

Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Klinikum rechts der Isar

(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle)

Untersuchungen zum kleinen G-Protein Rac1 beim Mammakarzinom

Andreas Christof Schnelzer

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. Privatdozentin Dr. N. Harbeck
2. Univ.-Prof. Dr. M. Werner (schriftliche Beurteilung)
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt (mündliche Prüfung)
3. Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler

Die Dissertation wurde am 14.05.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.12.2001 angenommen.

meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	3
<u>Einleitung</u>	6
Tumorbiologie	6
Mammakarzinom	9
Signaltransduktion	9
MAPKinase-Signaltransduktionsweg	11
Ras- und Rho-GTPasen	13
Kleines G-Protein Rac1	15
<u>Fragestellung</u>	19
<u>Material und Methoden</u>	20
<u>Material</u>	20
Firmen und Reagenzien	20
Zellkultur	21
Vektoren und Primer	21
Auswertung	21
Zelllinien	22
Zellkultivierung	22
Kryokonservierung von Zellen	23
Patientinnenkollektiv	23
<u>Methoden</u>	25
Western Blot	25
DNA-Extraktion aus Gewebe	27
RNA-Extraktion aus Gewebe	28
DNaseI-Verdau	29
RT-PCR	30
Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
Agarose-Gelelektrophorese	33
Subklonierung von PCR-Produkten	34
Klonierung eines Expressionsplasmids	34
Transformation von Plasmid-DNA	35
Präparation von Plasmid-DNA	36
Mini Präparation	36

Qiagen-Aufreinigungsverfahren	37
Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	39
Restriktionsanalyse	39
DNA-Sequenzanalyse	40
Northern Blot	40
Doppelhybridisierung	43
Southern Blot	44
MAPKinase-Assays	46
Gewebeaufschluß für MAPKinase-Assays	46
ERK-Kinase-Assay	47
JNK-Kinase-Assay	48
p38-Kinase-Assay	49
Herstellung rekombinanter Proteine	50
“Aktivierung” von rekombinantem Rac1	52
Rac1-Aktivitäts-Assay	53
Immunhistochemie	54
Nukleotid-Austausch-Assay	56
GTP-Hydrolyse-Assay	57
Ergebnisse	60
Sequenzanalyse von Rac1 im benignen und malignen Mammagewebe	60
Differenzierung der amplifizierten Rac1-PCR-Produkte	71
Rac1b wird nicht nur im Mammagewebe exprimiert	75
GTP/GDP-Austausch und Hydrolyse von Rac1 und Rac1b	75
Überexpression von Rac1-Protein beim Mammakarzinom	78
Nachweis von Rac1b im Western Blot	80
Überexpression von Rac1-RNA beim Mammakarzinom	81
Mammakarzinome zeigen normalen Rac1-DNA-Gehalt	82
Rac1 wird in proliferativem Mammagewebe und im Mammakarzinom überexprimiert	84
Regulation der MAPKinasen durch Rac1-Expression	87
Diskussion	90
Rac1 beim Mammakarzinom: Überexpression, Mutationsanalyse und Charakterisierung einer neuen Rac1-Isoform, Rac1b	90
Rac1 ist im Mammakarzinom nicht mutiert	91
Entdeckung einer neuen Rac1-Isoform, Rac1b	93
Rac1 wird im proliferierenden Mammagewebe und im Mammakarzinom überexprimiert	96
Ausblick	99
Zusammenfassung	100

<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>102</u>
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>111</u>
<u>Einheiten</u>	<u>112</u>
<u>Aminosäuren</u>	<u>113</u>
<u>Danksagung</u>	<u>114</u>

Einleitung

Tumorbiologie

Nach den statistischen Daten des deutschen Krebsregisters sterben jeden Tag in Deutschland etwa 570 Menschen an Krebs. Damit nimmt Krebs hinter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen den zweiten Platz in der Rangliste der Todesursachen ein. Jeder fünfte Deutsche, der heute lebt, wird daran erkranken. Die Anzahl der Menschen, die im Laufe ihres Lebens an Krebs erkranken, nimmt stetig zu. Diese Zunahme der Krebstodesfälle hat unter anderem mit unserer gestiegenen Lebenserwartung zu tun. Jedoch ließen sich auch Umweltfaktoren und ungesunde Ernährung als Risikofaktoren für bestimmte Krebsarten nachweisen. Es handelt sich bei Krebs jedoch nicht um eine Erkrankung, die es erst seit der Industrialisierung gibt. Bei Ausgrabungen von mehr als 5000 Jahre alten Mumien ägyptischer Herrscher entdeckte man an den einbalsamierten Körpern Tumoren, die dem Bild von Krebserkrankungen in der heutigen Zeit entsprechen. Erst im 20. Jahrhundert erlangte man nähere Erkenntnisse über Ursache und Entstehung von Krebserkrankungen. Anfang dieses Jahrhunderts begann man schließlich, zwischen den Begriffen Vererbung, unkontrolliertem Zellwachstum und Autonomie einen Zusammenhang zu erkennen und diese Vorgänge mit der Entstehung bösartiger Tumorerkrankungen in Zusammenhang zu bringen (Mendelsohn et al., 1995). Maßgeblich beteiligt an den damaligen Forschungsergebnissen war der deutsche Pathologe R. Virchow (1821-1902). Virchows Verdienste in der Krebsmedizin liegen vor allem in der Erforschung morphologischer Veränderungen. So groß die Erkenntnisse der Zellulärpathologie auch sind, sie vermochten nicht zu erklären, wie und aus welchem Grund es zur Entstehung von Krebs kommt.

Nach heutigem Verständnis entsteht Krebs durch eine zeitlich aufeinanderfolgende Kummulation genetischer Veränderungen (Kinzler et al., 1996). Kinzler zeigte, daß dies zur Folge hat, daß das Aktivitätsniveau normaler Stoffwechselfvorgänge verändert wird (Dang et al., 1999). Hieraus kann eine Hemmung oder eine Verstärkung der Stoffwechselaktivität resultieren. Es hat sich jedoch gezeigt, daß eine einzige Genmutation nicht ausreicht, damit eine normal Zelle entartet. Nach Vorstellung der bereits Ende der Siebziger Jahre von A.G. Knudson postulierten „multi-hit“ Hypothese (Knudson et al., 1979; Vogelstein et al., 1993) müssen unterschiedliche Gene betroffen sein, die für die Regulation grundlegender Zellvorgänge verantwortlich sind. So können Tumorzellen durch genetische Veränderungen die Fähigkeit erlangen, unabhängig von Wachstumsfaktoren des umliegenden Gewebes zu proliferieren. Tumorzellen können diese Wachstumsfaktoren sogar teilweise selbst synthetisieren (Fedi et al., 1997). Ebenso wie auf diese Weise die Zelle selbst von der G₀- in

die G₁-Phase eintreten kann, ist für Tumorzellen die Ausbildung einer Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen beschrieben worden (Hanahan et al., 2000). Diese bewirken, daß die Zelle in der G₀-Ruhephase bleibt. Gelingt es der Tumorzelle zusätzlich, eine Resistenz gegenüber Apoptosesignalen zu entwickeln, unterliegt die Zelle nahezu keiner Regulation des umliegenden Gewebes mehr, wodurch ein fast unlimitiertes replikatives Potential erworben wird (Hanahan et al., 2000).

