Nicholson-Tuell, J. The influence of nearest neighbors on the rate of and pattern of spontaneous point mutations. (1992) *Journal of Molecular Evolution*, **34** : 189-200.
- Boettner, B. and van Aelst, L. The role of Rho GTPases in disease development. (2002) *Gene*, **286** : 155-174.
- Boguski, M.S. and McCormick, F. Proteins regulating ras and its relatives. (1993) *Nature*, **366** : 643-654.
- Boorstein, W.R. and Craig, E.A. Primer extension analysis of RNA. (1989) *Methods in Enzymology*, **180** : 347-367.
- Bos, J.L. Ras oncogenes in human cancer. (1989) *Cancer Research*, **49** : 4682-4689.
- Bouck, N., Stellmach, V., and Hsu, S.C. How tumors become angiogenic. (1996) *Advances in Cancer Research*, **69** : 135-174.
- Bourguignon, L.Y., Zhu, H., Shao, L., and Chen, Y.W. Ankyrin-Tiam1 promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration. (2000a) *Journal of Cell Biology*, **150** : 177-191.
- Bourguignon, L.Y., Zhu, H., Shao, L., and Chen, Y.W. CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. (2000b) *Journal of Biological Chemistry*, **275** : 1829-1838.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. (1991) *Nature*, **349** : 117-127.
- Bouzahzah, B., Albanese, C., Ahmed, F., Pixley, F., Lisanti, M.P., Segall, J.D., Condeelis, J., Joyce, D., Minden, A., Der, C.J., Chan, A., Symons, M., and Pestell, R.G. Rho family GTPases regulate mammary epithelium cell growth and metastasis through distinguishable pathways. (2001) *Molecular Medicine*, **7** : 816-830.

- Bristow, J., Gitelman, S.E., Tee, M.K., Staels, B., and Miller, W.L. Abundant adrenal-specific transcription of the human p450c21A "pseudogene". (1993) *Journal of Biological Chemistry*, **268** : 12919-12924.
- Brunet, A. and Pouyssegur, J. Identification of MAP kinase domains by redirecting stress signals into growth factor responses. (1996) *Science*, **272** : 1652-1655.
- Bryan, T.M. and Cech, T.R. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. (1999) *Current Opinion in Cell Biology*, **11** : 318-324.
- Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., and Der, C.J. Increasing complexity of ras signaling. (1998) *Oncogene*, **17** : 1395-1413.
- Chakrabarti, R., McCracken, J.B., Chakrabarti, D., and Souba, W.W. Detection of a functional promoter/enhancer in an intronless human gene encoding a glutamylsynthetase-like enzyme. (1995) *Gene*, **153** : 163-199.
- Chuang, T.H., Xu, X., Knaus, U., Hart, M.J., and Bokoch, G.M. GDP dissociation inhibitor prevents intrinsic and GTPase activating protein-stimulated GTP-hydrolysis by the Rac GTP-binding protein. (1993) *Journal of Biological Chemistry*, **268** : 775-778.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, S. The small GTP-binding proteins rac1 and cdc 42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. (1995) *Cell*, **81** : 1137-1146.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., and Bacchetti, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. (1992) *European Molecular Biology Organization*, **11** : 1921-1929.
- Davies, B., Beo, S., Heard, E., and Fried, M. A strategy to detect and isolate an intron-containing gene in the presence of multiple processed pseudogenes. (1989) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **86** : 6691-6695.
- De Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., and Subramani, S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. (1987) *Molecular and Cellular Biology*, **7** : 725-737.
- Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., and Ulevitch, J. Independent human MAP kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. (1995) *Science*, **267** : 682-685.
- Detrich, W., Westerfield, M., and Zon, L. *Methods in cell biology*. [60], 235-258. (1994). New York, Academic Press.
- Didsbury, J., Weber, R., Bokoch, G.M., Evans, T., and Snyderman, R. Rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. (1989) *Journal of Biological Chemistry*, **264** : 16378-16382.
- Dougall, W.C., Qian, X., Peterson, N.C., Miller, M.J., Samanta, A., and Greene, M.I. The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies. (1994) *Oncogene*, **9** : 2109-2123.

- Fedi, P., Tronick, S.R., and Aaronson, S.A. Growth Factors. In: Cancer Medicine. Holland, J.F., Bast, R.C., Morton, D.L., Frei, E., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1997. 41-64.
- Fleming, I.N., Elliott, C.M., and Exton, J.H. Differential translocation of Rho family GTPases by lysophosphatidic acid, endothelin-1, and platelet-derived growth factor. (1996) *Journal of Biological Chemistry*, **271** : 33067-33073.
- Fritz, G., Just, I., and Kaina, B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. (1999) *International Journal of Cancer*, **81** : 682-687.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A., and Takai, Y. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. (1990) *Oncogene*, **5** : 1321-1328.
- Futreal, P.A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L.M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., and Miki, Y. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. (1994) *Science*, **266** : 120-122.
- Fynan, T.M. and Reiss, M. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor- $\beta$  and its role in oncogenesis. (1993) *Crit Rev Oncog*, **4** : 493-540.
- Garcia, R., Bowman, T.L., Niu, G., Yu, H., Minton, S., Muro-Cacho, C.A., Cox, C.E., Falcone, R., Fairclough, R., Parsons, S., Laudano, A., Gazit, A., Levitzki, A., Kraker, A., and Jove, R. Constitutive activation of Stat3 by the src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. (2001) *Oncogene*, **20** : 2499-2513.
- Garcia, R. and Jove, R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. (1998) *Journal of Biomedical Science*, **5** : 79-85.
- Garrington, T.P. and Johnson, G.L. Organization and regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathways. (1999) *Current Opinion in Cell Biology*, **11** : 211-218.
- Ghoussoub, R.A.D., Dillon, D.A., D'Aquila, T., Rimm, E.B., Fearon, E.R., and Rimm, D.L. Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. (1998) *Cancer*, **82** : 1513-1521.
- Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., and Davis, R.J. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. (1995) *Science*, **267** : 389-393.
- Gutkind, S. Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. (1998) *Oncogene*, **17** : 1331-1343.
- Habets, G.G., Scholtes, E.H., Zuydgeest, D., van der Kammen, R.A., Ra, J., Stam, C., Berns, A., and Collard, J.G. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. (1994) *Cell*, **77** : 537-549.

- Habets, G.G., van der Kammen, R.A., Stam, J., Michiels, F., and Collard, J.G. Sequence of the human invasion-inducing TIAM1 gene, its conservation in evolution and its expression in tumor cell lines of different tissue origin. (1995) *Oncogene*, **10** : 1371-1376.
- Hamalainen, T., Poutanen, M., and Huhtaniemi, I. Promoter function of different lengths of the murine luteinizing hormone receptor gene 5'-flanking region in transfected gonadal cells and in transgenic mice. (2001) *Endocrinology*, **142** : 2427-2434.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. (1994) *Science*, **265** : 808-811.
- Hanahan, D. and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. (1996) *Cell*, **86** : 353-364.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. (2000) *Cell*, **100** : 57-70.
- Hannke-Lohmann, A., Pildner von Steinburg, S., Dehne, K., Benard, V., Kolben, M., Schmitt, M., and Lengyel, E. Downregulation of a mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the placentas of women with preeclampsia. (2000) *Obstetrics and Gynecology*, **96** : 582-587.
- Harris, C.C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic - an abridged historical perspective. (1996) *Carcinogenesis*, **17** : 1187-1198.
- Harrison, D.G., Sayegh, H., Ohara, Y., Inoue, N., and Venema, R.V. Regulation of expression of the endothelial cell nitric oxide synthase. (1996) *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **23** : 251-255.
- Harrison, P.M. and Gerstein, M. Studying genomes through aeons: protein families, pseudogenes and proteome evolution. (2002) *Journal of Molecular Biology*, **318** : 1155-1174.
- Hayflick, L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. (1997) *Biochemistry*, **62** : 1180-1190.
- Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M.D., Cortopassi, G., and Galas, D.J. A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. (1989) *Nucleic Acids Research*, **17** : 6545-6551.
- Hill, C.S., Wynne, J., and Treisman, R. The rho family GTPases rhoA, rac1, and cdc42Hs regulate transcriptional activation by SRF. (1995) *Cell*, **81** : 1159-1170.
- Hillier, L.D., Lennon, G., Becker, M., Bonaldo, M.F., Chiapelli, B., Chissoe, S., Dietrich, N., DuBuque, T., Favello, A., Gish, W., Hawkins, M., Hultman, M., Kucaba, T., Lacy, M., Le, M., Le, N., Mardis, E., Moore, B., Morris, M., Parsons, J., Prange, C., Rifkin, L., Rohlfing, T., Schellenberg, K., and Marra, M. Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags. (1996) *Genome Research*, **6** : 807-828.