Eine weitere Fähigkeit, die jedoch meist von Tumorzellen erst im Laufe des Tumorwachstums erworben wird, ist die Fähigkeit zur Neoangiogenese, das heißt zur Ausbildung neuer Blutgefäße (Bouck et al., 1996; Hanahan et al., 1996; Folkman et al., 1997). Unter einem Durchmesser von 5 mm kann ein Tumor oder eine Metastase durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt werden (Dewhirst et al., 2000; Strohmeier et al., 1999; Folkman et al., 1995; Hahnfeldt et al., 1999). Wächst ein Tumor über diese Größe hinaus, müssen neue Blutgefäße aussprossen. In normalem Gewebe ist die Ausbildung neuer Blutgefäße einem strengen Regulationsvorgang unterworfen, der im Tumorgewebe unkontrolliert abläuft. Die Problematik der Erkrankung liegt also nicht in der Entartung einer einzelnen Zelle. Genetisch veränderte Zellen teilen sich, erlangen unterschiedliche neue Fähigkeiten und reifen unkontrolliert zu großen, makroskopischen Tumoren heran. Im Vergleich zu gutartigen Gewebsvermehrungen, wie z.B. Lipomen, die verdrängend wachsen, stellt man bei Krebserkrankungen insbesondere ein invasiv destruierendes Wachstum fest (Hanahan et al., 2000). Ohne Beachtung von Organgrenzen infiltrieren die Tumorzellen jegliches Gewebe bis zum Verlust dessen Funktion. Tumorzellen sind zudem nicht ortsständig, sondern können z.B. auf dem Blut- oder Lymphweg im gesamten Körper verteilt werden. Kommt es zu einer Aussaat von malignen Zellen vom Primärtumor in ein anderes Organ und wachsen diese Zellen dort an, so spricht man von Metastasierung (Fidler et al., 1990). Auf diese Weise wird den Tumorzellen ermöglicht, Orte mit hohem Nährstoffangebot und zumindest initial unlimitiertem Platzangebot aufzusuchen. Die Metastasierung eines Tumors erfolgt in mehreren Schritten und erfordert von der Einzelzelle ein hohes Maß an Anpassung und Widerstandskraft (Brown et al., 1998; Fidler et al., 1990). Zuerst muß sich eine Zelle aus dem Tumorverband lösen und in das umgebende Bindegewebe eindringen. Dort besteht die Möglichkeit, in ein Blutgefäß einzudringen. Hält nun die Zelle den Druckverhältnissen im Blutgefäßsystem stand, muss sie erneut die Wandschichten eines Blutgefäßes überwinden. Gelingt es der Zelle in dem neuen Organ anzuwachsen, so kommt es durch erneute Zellteilung und lokale Gewebedestruktion zur Ausbildung einer Metastase (Abb. 1).

Trotz umfangreicher Verbesserungen in Früherkennung, Diagnostik und Therapie maligner Tumoren verstirbt der Großteil der Krebspatienten nach wie vor nicht am Primärtumor, sondern an den Metastasen, die in vielen Fällen nicht behandelbar sind (Hoskins et al., 2000, Sporn et al., 1996). Sowohl bei der Suche nach Primärtumoren als auch nach Metastasen kann ein sicherer Nachweis erst ab einer gewissen Zellzahl erfolgen. Man spricht von einer bereits erfolgten Mikrometastasierung, wenn zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des Primärtumors eine Aussaat maligner Zellen unterhalb der Nachweisgrenze im Körper erfolgt ist (Schlimok et al., 1990).

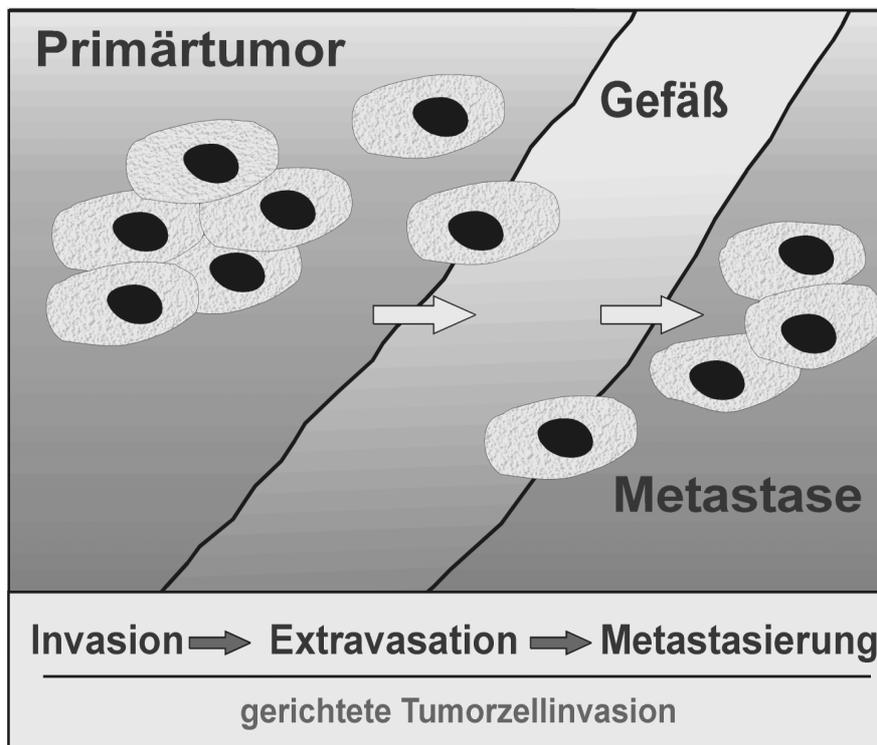


Abbildung 1: **Invasion und Metastasierung von Tumorzellen**

Bei der Behandlung von Tumor oder Metastase zeigt sich oft, daß der ehemals aus einer einzelnen Zelle entstandene Tumor unterschiedlich gut auf eine bestimmte Therapie, z.B. Chemotherapie oder Strahlentherapie, anspricht. Die Tumorzellen, die sich prinzipiell klonal vermehren, besitzen jedoch keine ausreichende genetische Stabilität. Auf diese Weise entwickelt sich ein oder mehrere Tumorzellnester mit unterschiedlichen biochemischen und immunologischen Eigenschaften und somit auch individuellen Resistenzen gegenüber Therapieformen.

Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist in den westlichen Industrieländern das häufigste Karzinom der Frau. Es stellt die dritthäufigste Krebsart überhaupt dar. Die Inzidenz des Mammakarzinoms hat in den vergangenen Jahren kontinuierlich zugenommen und liegt nach den Daten des Tumorzentrums München heute bei 100 von 100.000 Frauen (Sauer, 1998) .

Eine wesentliche Ursache für den Anstieg ist die Zunahme des Durchschnittsalters der Frauen, da die Inzidenz des Mammakarzinoms mit dem Alter steil ansteigt. Heute hat jede Frau ein Risiko von etwa 1:10 im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom zu erkranken (Sauer, 1998).

Die Ursache der Entstehung von Brustkrebs ist jedoch noch unklar. Man geht davon aus, daß bei etwa 5 % der erkrankten Frauen eine genetische Ursache mitverantwortlich ist. (Sauer, 1998). So steigt das Krebsrisiko von Menschen, bei denen eine Verwandte ersten Grades erkrankt ist auf das Dreifache an. In diesem Zusammenhang konnten genetische Veränderungen identifiziert und dem Mammakarzinom zugeordnet werden, wie z.B. die Amplifikation des HER2/neu Gens, die Mutation von E-cadherin und genetische Veränderungen in den Genen BRCA-1 und BRCA-2. Trägerinnen bestimmter Mutationen im BRCA1- oder BRCA2-Gen haben ein Risiko von 80-90% bis zum Alter von 75 Jahren an Brustkrebs zu erkranken (Wagener, 1999). Jedoch sind im Gegensatz zum Kolonkarzinom die genauen genetischen Zusammenhänge, die von den prämaligen Veränderungen zum metastasierenden Karzinom führen, noch unklar. So stellt die zunächst gutartige Vermehrung der Drüsenläppchen und des Bindegewebes in der Brust, die sogenannte proliferative Mastopathie, lediglich einen Risikofaktor für die Brustkrebsentstehung dar, da die Entwicklungsschritte zum Karzinom nicht bekannt sind. Weitere Risikofaktoren sind unter anderem eine fettreiche Ernährung, ionisierende Strahlen, Tabak- und Alkoholgenuß, sowie die langfristige Einnahme von Östrogenen. Die Einnahme der „Pille“ stellt wahrscheinlich kein erhöhtes Risiko dar.

Signaltransduktion

90 % aller eukaryontischen Gene werden auf Transkriptionsebene reguliert (Karin et al., 1992; Smith et al., 1997). Da die Transkription im Zellkern stattfindet, müssen zelluläre Signale von der Plasmamembran ins Zellinnere übertragen werden. Somit stellt die Signaltransduktion - so nennt man den Vorgang mit dessen Hilfe Signale von der Plasmamembran der Zelloberfläche zum Zellkern übermittelt werden - einen der

elementarsten Prozesse lebender Zellen dar. Auf diese Weise wird es der Zelle ermöglicht, auf veränderte Umweltbedingungen schnell und adäquat zu reagieren. Die verschiedenen Signaltransduktionswege imponieren als ein sehr kompliziertes und untereinander quervernetztes Kaskadensystem (Abb. 2). Die Signalübermittlung selbst erfolgt durch eine Vielzahl verschiedener Signalmoleküle wie Rezeptoren, G-Proteine, Transkriptionsfaktoren und "second-messenger"-Molekülen und durch bestimmte Enzyme wie Kinasen, Lipasen und Phosphatasen. In Abbildung 2 sind die bekannten Signaltransduktionswege im Überblick schematisch dargestellt und werden im Folgenden kurz erläutert.

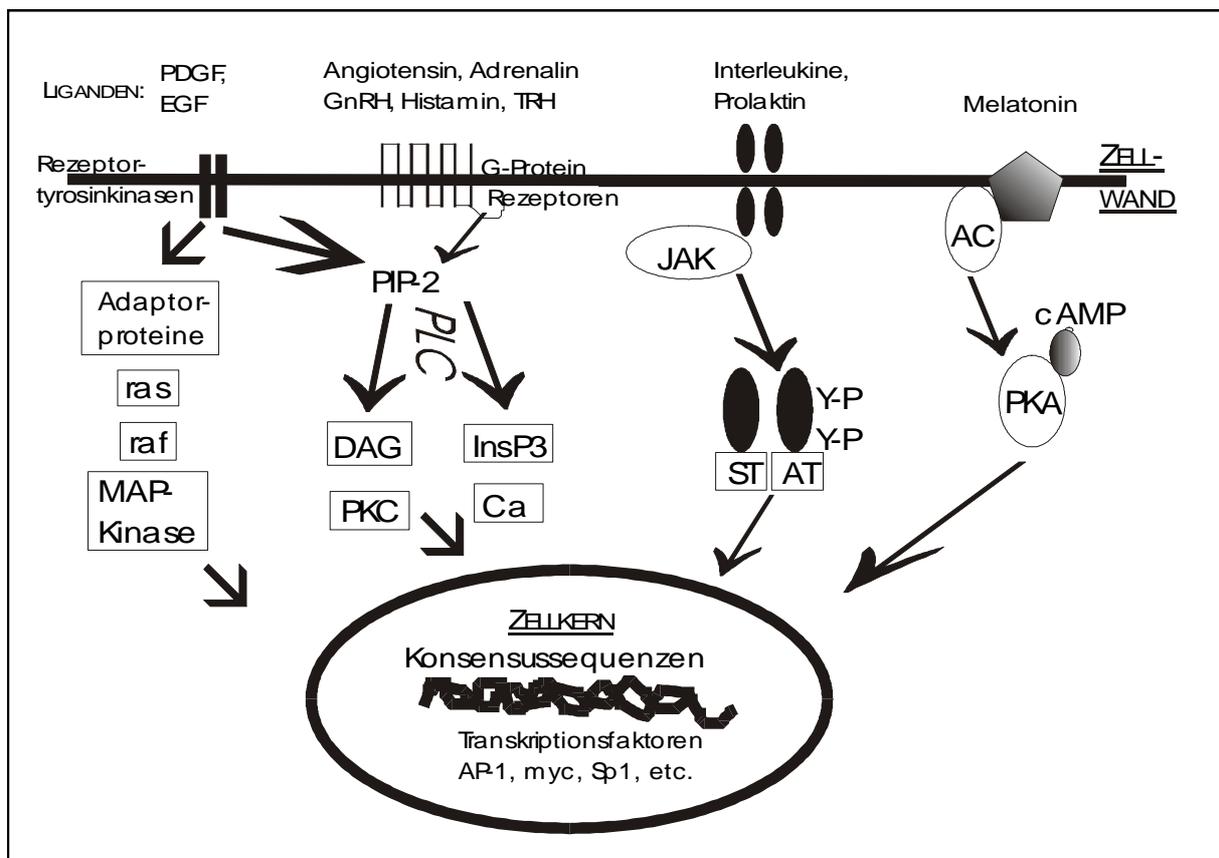


Abbildung 2: **Signaltransduktionswege im Überblick**

Die Weiterleitung von Zytokin-vermittelten Signalen an den Zellkern erfolgt hauptsächlich durch den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription) (Garcia et al., 1998). Zytokinrezeptoren der Zellmembran werden durch Interleukine oder andere Liganden stimuliert. Der intrazelluläre Teil des Rezeptors reagiert nun mit Proteinen der JAK-Familie, wodurch es zu einer Phosphorylierung der JAK-Proteine kommt. Die Mitglieder der STAT-Familie liegen als latente

zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren vor und binden an phosphorylierte JAKs. Dadurch kommt es ebenfalls zur Aktivierung und einer Homo- bzw. Heterodimerisierung mit anderen STATs. In Form von Dimeren erfolgt eine Translokation in den Zellkern und die Bindung an Konsensussequenzen im Promotor unterschiedlicher Gene, wodurch die Transkription reguliert werden kann.

Beim cAMP-vermittelten Signaltransduktionsweg handelt es sich um ein „second-messenger“-System. Nach Aktivierung der Adenylatzyklase an der Plasmamembran durch ein aktiviertes G-Protein steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Hierdurch kommt es zu einer Konformationsänderung der Proteinkinase A (PKA) wodurch die katalytische Domäne der PKA gespalten wird. Durch passive Diffusion gelangt diese in den Zellkern und aktiviert den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element binding protein), der an DNA-Strukturen bindet und auf diese Weise die Genexpression reguliert.