- Hirai, A., Nakamura, S., Noguchi, Y., Yasuda, T., Kitagawa, M., Tatsuno, I., Oeda, T., Tahara, K., Terano, T., Narumiya, S., Kohn, L.D., and Saito, Y. Geranylgeranylated rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27Kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells. (1997) *Journal of Biological Chemistry*, **272** : 13-16.
- Hirshberg, M., Stockley, R.W., Dodson, G., and Webb, M.R. The crystal structure of human rac1, a member of the rho-family complexed with a GTP analogue. (1997) *Nature Structural Biology*, **4** : 147-152.
- Hokin, L.E. Receptors and phosphoinositide-generated second messenger. (1985) *Annual Review of Biochemistry*, **54** : 205-235.
- Hunter, T. Oncoprotein networks. (1997) *Cell* , **88** : 333-346.
- Ioannou, P.A., Amemiya, C.T., Garnes, J., Kroisel, P.M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M.A., and de Jong, P.J. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. (1994) *Nature Genetics*, **6** : 84-89.
- Jameson, J.L., Deutsch, P.J., Gallagher, G.D., Jaffe, R.C., and Habener, J.F. Trans-acting factors interact with a cyclic AMP response element to modulate expression of the human gonadotropin alpha gene. (1987) *Molecular and Cellular Biology*, **7** : 3032-3040.
- Jordan, P., Brazao, R., Gespach, C., and Chastre, E. Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. (1999) *Oncogene*, **18** : 6835-6839.
- Kadonaga, J.T., Courey, A.J., Ladika, J., and Tjian, R. Distinct regions of SP1 modulate DNA binding and transcriptional activation. (1988) *Science*, **242** : 1566-1569.
- Kahn, B., Frykberg, L., Brady, C., Stanley, I., Beug, H., Vennström, B., and Graf, T. v-erbA cooperates with sarcoma oncogenes in leukemic cell transformation. (1986) *Cell*, **45** : 349-356.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S., Fukata, M., and Nakagawa, M. Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. (1999) *Current Opinion in Cell Biology*, **11** : 591-596.
- Karin, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. (1995) *Journal of Biological Chemistry*, **270** : 16483-16486.
- Karin, M. and Smeal, T. Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. (1992) *Trends in Biochemical Sciences*, **17** : 418-422.
- Karnoub, A.E., Der, C.J., and Campbell, S.L. The insert region of Rac1 is essential for membrane ruffling but not cellular transformation. (2001) *Molecular and Cellular Biology*, **21** : 2847-2857.
- Katsama, A., Sourvinos, G., Zachos, G., and Spandidos, D.A. Allelic loss at the BRCA1, BRCA2 and TP53 loci in human sporadic breast cancer. (2000) *Cancer Letters*, **150** : 165-170.

- Keely, P.J. Ras and Rho protein induction of motility and invasion in T47D breast adenocarcinoma cells. (2001) *Methods in Enzymology*, **333** : 256-266.
- Keely, P.J., Westwick, J.K., Whitehead, I.P., Der, C.J., and Parise, L.V. Cdc42 and rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. (1997) *Nature*, **390** : 632-636.
- Kelner, M.J., Bagnell, R.D., Montoya, M.A., Estes, L.A., Forsberg, L., and Morgenstern, R. Structural organization of the microsomal glutathione S-transferase gene (MGST1) on chromosome 12p13.1-13.2, identification of the correct promoter region and demonstration of transcriptional regulation in response to oxidative stress. (2000) *Journal of Biological Chemistry*, **275** : 13000-13006.
- Khosravi-Far, R., Solski, P.A., Clark, J.G., Kinch, M.S., and Der, C.J. Activation of Rac1, RhoA, and Mitogen-activated protein kinases is required for ras transformation. (1995) *Molecular and Cellular Biology*, **15** : 6443-6453.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. (1996) *Cell*, **87** : 159-170.
- Knaus, U.G., Heyworth, P., Evans, T., Curnutte, J.T., and Bokoch, G.M. Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. (1991) *Science*, **254** : 1512-1515.
- Knaus, U.G., Heyworth, P., Kinsella, B., Curnutte, J.T., and Bokoch, G.M. Purification and characterization of rac2. (1992) *Journal of Biological Chemistry*, **267** : 23575-23582.
- Kohn, E.C. and Liotta, L. Molecular insights into cancer invasion: Strategies for prevention and intervention. (1995) *Cancer Research*, **55** : 1856-1862.
- Kornberg, R.D. Eukaryotic transcriptional control. (1999) *Trends in Cell Biology*, **9** : M46-M49.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. (1995) *Molecular and Cellular Biology*, **15** : 1942-1952.
- Kraynov, V.S., Chamberlain, C., Bokoch, G.M., Schwartz, M.A., Slabaugh, S., and Hahn, K.M. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. (2000) *Science*, **290** : 333-337.
- Kyllo, J.H., Collins, M.M., and Donohoue, P.A. Constitutive human steroid 21-hydroxylase promoter gene and pseudogene activity in steroidogenic and nonsteroidogenic cells with the luciferase gene as a reporter. (1995) *Endocrinological Research*, **21** : 777-791.
- Lamaze, C., Chuang, T.H., Terlecky, L.J., and Bokoch, G.M. Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. (1996) *Nature*, **382** : 177-179.
- Lambert, M., Choquet, D., and Mege, R.M. Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. (2002) *Journal of Cell Biology*, **157** : 469-479.