Eine Aktivierung von Phospholipasen und Phosphokinasen erfolgt, wenn Signale von Rezeptortyrosinkinasen und siebenspannigen G-Proteinrezeptoren (Gutkind et al., 1998) weitergeleitet werden. Es entstehen auch hier kleine sog. „second messenger“-Signal-moleküle. Als Komponenten der Plasmamembran aller eukaryontischen Zellen finden sich Phosphatidylinositol und phosphorylierte Derivate davon. Erfolgt eine hormonelle Stimulation einer Zelle z.B. durch Adrenalin, kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C, die Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphonat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-triphosphat (IP₃) spaltet. IP₃ setzt Kalzium frei, das wiederum viele Enzyme aktivieren kann. DAG aktiviert das Schlüsselenzym Proteinkinase C, das unter anderem den „mitogen activated protein kinase“ (MAPK) Signaltransduktionsweg aktivieren kann. Analog zu diesen „second-messenger“-vermittelten Signalwegen funktionieren die Effektorwege über die Phospholipase A₂, Phosphatidylinositol-3-Kinase und Phosphatidylinositol-4-Kinase.

MAPKinase-Signaltransduktionsweg

Der MAPK-Signaltransduktionsweg (Hunter et al., 1997; Vojtek et al., 1998) („Mitogen Aktiviert Protein Kinase“) übermittelt als ein zentrales Signalsystem der Zelle Informationen ins Zellinnere (Abb. 3). Bisher wurden nur wenige Untersuchungen an Patientenmaterial durchgeführt, die Aufschluß geben über die Rolle von MAPK im Tumorgewebe. Sivaraman et al. (Sivaraman et al., 1997) zeigten im Vergleich zu normalem Brustdrüsengewebe, daß in über 50% der untersuchten Mammakarzinomgewebe aufgrund einer konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionsweges eine deutlich höhere

MAPK-Aktivität nachweisbar ist. In einer anderen Arbeit von Brunet et al. (Brunet et al., 1996) wurde der Nachweis erbracht, daß eine erhöhte MAPK-Aktivität und –Expression maßgeblich zum invasiven Potential und zur Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen beitragen können.

Die Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionsweges wird durch Rezeptortyrosinkinasen, siebenspännige Rezeptoren und zytoplasmatische Onkogene (Della Rocca et al., 1997, Daub et al., 1996, Luttrell et al., 1994) vermittelt. Eine Kaskade aus verschiedenen Proteinkinasen, die wie Zahnräder ineinandergreifen, bildet die gemeinsame Endstrecke (Abb. 3). Die Aktivierung der jeweiligen MAPK erfolgt durch Phosphorylierung durch eine sog. MAPK-Kinase (MAPKK). Diese Kinasen werden ebenfalls durch Phosphorylierung durch eine sog. MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) aktiviert (Lewis et al., 1998).

Es lassen sich drei Unterfamilien unterscheiden; der Erk- (Derijard et al., 1995), Jnk- (Gupta et al., 1995) und der p38- (Han et al., 1994) MAPK-Signaltransduktionsweg (Abb. 3). Die Weiterleitung von mitogenen Signalen erfolgt durch Erk1 und Erk2 (Extracellular signal regulated kinases), während Jnk bei der Reaktion der Zelle auf Stress infolge von Hitze oder UV-Bestrahlung beteiligt ist. Zytokine oder osmotischer Stress aktivieren p38 (Abb. 3).

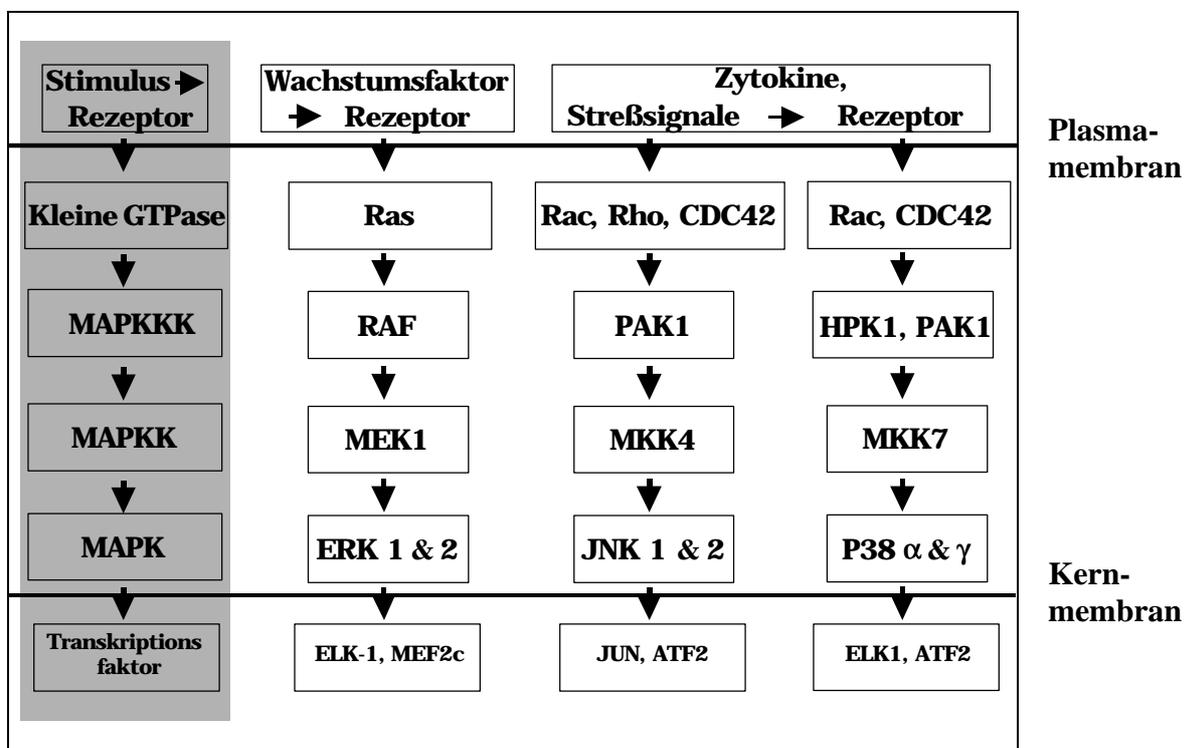


Abbildung 3: Das Kaskadensystem des MAPK-Signaltransduktionsweges

Aktiviert ein Wachstumsfaktor oder ein anderer Ligand eine membranständige RTK, kommt es zu einer Dimerisierung von zwei RTK und zu einer Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste.

Im Falle des Erk-MAPK Signaltransduktionsweges bindet ein Adapterprotein (z.B. Grb2, shc) an den aktivierten Rezeptor. Das Adapterprotein ist mit dem „exchange“-Protein Sos assoziiert, das GDP gegen GTP austauscht und auf diese Weise das G-Protein Ras aktiviert. Außerdem ist eine Aktivierung über den Komplex Shc/Grb2/Sos möglich. Die Serin/Threonin-Kinase c-Raf wird nun durch die Bildung eines bimolekularen Komplexes mit dem aktivierten Ha-Ras an die Plasmamembran verlagert. C-Raf gibt das Signal an MAPKK (MEK1) weiter, indem es MEK1 phosphoryliert, worauf das Signal an Erk1 oder Erk2 weitergegeben wird. Die Erk-MAPK aktivieren, nachdem sie in den Zellkern verlagert wurden, verschiedene Transkriptionsfaktoren der AP-1- und Ets-Familie, die an geeignete DNA-Bindungsstellen in Promotoren binden, wodurch Zielgene auf Transkriptionsebene reguliert werden.

Werden die Rezeptoren des JNK-Weges stimuliert, so läuft die Information über die GTPasen Rac, Rho oder Cdc42 (Coso et al., 1995). Sie werden in ihre aktivierte Form überführt und sind imstande, die Kinase PAK1 (p21 aktivierte Kinase) zu aktivieren. PAK1 phosphoryliert nun MKK4 (MAPKK), und diese gibt das Signal durch einen erneuten Phosphorylierungsschritt an JNK1 und JNK2 (MAPK) weiter. Es erfolgt nun die Signalübermittlung direkt in den Zellkern, wo mittels c-Jun oder ATF2 auf Transkriptionsebene Einfluß genommen werden kann.

Rac und Cdc42 sind ebenfalls an der Informationsübermittlung im p38-Signaltransduktionsweg beteiligt (Coso et al., 1995). Über PAK1 (MAPKKK), MKK7 (MAPKK) und P38 α und γ (MAPK) wird die Information bis in den Zellkern weitergeleitet und via ELK1 und ATF2 die Gentranskription reguliert.

Aus dem kaskadenartigen Aufbau des Systems resultiert schließlich eine Amplifikation oder Diversifizierung des Rezeptorsignals, und es bieten sich hierdurch vielfältige Möglichkeiten der Beeinflussung verschiedenster Vorgänge durch RTK in der Zelle.

Ras und Rho-GTPasen

Im MAPK-Weg spielt die Signalübermittlung in den Zellkern über eine GTPase der Ras-Superfamilie eine zentrale Rolle. H-Ras, K-Ras und N-Ras sind die drei GTPasen der Ras-Klasse. Sie sind an der inneren Plasmamembran lokalisiert und bestehen aus 188 bis 189

Aminosäuren. Die Ras-Superfamilie umfaßt mehr als 80 kleine GTPasen, die 20-25 kDa groß sind. Diese lassen sich in z. Zt. acht Unterklassen zusammenfassen (Abb. 4): Ras, Rab, Rho, Ran, Rheb, Rad/Gem, Rin/Rit und Arf (Campbell et al., 1998). Lediglich die Proteine der Ras- und Rho-Unterfamilie sind jedoch gut charakterisiert.

Die Mitglieder der Rho-Familie (Abb. 4) besitzen auf Aminosäureebene 30 % Homologie zu den Ras-Proteinen und gliedern sich in 14 Einzelproteine (Khosravi-Far et al., 1998) (Rac1, Rac2, Rac3, RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, Rho6, Rho7, RhoG, Cdc42, TC10 und TFF), die wiederum eine hohe Homologie von 50-90% untereinander aufweisen.

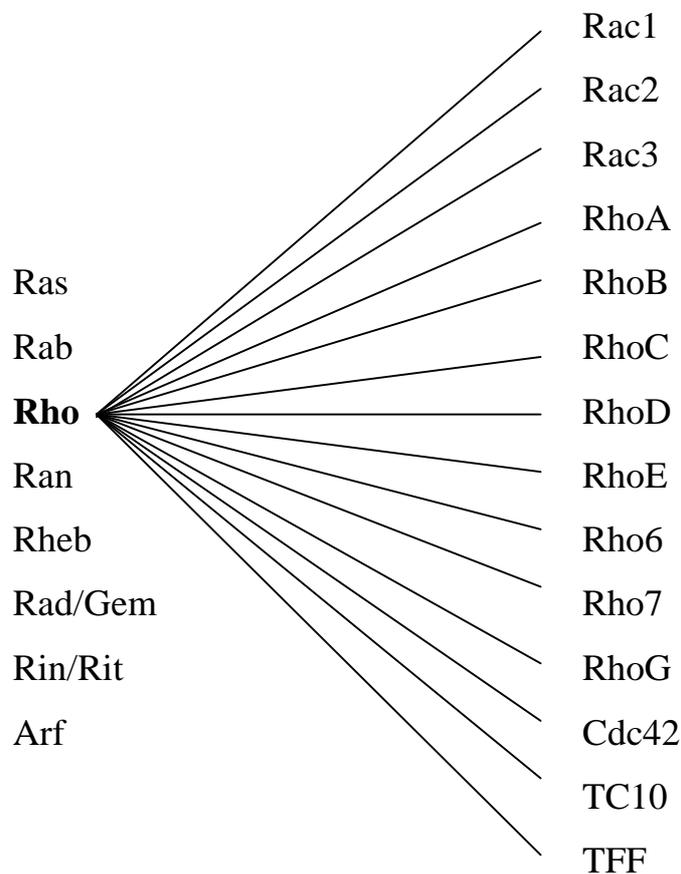


Abbildung 4: **Unterklassen der Ras-Superfamilie (links) mit Mitgliedern der Rho-Familie (rechts)**

Kleines G-Protein Rac1

Die GTPase Rac1 gehört neben Cdc42 und RhoA zu den am besten charakterisierten Rho-Proteinen. Entdeckt wurde Rac1 und Rac2 im Jahre 1989 von J. Didsbury et al. (Didsbury et al., 1989), dem es gelang, die entsprechenden cDNA Klone aus einer HL-60-Bibliothek zu isolieren. Hierbei handelt es sich um cDNA, die aus einer humanen Promyelozyten-Leukämie-Zelllinie aus dem peripheren Blut gewonnen wurde. Rac1 und Rac2 sind zu 92 % auf Aminosäureebene identisch und besitzen 58 % und 26-30 % Homologie zu menschlichem Rho und Ras. Während Rac1 ubiquitär exprimiert wird, findet sich Rac2 lediglich in Zellen des Knochenmarkes oder des lymphatischen Systems. In Zellen myeloischen Ursprungs ist die Expression von Rac2 gegenüber Rac1 um den Faktor 20 höher. Als wesentliche Eigenschaften fand man im Rahmen von Transfektionen heraus, daß Rac1 und Rac2 als Substrate für die ADP-Ribosylierung durch die C3-Komponente des Botulinumtoxins wirken (Hall et al., 1998). Vier der fünf aus Ras bekannten funktionellen Domänen für Bindung und Hydrolyse von Nukleotiden zeigen sich in den Rac-Proteinen ebenfalls. Die Untersuchungen bestätigten, daß es sich um membran-assoziierte GTP/GDP-regulierte Proteine handelt, die in der GTP-gebundenen Form katalytisch aktiv und in der GDP-gebundenen Form inaktiv sind (Abb. 5). Der Austausch von GDP durch GTP findet in der Switch-I Domäne statt, die bei allen Proteinen der Ras-Familie eine hohe Homologie aufweist. Die Regulation dieses Austauschs erfolgt durch drei unterschiedliche Klassen von Proteinen (Abb. 5). Sogenannte „Rho guanine exchange factors“ (GEF, z.B. Dbl, Vav, Sos) aktivieren das Protein und bewirken so den GDP/GTP-Austausch. Desweiteren kommen „Rho GDP dissociation inhibitory factors“ (RhoGDI) zum Einsatz, die die intrinsische GTPase Aktivität der Rho-GTPasen blockieren und den GTP/GDP-Austausch hemmen. Durch Stimulation der intrinsischen GTPase-Aktivität werden schließlich die Rho-GTPasen durch eine Vielzahl von Rho-GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) gehemmt und der Austausch von GTP durch GDP vollzogen. Die intrinsische GTPase Aktivität kann jedoch auch durch aktivierende Mutationen in den Rho-GTPasen vermindert und die GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse blockiert werden (Didsbury et al., 1989).