- Lawyer, S.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R., and Gelfand, D.H. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermophilus aquaticus*. (1989) *Journal of Biological Chemistry*, **264** : 6427-6437.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. (1998) *Nature*, **396** : 643-649.
- Lengyel, E., Ried, S., Heiss, M.M., Jäger, C., Schmitt, M., and Allgayer, H. Ras regulation of urokinase-type plasminogen activator. (2001) *Methods in Enzymology*, **333** : 105-116.
- Lengyel, E., Stepp, E., Gum, R., and Boyd, D. Involvement of a mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of urokinase promoter activity by c-Ha-ras. (1995) *Journal of Biological Chemistry*, **270** : 23007-23012.
- Liebmann, C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. (2001) *Cell Signal*, **13** : 777-785.
- Lim, C.P., Jain, N., and Cao, X. Stress-induced immediate-early gene, *egr-1*, involves activation of p38/JNK1. (1998) *Oncogene*, **16** : 2915-2926.
- Liotta, L., Steeg, P.S., and Stetler-Stevenson, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. (1991) *Cell*, **64** : 327-336.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. *Molecular Cell Biology*. 4<sup>th</sup> Edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2000.
- Long, G.L., Winfield, S., Adolph, K.W., Ginns, E.I., and Bornstein, P. Structure and organization of the human metaxin gene (MTX) and pseudogene. (1996) *Genomics*, **33** : 177-184.
- Louie, M.C., Nelson, C.A., and Loh, D.Y. Identification of new murine T cell receptor beta chain variable region (V beta) genes. (1989) *Journal of Experimental Medicine*, **170** : 1987-1998.
- Lukas, J., Niu, N., and Press, M.F. p53 mutations and expression in breast carcinoma in situ. (2000) *American Journal of Pathology*, **156** : 183-191.
- Luttrell, D.K., Lee, A., Lansing, T.J., Crosby, R.M., Jung, K.D., and Willard, D. Involvement of pp60-c-*src* with two major signaling pathways in human breast cancer. (1994) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **91** : 83-87.
- Magdolen, V., Arroyo de Prada, N., Sperl, S., Muehlenweg, B., Luther, T., Wilhelm, O.G., Magdolen, U., Graeff, H., Reuning, U., and Schmitt, M. Natural and synthetic inhibitors of the tumor-associated serine protease urokinase-type plasminogen activator. (2000) *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **477** : 331-341.
- Malliri, A., van der Kammen, R.A., Clark, K., van der Valk, M., Michiels, F., and Collard, J.G. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. (2002) *Nature*, **417** : 867-871.
- Marcu, K.B., Bossone, S.A., and Patel, A.J. Myc function and regulation. (1992) *Annual Review of Biochemistry*, **61** : 809-860.

- Matos, P., Skaug, J., Marques, B., Beck, S., Verissimo, F., Gespach, C., Boavida, M.G., Scherer, S.W., and Jordan, P. Small GTPase Rac1: structure, localization, and expression of the human gene. (2000) *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **277** : 741-751.
- McCarrey, J.R. Nucleotide sequence of the promoter region of a tissue-specific human retroposon: comparison with its housekeeping gene. (1987) *Gene*, **61** : 291-298.
- McCarrey, J.R., Kumari, M., Aivaliotis, M.J., Wang, Z., Zhang, P., Marshall, F., and Vandenberg, J.L. Analysis of the cDNA and encoded protein of the human testis-specific PGK-2 gene. (1996) *Developmental Genetics*, **19** : 321-332.
- Mighell, A.J., Smith, N.R., Robinson, P.A., and Markham, A.F. Vertebrate pseudogenes. (2000) *FEBS Letters*, **468** : 109-114.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A., and Karin, M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-jun transcriptional activity by the small GTPases rac and cdc42hs. (1995) *Cell*, **81** : 1147-1157.
- Miyakis, S., Sourvinos, G., and Spandidos, D.A. Differential expression and mutation of the ras family genes in human breast cancer. (1998) *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **251** : 609-612.
- Moll, J., Sansig, G., Fattori, E., and van der Putten, H. The murine rac1 gene: cDNA cloning, tissue distribution and regulated expression of rac1 mRNA by disassembly of actin microfilaments. (1991) *Oncogene*, **6** : 863-866.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. (1987) *Methods in Enzymology*, **155** : 335-350.
- Nguyen, T., Bard, J., Jin, H., Taruscio, D., Ward, D.C., Kennedy, J.L., Weinshank, R., Seeman, P., and O'Dowd, B.F. Human dopamine D5 receptor pseudogenes. (1991) *Gene*, **109** : 211-218.
- Nicolson, G.L. Gene expression, cellular diversification and tumor progression to the metastatic phenotype. (1991) *Bioessays*, **13** : 337-342.
- Nobes, C.D. and Hall, A. Rho, rac and cdc42 GTPases regulate the assembly of multilocal focal complexes associated with actin stress fibers, lamellopodia and filopodia. (1995) *Cell*, **81** : 1-20.
- Nobes, C.D., Hawkins, P., Stephens, L., and Hall, A. Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. (1995) *Journal of Cell Science*, **108** : 225-233.
- O'Brien, L.E., Jou, T.S., Pollack, A.L., Zhang, Q., Hansen, S.H., Yurchenco, P., and Mostov, K.E. Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. (2001) *Nature Cell Biology*, **3** : 831-838.
- O'Connor, K.L. and Mercurio, A.M. Protein kinase A regulates Rac and is required for the growth factor-stimulated migration of carcinoma cells. (2001) *Journal of Biological Chemistry*, **276** : 47895-47900.