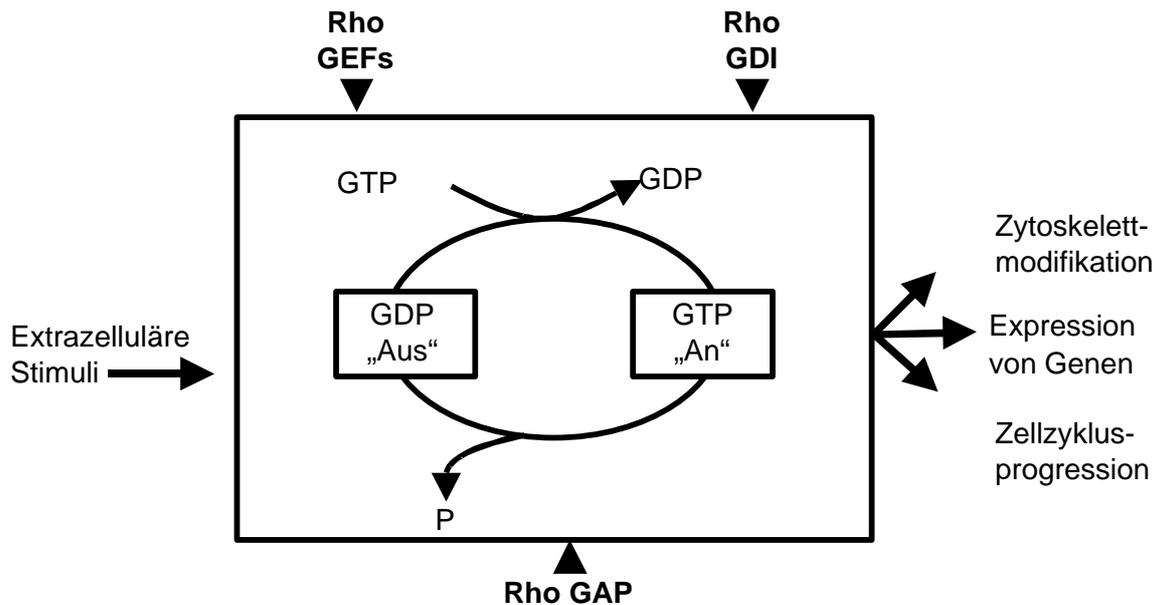


Abbildung 5: **Der Aktivierungszyklus der Rho GTPasen.** Sind Rho GTPasen GTP-gebunden, sind sie aktiv („GTP an“), liegen sie in einer GDP-gebundenen Form vor, so sind sie inaktiv („GDP aus“). GAP: „GTPase aktivierende Proteine“, RhoGDI: „Rho GDP dissociation inhibitory factor“, GEF: „Rho guanine nucleotide exchange factor“.

Hinsichtlich der Funktionseigenschaften zeigte sich, daß die GTPase Rac1 bei verschiedenen zellulären Vorgängen eine wichtige Rolle spielt. Rac1 bewirkt eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Hall et al., 1998) und gilt als Schlüssel-Regulator der Zellmotilität und Zelladhäsion (Knaus et al., 1998). Nach Stimulierung durch Wachstumsfaktoren induziert Rac die Ausbildung von Lamellopodien (Nobes et al., 1995) an der Plasmamembran und führt zu einem sog. „membrane ruffling“, einer Kräuselung der Zellmembran (Ridley, 1994; Ridley et al., 1992). Darüber hinaus besitzt das Rac-Protein, wie bereits erwähnt, Signaltransduktionsfunktion und ist somit an der Signalübermittlung von der Zelloberfläche zum Zellkern beteiligt. Rac stimuliert sowohl die Aktivität der c-Jun-MAPKinase (JNK), als auch der p38-MAPKinase. Desweiteren bewirkt Rac, wie Rho und Cdc42, bei Aktivierung eine Zellzyklusprogression in der G1-Phase und induziert die Synthese von DNA (Knaus et al., 1998). Im Unterschied zu anderen Mitgliedern der Rho-Familie, haben Rac-Proteine noch eine weitere biologische Funktion. Sie können die Aktivität des NADPH-Oxidase Enzym-Komplexes in phagozytierenden Zellen wie neutrophilen Granulozyten regulieren (Abo et al., 1991; Knaus et al., 1991). Das Superoxidanion (O_2^-), das

durch diesen Komplex in einer als „oxidative burst“ bezeichneten Reaktion erzeugt wird, spielt eine Schlüsselrolle bei den zellulären Abwehrmechanismen gegenüber Bakterien.

In Zellkulturexperimenten wurde bestätigt, daß Rho-GTPasen eine zentrale Rolle im Hinblick auf Zellproliferation und Differenzierung spielen. In Analogie zu einer bereits bekannten konstitutiv aktiven Ras-Mutante (Bos et al., 1989), wurde eine Form von Rac kloniert, der die GTPase-Funktion fehlt, das sog. Rac1 V12. Bei ruhenden Swiss 3T3 Fibroblasten führte die Expression von Rac1 V12 zu einer Initiierung der DNA-Synthese. Ebenso konnten Qui et. al. nachweisen, daß Rat1 Fibroblasten, die das konstitutiv aktive Rac1 V12 überexprimierten, alle Zeichen maligner Transformation aufwiesen (Qiu et al, 1995). Dies bedeutet, daß sie eine höhere Wachstumsrate bei gleichzeitigem Verlust der Kontaktinhibition aufwiesen. Im Nacktmausexperiment kam es zur Ausbildung von Tumoren. In Co-Transfektionen mit Ras und Rac1 zeigte sich eine Verstärkung des onkogenen transformierenden Potentials von Ras. Ebenso beobachtete man ein Wachstum der Zellen in Soft-Agar und eine gesteigerte Zellmotilität (Khosravi-Far, 1995). Im Gegensatz dazu zeigte sich, daß durch eine stabile Transfektion von Zellen mit dominant-negativem Rac1 (Rac1 N17), eine Ras-induzierte Focusbildung der Zellen verhindert wurde. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, daß Rac1 - zumindest in der Zellkultur - eine wichtige Rolle bei der Ras-Transformation spielt.

Unter Verwendung von konstitutiv aktiven Formen wurde das transformierende Potenzial von Rac1 in allen bekannten Studien jedoch nur *in vitro* an Fibroblasten-Zelllinien untersucht (Khosravi et al., 1995; Qiu et al., 1995, Anand-Apte et al., 1997, Keely et al., 1997). Während Zellkulturexperimente zwar geeignet sind, die Funktion und die Regulationsmechanismen von Rac1 zu untersuchen, so ist bisher ungeklärt, ob Rac1 ebenfalls *in vivo* eine maligne Transformation der Zellen bedingt. Es fehlt weiterhin der Nachweis, ob die zahlreichen Rac-Mutanten aus Zellkulturexperimenten, wie etwa das konstitutiv aktive Rac1 V12, überhaupt *in vivo* vorkommen. Bos et al. hingegen zeigten bereits im Jahre 1989, daß die in der Zellkultur entdeckten Mutationen von Ras auch *in vivo* vorkommen und zu einer malignen Transformation führen (Bos et al., 1989). Die konstitutiv-aktive Ha-Ras Mutation (Val 12 Ha-Ras) wurde zunächst in der Zellkultur identifiziert und anschließend in vielen humanen Tumoren wie dem Bronchial-, Blasen- und dem Mammakarzinom nachgewiesen (Lowy et al., 1993). Nach Sivaraman et al. (Sivaraman et al., 1997) ist im Mammakarzinom die Expression der MAPK 10 bis 20 mal höher und die Aktivität der MAPK 5 bis 10 mal höher als im benignen Mammagewebe. H-Ras als ein möglicher Stimulus ist jedoch nur in 8% aller Mammakarzinome mutiert (Bos et al., 1989). Es stellte sich deshalb

für die folgende Studie die Frage, ob Rac1 als ein möglicher MAPK-Aktivator für die erhöhte Aktivität der MAPK im Mammakarzinom verantwortlich ist, ob Rac1 in mutierter Form im Karzinomgewebe vorhanden ist und auf welcher molekularen Ebene die Regulation von Rac1 stattfindet.