- Olson, M.F., Ashworth, A., and Hall, A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G<sub>1</sub>. (1995) *Science*, **269** : 1270-1272.
- Ophir, R. and Graur, D. Patterns and rates of indel evolution in processed pseudogenes from human and murids. (1997) *Gene*, **205** : 191-202.
- Ou, X., Pollock, J., Dinauer, M.C., Gharehbaghi-Schnell, E., and Skalnik, D.G. Identification and functional characterization of the murine Rac2 gene promoter. (1999) *DNA and Cell Biology*, **18** : 253-263.
- Parkes, H.C., Lillykrop, K., Howell, A., and Craig, R.K. C-erbB2 mRNA expression in human breast tumors: comparison with c-erbB2 DNA amplification and correlation with prognosis. (1990) *British Journal of Cancer*, **61** : 39-45.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez, P.I., Bravo, R., and Lacal, J.C. Activation of the nuclear factor kappa B by Rho, Cdc42 and Rac-1 proteins. (1997) *Genes and Development*, **11** : 463-475.
- Ploos van Amstel, H.K., Reitsma, P.H., van der Logt, C.P., and Bertina, R.M. Intron-exon organization of the active human protein S gene and its pseudogene PS beat: duplication and silencing during primate evolution. (1990) *Biochemistry*, **29** : 7853-7861.
- Price, J.E., Aukerman, S.L., and Fidler, I.J. Evidence that the process of murine melanoma metastasis is sequential and selective and contains stochastic elements. (1986) *Cancer Research*, **46** : 5172-5178.
- Qiu, R.-G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., and Symons, M. An essential role for rac in ras transformation. (1995) *Nature*, **374** : 457-459.
- Renaudie, F., Yachou, A.K., Grandchamp, B., Jones, R., and Beaumont, C. A second ferritin L subunit is encoded by an intronless gene in the mouse. (1992) *Mammalian Genome*, **2** : 143-149.
- Reuning, U., Magdolen, U., Wilhelm, O.G., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H., and Schmitt, M. Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). (1998) *International Journal of Oncology*, **13** : 893-906.
- Ridley, A.J., Comoglio, P., and Hall, A. Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by ras, rac, and rho in MDCK cells. (1995) *Molecular and Cellular Biology*, **15** : 1110-1122.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. (1992) *Cell*, **70** : 401-410.
- Ried, S., Jäger, C., Jeffers, M., Vande Woude, G.F., Graeff, H., Schmitt, M., and Lengyel, E. Activation mechanisms of the urokinase-type plasminogen activator promoter by hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF). (1999) *Journal of Biological Chemistry*, **274** : 16377-16386.

- Rihet, S., Vielh, P., Camonis, J., Goud, B., Chevillard, S., and de Gunzburg, J. Mutation status of genes encoding RhoA, Rac1 and Cdc42 GTPases in a panel of invasive human colorectal and breast tumors. (2001) *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **127** : 733-738.
- Rosales, R., Vigneron, M., Macchi, M., Davidson, I., Xiao, J.H., and Chambon, P. In vitro binding of cell-specific and ubiquitous nuclear proteins to the octamer motif of SV40 enhancer and related motifs present in other promoters and enhancers. (1987) *European Molecular Biology Organization*, **6** : 3015-3025.
- Rychlik, W., Spencer, W.J., and Rhoads, R.E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. (1990) *Nucleic Acids Research*, **18** : 6409-6412.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Ehrlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. (1988) *Science*, **239** : 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Santen, R.J., Song, R.X., McPherson, R., Kumar, R., Adam, L., Jeng, M.H., and Yue, W. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. (2002) *J Steroid Biochem Mol Biol*, **80** : 239-256.
- Sauer, H. Tumormanual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München der Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität München. (1998) **7** : 1-10. München, Tumorzentrum München.
- Schmid, B., Wong, S., and Mitchell, B.F. Transcriptional regulation of oxytocin receptor by interleukin-1 beta and interleukin-6. (2001) *Endocrinology*, **142** : 1377-1379.
- Schmitt, M., Jänicke, F., Moniwa, N., Chucholowski, N., Pache, L., and Graeff, H. Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: biological and clinical significance. (1992) *Biological Chemistry (früher: Biological Chemistry Hoppe Seyler)*, **373** : 611-622.
- Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M., and Lengyel, E. Rac1 in human breast cancer: Overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. (2000) *Oncogene*, **19** : 3013-3020.
- Sharrocks, A.D. The ETS-domain transcription factor family. (2001) *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, **2** : 827-837.
- Shatkin, A.J. Capping of eukaryotic mRNAs. (1976) *Cell*, **9** : 645-653.
- Shatkin, A.J. mRNA cap binding proteins: essential for initiating translation. (1985) *Cell*, **40** : 223-224.
- Shay, J.W. and Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. (1997) *European Journal of Cancer*, **33** : 787-791.

- Shelly, C. and Herrera, R. Activation of SGK1 by HGF, Rac1 and integrin-mediated cell adhesion in MDCK cell: PI-3K-dependent and -independent pathways. (2002) *Journal of Cell Science*, **115** : 1985-1993.
- Shirsat, N.J., Pignolo, R.J., Kreider, B.L., and Rovera, G. A member of the ras gene superfamily is expressed specifically in T, B, and myeloid hemopoietic cells. (1991) *Oncogene*, **5** : 769-772.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A., and Lukyanov, S.A. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. (1995) *Nucleic Acids Research*, **23** : 1087-1088.
- Siegfried, Z., Eden, S., Mendelsohn, M., Feng, X., Tsuberi, B.Z., and Cedar, H. DNA methylation represses transcription in vivo. (1999) *Nature Genetics*, **22** : 203-206.
- Simon, A.R., Vikis, H.G., Stewart, S., Fnaburg, B.L., Cochran, B.H., and Guan, K.L. Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase. (2000) *Science*, **290** : 144-147.
- Singer, M. and Berg, P. Gene und Genome. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 1991.
- Sivaraman, V.M., Wang, H.-Y., Nuovo, G.J., and Malbon, C.C. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. (1997) *Journal of Clinical Investigation*, **99** : 1478-1483.
- Smith, C.L. and Hager, G.L. Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. (1997) *Journal of Biological Chemistry*, **272** : 27493-27496.
- Sorge, J., Gross, E., West, E., and Beutler, E. High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease. (1990) *Journal of Clinical Investigation*, **86** : 1137-1141.
- Spandidos, D.A. Oncogene activation in malignant transformation: A study of H-ras in human breast cancer. (1987) *Anticancer Research*, **7** : 991-996.
- Su, L.F., Knoblauch, R., and Garabedian, M.J. Rho GTPases as modulators of the estrogen receptor transcriptional response. (2001) *Journal of Biological Chemistry*, **276** : 3231-3237.
- Sulciner, D.J., Irani, K., Yu, Z.-X., Ferrans, V.J., Goldschmidt-Clermont, P.J., and Finkel, T. Rac1 regulates cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation. (1996) *Molecular and Cellular Biology*, **16** : 7115-7121.
- Sun, R., Elsea, S.H., Patel, P.I., and Funk, C.D. Cloning of a human 'epidermal type' 12-lipoxygenase-related gene and chromosomal localization to 17p13. (1998) *Cytogenetics and Cell Genetics*, **81** : 79-82.
- Sundaresan, M., Yu, Z.-X., Ferrans, V.J., Sulciner, D.J., Gutkind, S., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P.J., and Finkel, T. Regulation of reactive-oxygen species generation in fibroblasts by Rac1. (1996) *Biochemical Journal*, **318** : 379-382.

- Takaishi, K., Kikuchi, A., Kuroda, S., Kotani, K., Sasaki, T., and Takai, Y. Involvement of rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in cell motility. (1993) *Molecular and Cellular Biology*, **13** : 72-79.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kato, M., Yamochi, W., Kuroda, S., Nakamura, T., Takeishi, M., and Takai, Y. Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. (1994) *Oncogene*, **9** : 273-279.
- Taylor, C.W., Kim, Y.S., Childress-Fields, K.E., and Yeoman, L.C. Sensitivity of nuclear c-myc levels and induction to differentiation-inducing agents in human colon tumor cell lines. (1992) *Cancer Letters*, **62** : 95-105.
- Teramoto, H., Crespo, P., Coso, O., Igishi, T., Xu, N., and Gutkind, S. The small GTP-binding protein rho activates c-jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases in human kidney 293T cells. Evidence for a Pac-independent signaling pathway. (1996) *Journal of Biological Chemistry*, **271** : 25731-25734.
- Thapar, R., Karnoub, A.E., and Campbell, S.L. Structural and biophysical insights into role of the insert region in Rac1 function. (2002) *Biochemistry*, **41** : 3875-3883.
- Thiele, H., Berger, M., Skalweit, A., and Thiele, B.-J. Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). (2000) *European Journal of Biochemistry*, **267** : 5473-5481.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. (1998) *Science*, **281** : 1312-1316.
- Troyanovsky, S.M. and Leube, R.E. Activation of the human cytokeratin 17 pseudogene-promoter region by cryptic enhancer elements of the cytokeratin 17 gene. (1994) *European Journal of Biochemistry*, **225** : 61-69.
- van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. Rho GTPases and signaling networks. (1997) *Genes and Development*, **11** : 2295-2322.
- van Biesen, T., Hawes, B.E., Luttrell, D.K., Krueger, K.M., Touhara, K., Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. (1995) *Nature*, **376** : 781-784.
- Van Esch, H. and Devriendt, K. Transcription factor GATA3 and the human HDR syndrome. (2001) *Cellular and Molecular Life Science*, **58** : 1296-1300.
- Vanin, E.F. Processed pseudogenes: characteristics and evolution. (1985) *Annual Review of Genetics*, **19** : 253-272.
- Ventura, C. and Maioli, M. Protein kinase C control of gene expression. (2001) *Critical Review in Eukaryotic Gene Expression*, **11** : 243-267.
- Verschueren, H., De Baetselier, P., De Braekeleer, J., Dewit, J., Aktories, K., and Just, I. ADP-ribosylation of Rho-proteins with botulinum C3 exoenzyme inhibits invasion and shape changes of T-lymphoma cells. (1997) *European Journal of Cell Biology*, **73** : 182-187.