Fragestellung

Der MAPK-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Mammakarzinomen, die nicht alleine durch Mutationen im Ha-Ras Gen erklärt werden können, da Ha-Ras nur in 8 % aller Mammakarzinome mutiert ist. Deshalb wurde im Rahmen dieser Studie in benignen und malignen Mammageweben untersucht, ob andere GTPasen, wie z. B. Rac1 im Mammakarzinom, mutiert oder überexprimiert sind. Unter der Erwartung einer Rac1-Mutation wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Ist Rac1 im benignen oder malignen Mammagewebe mutiert?
2. Welcher Zelltyp exprimiert Rac1?
3. Ist Rac1-Protein, Rac1-DNA oder Rac1-RNA im benignen oder malignen Mammagewebe überexprimiert?
4. Korreliert die Expression mit dem Überleben?
5. Nach Identifikation einer neuen Rac1-Isoform, Rac1b: Stellt diese Isoform eine funktionale GTPase dar ?
6. Wie können die Erkenntnisse über die Funktion von Rac1 in der Zellkultur mit denen in der *in vivo* – Situation, also im nativen Tumorgewebe, in ein Konzept integriert werden: Was ist die Funktion von Rac1 im Tumor ?

Material und Methoden

Material

Firmen und Reagenzien

- Amersham Pharmacia Biotech, Bedford, USA: ECL-Reagenz (Nr. RPN 2106),
- Amicon Millipore Corp., Bedford, USA: Centricon-10 Filter (Nr. 4206)
- Boehringer Mannheim, Penzberg: Klenow Enzym (Nr. 85116621), Protein-A-Agarose (Nr. 85008821), Proteinase K (Nr. 1373196), Restriktionsenzyme mit Puffern, Random Primer p(dN)₆ (Nr. 1034731), positiv geladene Nylon Membran (Nr. 1209299)
- Calbiochem Novabiochem, Bad Soden: humanes Thrombin
- Dianova, Deutschland: Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper, Peroxidase-gekoppelt # 354-93
- Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA: Bacto Yeast Extract, Tryptone Peptone, Bacto Agar
- Gibco BRL Life Technology, Karlsruhe: Bench Mark Molekulargewichtsmarker (Nr. 10748-010), DNase-I (Nr. 18068-015), Kompetente Zellen DH 5α (Nr. 18265-017), pBL-21, RNase-Inhibitor (Nr. 15518-012), Superscript-II RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Nr. 18064-014), TRIzol Reagenz (Nr. 15596-026)
- ICN Biomedicals, Aurora, USA: [$\alpha^{32}\text{P}$] dGTP, [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP, [$\gamma^{32}\text{P}$] GTP, [$\gamma^{35}\text{S}$] GTP, SDS
- Kodak, Rochester, USA: X-OMAT AR Filme
- Merck, Darmstadt: Bromphenolblau, Chloroform, Coomassie blue R250 (Nr. 1.12553), DMSO, Ethanol absolut z. A., Gelatine (Nr. 1.04070), Isopropanol
- Pharmacia, Schweden: Oligonukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Glutathion Sepharose beads (Nr. 17-0756-01)
- Pierce, Rockford, USA: BCA Protein Reagent Kit (Nr. 23223/23224)
- Qiagen, Hilden: Qiagen Plasmid Mini Kit
- Roth, Karlsruhe: Glycerin, Methanol, Polyacrylamid, Tris-HCl, Triton X-100
- Santa Cruz, Santa Cruz, USA: Antikörper gegen Erk1 (C16, SC-093), Antikörper gegen Jnk1 (SC-474)
- Schleicher & Schüll, Dassel: Nitrozellulose Optitran[®] BA-S85 0,45 μm (Nr. 439194), Nitrozellulose Protran[®] BA85 0,45 μm , \varnothing 25 mm (Nr. 20330)

- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim: p-Aminobenzamidin (A-7155), Ampicillin, Aprotinin, ATP, Borsäure, Dithiothreitol, EDTA, Ethidiumbromid, Formaldehyd, Glycin, Kaliumazetat, Kalziumchlorid Dihydrat, β -Mercaptoethanol, MBP, Nu-Sieve-Agarose, PMSF, Proteinase RNase, RNase freies Wasser, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumorthovanadat, X-Gal
- Spectrum Medical Industries, Los Angeles, USA: Dialyseschlauch Spectra/Por MWCO: 8,000 (Nr. 132115)
- UBI, Lake Placid, USA: monoklonaler Maus-Antikörper gegen Rac (Nr. 05-389)
- Whatman, Maidstone, England: Whatman 3MM Filterpapier

Zellkultur

- Gibco BRL Life Technology, Karlsruhe: Fötale Kälberserum (Nr. 10270-106), HEPES, DMEM mit Glutamax, PBS
- Falcon/Becton Dickinson, Plymouth, England: Gewebekulturplatten \varnothing 10 cm; Gewebekulturflaschen T75
- Seromed Biochrom KG, Berlin: BSA, EDTA (1%); Penicillin/Streptomycin, Trypsin (2,5%)

Vektoren und Primer

- Invitrogen, Carlsbad, USA: pCR-2.1-TOPO (Nr. K4500-01)
- MWG, Ebersberg: sämtliche Oligonukleotidprimer (siehe S. 32)
- Amersham-Pharmacia Biotech, Schweden: Vektoren pGEX-2T (27-4801-01), pGEX-4T3 (27-4583-01)

Auswertung

Die Western Blots, Southern Blots und Northern Blots wurden mit Hilfe eines Epson 9500-GT Scanner eingescannt und mit Hilfe der San Pack 3 Software (Biometra, Göttingen) ausgewertet. Eine Quantifizierung von gebundenem radioaktiven Material erfolgte mit Hilfe eines Phosphor Imager 445SI von Molecular Dynamics (Sunnyvale, USA).

Zelllinien

Die verwendeten Mammakarzinomzelllinien MCF-7, MCF-7-LCC-1 und MCF-7-LCC-2 wurden von Prof. Dr. N. Brüner (Finsen Laboratory, Kopenhagen, Dänemark), (Thompson et al., 1992) MDA-231, MDA-435, MDA-453 und ZR-75 von Prof. Dr. G. Gallick (MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA), die IDZ-Zelllinie von Prof. Dr. Bültmann (Institut für Pathologie, Universität Tübingen) die Caco-2 Zelllinie (Bacher et al., 1992) von PD Dr. C. Prinz (II. Medizinische Klinik, Technische Universität München), und die HeLa-Zelllinie von Frau Prof. Dr. U. Knaus (The Scripps Research Institute, La Jolla, Kalifornien, USA) zur Verfügung gestellt.