- Weinberg, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. (1995) *Cell*, **81** : 323-330.
- Westwick, J.K., Lambert, Q.T., Clark, G.J., Symons, M., van Aelst, L., Pestell, R.G., and Der, C.J. Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. (1997) *Molecular and Cellular Biology*, **17** : 1324-1335.
- Whitehead, I.P., Zohn, I., and Der, C.J. Rho GTPase-dependent transformation by G protein-coupled receptors. (2001) *Oncogene* , **20** : 1547-1555.
- Whitmarsh, A.J., Yang, S.-H., Su, M.S.-S., Sharrocks, A.D., and Davis, R.J. Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. (1997) *Molecular and Cellular Biology*, **17** : 2360-2371.
- Wittinghofer, A. and Nassar, N. How Ras-related proteins talk to their effectors. (1996) *Trends in Biochemical Sciences*, **21** : 488-491.
- Woodhouse, E.C., Chuaqui, R.F., and Liotta, L. General mechanisms of metastasis. (1997) *Cancer*, **80** : 1529-1537.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. (1995) *Nature* , **378** : 789-792.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. (1980) *Int Rev Cytol*, **68** : 251-306.
- Yamamoto, M., Marui, N., Sakai, T., Morii, N., Kozaki, S., Ikai, K., Imamura, S., and Narumiya, S. ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. (1993) *Oncogene*, **8** : 1449-1455.
- Yarden, Y. and Ullrich, A. EGF and ErbB2 receptor overexpression in human tumors. Growth factor receptor tyrosine kinases. (1988) *Annual Review of Biochemistry*, **57** : 443-478.
- Zhang, S., Han, J., Sells, M.A., Chernoff, J., Knaus, U.G., Ulevitch, J., and Bokoch, G.M. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. (1995) *Journal of Biological Chemistry*, **270** : 23934-23936.
- Zohn, I., Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., and Der, C.J. Rho family proteins and ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. (1998) *Oncogene*, **17** : 1415-1438.

## **8. Verzeichnis der Abkürzungen und Einheiten**

### **8.1 Abkürzungen**

A	Adenin
Abb	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AP-1	Aktivator Protein-1
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
AZ	Adenylatzyklase
bidest.	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BRCA	breast carcinoma factor
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
CREB	cAMP response element binding protein
CTP	Cytidintri-phosphat
d	2'-Desoxy(ribo)-
DAG	Diacylglycerin
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DHGP	Deutsches humanes Genomprojekt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Nährmedium für Zellen)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonuclein acid)
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ER	Östrogenrezeptor (estrogen receptor)
Erk	extracellular signal regulated kinase
EST	expressed Sequence Tag
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
G	Guanin
GAM	growth arrest medium
GAP	GTPase activating protein
GDI	GDP-dissociation inhibitory protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (guanosin nucleotide exchange factor)
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
GPCR	G-protein coupled receptor
GTP	Guanosintri-phosphat
HEPES	N <sub>2</sub> -Hydroxyethylpiperazin-2'-ethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte growth factor
IFN $\alpha$	Interferon $\alpha$
IGF	Insuline-like growth factor
IgG	Immunglobulin G

IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IP <sub>3</sub>	Inositol-Trisphosphat
JAK	Janus kinase
Jnk	c-Jun N-terminal kinase
kB	Kilobasen
LB	Luria-Bertani Broth
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (mitogen aktivierte Proteinkinase)
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase (=MKK)
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (=MKKK)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MW	Molekulargewichtsmarker (molecular weight marker)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NF	nuclear transcription factor
NTPs	Nukleotidtriphosphate
OD	optische Dichte
ori	origin of replication
PAA	Polyacrylamid
PAC	P1-phage derived artificial chromosomes (DNA-Bibliothek)
PAK	p <sup>21</sup> -activated protein kinase
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBD	PAK1-Bindungsdomäne
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered solution)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF B/B	platelet derived growth factor B/B
P <sub>i</sub>	inaktives Phosphat
PIP <sub>2</sub>	Phosphatinositol-Bisphosphat
PKA/C	Proteinkinase A/C
PLC	Phospholipase C
Pos	Position
PR	Progesteronrezeptor.
PTK	Protein Tyrosin Kinase
Rac	Ras-related C3 botulinum toxine substrate
RB	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Sodium- (Natrium-) dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SP-1	stimulating protein 1
SRE	serum responsive element
STAT	signal transducers and activators of transcription
T	Thymin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\alpha$	tissue derived growth factor $\alpha$
Tiam	T-cell lymphoma invasion and metastasis factor
T <sub>m</sub>	melting temperature
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRH	Tyreotropin releasing hormone
Tris	Tris-(hydroxymethyl)amino-methan

Triton	Triton X-100, Octylphenolpolyethylenglykol
TTP	Thymidintriphosphat
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
wt	wildtyp
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
ZR	Zytokinrezeptor

### 8.2 Einheiten

A	Ampere (mA = $10^{-3}$ A)
b	Base(n)
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cpm	counts per minute
d	day
D	Dalton
g	Gramm (mg = $10^{-3}$ g, $\mu$ g = $10^{-6}$ g, ng = $10^{-9}$ g)
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter (ml = $10^{-3}$ l, $\mu$ l = $10^{-6}$ l)
m	Meter ( $\mu$ m = $10^{-6}$ m, nm = $10^{-9}$ m)
M	Molar (mM = $10^{-3}$ M, $\mu$ M = $10^{-6}$ M, nM = $10^{-9}$ M)
min	Minuten
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunden
U	Unit (= $\mu$ g Substrat/ min)
V	Volt (mV = $10^{-3}$ V)
xg	Relative Zentrifugalkraft

### 8.3 Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

## **9. Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Manfred Schmitt bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München zu arbeiten und meine wissenschaftliche Dissertation unterstützt hat. Er hatte stets ein offenes Ohr für meine Anliegen und unterstützte die Fertigstellung der Arbeit.

Ich möchte mich sehr herzlich bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Ernst Lengyel bedanken. Er hat nicht nur mein Interesse an der Grundlagenforschung geweckt und mir die molekularbiologische Denk- und Arbeitsweise beigebracht, sondern er hat es auch stets in menschlich, vorbildhafter Weise verstanden, die konstruktive Zusammenarbeit zu erhalten und auszubauen, indem er jederzeit für mich als Ansprechpartner bei Problemen und Fragen zur Verfügung stand, mich als vollwertiges Mitglied in seiner Arbeitsgruppe integrierte, mir den Einblick in verschiedenste Forschungsgebiete gab und selbstständiges Denken und Arbeiten gefordert hat. Ich danke ihm für sein Vertrauen, das er stets in mich setzte. Auch über die Grenzen hinweg hat er alles nur Mögliche getan, um die Fertigstellung meiner Arbeit zu ermöglichen und meinen Einstieg in das Berufsleben als forschender Arzt zu unterstützen.

Ich möchte mich weiterhin bei meinem zweiten Betreuer Herrn Dr. med. Markus Gerhard (II. Med. Klinik, RDI) bedanken, der mich vor allem im Bereich der Genanalysen beriet, die Genexperimente verfolgte und die Ergebnisse mit mir diskutierte. Er hat auch die Verbindung zu seiner Arbeitsgruppe hergestellt und mir das Arbeiten in den Gastrologie-Laboren der II. Med. Klinik im Klinikum rechts der Isar ermöglicht.

Ein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Viktor Magdolen, der meine Laborarbeit durch kritische Betrachtungsweise und konstruktive Anregungen bereicherte. Er hat sich immer Zeit genommen meine Fragen zu beantworten und seine Vorschläge waren stets hilfreich. Er half mir bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Frau Claudia Jäger, die mir von Anfang an die präzise Ausführung von verschiedenen Methoden und die Zellkultur beibrachte. Sie unterstützte mich maßgeblich bei der Durchführung der Versuche und war für mich stets ein Vorbild an Zuverlässigkeit, Kooperationsfähigkeit und menschlichem Verhalten.

Ich möchte mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Lengyel“ der Frauenklinik der Technischen Universität München Frau Kerstin Dehne, Frau Dr. rer. nat. Sabine Ried, Frau Dr. rer. nat. Sandra Hapke, Frau Dr. rer. nat. Anke Fenn-Rottler, Frau Kathrin Härting und Herrn Dr. med. Andreas Schnelzer für die Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe sowie ihre guten Anregungen und Ratschläge bedanken.

Auch den Mitgliedern der klinischen Forschergruppe möchte ich für die Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit danken.

Ein weiterer Dank geht an Frau Nina Neumayer und Frau Dr. rer. nat. Petra Voland (II. Med. Klinik, RDI). Frau Neumayer wies mich in die Methodik der PCR und der Genklonierung ein und stand mir wie auch Frau Voland bei Verfahrensfragen stets mit Rat und Tat bei Seite.

Die Sequenzierungen der PAC-Klone wurden freundlicherweise kostenlos durch Herrn Dr. rer. nat. Richard Reinhardt und Frau Katja Borzym vom Max-Planck-Institut, Abteilung für molekulare Genetik in Berlin durchgeführt.

Schließlich danke ich meinen Eltern, insbesondere meinem Vater für den wissenschaftlichen Austausch in Gesprächen, und meiner Mutter, meiner Schwester Annette und meinem Bruder Markus ganz herzlich für die moralische Unterstützung durch aufbauende Worte, die sie mir während der Erstellung meiner Doktorarbeit gaben und ohne die ich diese Arbeit nicht geschafft hätte.