Medien und Lösungen

Komplettmedium:	DMEM mit Glutamax 10 mM HEPES 272 mM Asparagin 550 mM Arginin 2 U/ml Penicillin-Streptomycin 10 % fötales Kälberserum
Serumfreies Medium:	DMEM mit Glutamax 10 mM HEPES 272 mM Asparagin 550 mM Arginin
Einfriermedium:	20 % fötales Kälberserum 5 % DMSO
Trypsin/EDTA-Lösung	0,125 % Trypsin 0,02 % EDTA
PBS	7,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl; pH 7,2

Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Jeden zweiten oder dritten Tag wurden die Zellen nach folgendem Schema passagiert. Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden für 3-5 min 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und die abgelösten Zellen in Komplettmedium resuspendiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 1600 rpm

wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml frischem Komplettmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Verteilung der Zellen auf neue Gewebekulturflaschen oder -platten mit frischem Komplettmedium. Mit Hilfe einer Neubauerzählkammer wurden die Zellen vor der erneuten Aussaat quantifiziert.

Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei 80-90 % Konfluenz nach dem obigen Schema abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in einem Kryoröhrchen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Isopropanolbad eingefroren. Nach 6 h erfolgte die anschließende Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff.

Beim Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und kurzzeitig bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Die aufgetauten Zellen wurden in ein Röhrchen mit 10 ml Komplettserum überführt und bei 1600 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Komplettmedium resuspendiert und in einer Gewebekulturschale ausgesät.

Patientinnenkollektiv

In der retrospektiven Studie wurde Mammagewebe von 37 Patientinnen verwendet:

- 5 Patientinnen im Alter von 21-32 Jahren, die sich einer Mammareduktion aus kosmetischen Gründen unterzogen haben (durchgeführt durch die Abteilung für Plastische Chirurgie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München, Tabelle 1A, S. 61)
- 2 Patientinnen im Alter von 30 und 46 Jahren, die an einem Fibroadenom in der Frauenklinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München operiert wurden (Tabelle 1A, S. 61)
- 10 Patientinnen mit duktalem Mammakarzinom in situ (van Nuys Score 1-3), 40-74 Jahre, die in der Frauenklinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München operiert wurden (Tabelle 2A, S. 62)
- 20 Patientinnen im Alter von 33-79 Jahren mit nodal-positivem Mammakarzinom, die in der Frauenklinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München operiert und adjuvant chemotherapiert wurden (Tabelle 1A, S. 61 und 2B, S. 62)

Von 10 dieser Patientinnen wurde je ein im Rahmen der durchgeführten Axilladisektion entfernter, von Tumorzellen befallener axillärer Lymphknoten im Rahmen der Studie mituntersucht.

Die Patientinnen mit Mammakarzinom wurden als Erstbehandlung einer weiten Exzision der Mamma mit axillärer Lymphonodektomie oder einer modifiziert radikalen Mastektomie unterzogen. Bei brusterhaltendem OP-Verfahren erfolgte innerhalb von sechs Wochen nach der Operation eine lokale Strahlentherapie mit 50 Gray. Zum Zeitpunkt der Operation waren bei keiner Patientin Fernmetastasen klinisch, radiologisch oder laborchemisch nachweisbar. Der Verlauf der Erkrankung wurde bei allen Patientinnen im Rahmen von Tumornachsorgeuntersuchungen kontrolliert. Diese erfolgten in den ersten beiden Jahren im Abstand von drei Monaten, im folgenden Jahr alle 6 Monate. Während einer medianen Nachbeobachtungszeit von 60 Monaten (15-121 Monate) erlitten aus dem primären Teilkollektiv, das 10 Patientinnen umfaßte, fünf Patientinnen ein Rezidiv des Primärtumors während fünf Patientinnen rezidivfrei blieben.

Für die durchgeführten Western-, Northern- und Southern-Blots und die Rac1-Mutationsanalyse wurde ein reduziertes Kollektiv von 5 normalen Mammageweben, 2 Fibroadenomen und 10 invasiven Mammakarzinomen verwendet. (Tabelle 1A, S. 61).

Methoden

Western Blot

Der Western Blot dient der Detektion von Proteinen, die nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht aufgetrennt wurden. Die Auftrennung erfolgt in einer SDS/PAGE (Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese). Die Proteine werden auf eine Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S85 0,45 µm; Schleicher & Schüll) überführt, dort fixiert und durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es kamen folgende Antikörper zum Einsatz:

- 1) Anti-Rac-Antikörper (monoklonaler Maus-Antikörper; 1:3000) (UBI, Lake Placid, NY) #05-389
- 2) Anti-Rac-Antikörper (polyklonaler Kaninchen-Antikörper; 1:2000) (von Prof. U. Knaus, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) (Quinn et al., 1993)
- 3) Peroxidasegekoppelter goat-anti-mouse Zweitantikörper (1: 2000) (Dianova, Deutschland) # 354-93

Puffer und Lösungen:

Lämmli-Puffer reduzierend (3x)	62,5 % Tris-HCl; pH 6,8 6 % (w/v) SDS 10 % Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 5 % β-Mercaptoethanol
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20 % Methanol
NET-Puffer (10x)	1,5 M NaCl 0,05 M EDTA 0,5 M Tris-HCl 0,5 % Triton X-100
NET-Gelatine-Puffer (1x)	100 ml 10x NET 0,25 % (w/v) Gelatine (entspricht 2,5g) ad 1 Liter H ₂ O _{bidest}

Durchführung:

Der Proteingehalt der Gewebslysate wurde mittels des BCA-Proteinassays (Pierce, Rockford, IL) bestimmt. Dieser Test basiert auf der reduzierenden Wirkung der Proteine auf Cu^{2+} -Ionen (Lowry et al., 1951) und der anschließenden Bildung eines purpurfarbenen Bicinchonininsäure (BCA)- Cu^{+} -Komplexes, dessen Extinktion bei 572 nm gemessen wird. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit bovinem Serumalbumin (Pierce) erzeugten Standardkurve ermittelt. Die jeweiligen Proben wurden auf gleichen Proteingehalt normalisiert (100mg bzw. 300mg) und unter reduzierenden Bedingungen nach Zugabe von Lämmli-Puffer und Denaturierung der Proteinprobe für 3 Minuten bei 95°C in einer 12,5 % SDS/PAGE aufgetrennt.

In einer sog. „Wet-Blot“-Apparatur (Firma Biorad, München) wurden die aufgetrennten Proteine in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Neben der Membran benötigt man außerdem noch vier Whatman Filterpapiere, die mit Transferpuffer getränkt werden. Das Gel wird auf zwei feuchte Filterpapiere gelegt. Es folgt ein mit Transferpuffer getränktes Stück Nitrozellulose, das nur minimal größer ist als das Gel und luftblasenfrei aufliegen muß. Zum Abschluß wurde das Ganze noch einmal mit zwei Filterpapieren bedeckt und in die aufklappbare Transfertasche der Apparatur zwischen zwei saugfähigen, getränkten Schwämmen eingeklemmt. Die Transfertasche wird so in die Transferkammer eingesetzt, daß die Nitrozellulosemembran in Richtung Anode ausgerichtet ist. Der Proteintransfer erfolgte über Nacht bei 30 V und 4°C.

Die Nitrozellulosemembran wurde nach der Entnahme aus der Apparatur in NET-Gelatine-Puffer gelegt und dreimal für 20 min geblockt. Anschließend wurde der Primärantikörper in NET-Gelatine-Puffer verdünnt und die Membran für ca. 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Membran zweimal 15 min mit NET-Gelatine-Puffer bei RT gewaschen. Der peroxidasegekoppelte Zweitantikörper wurde ebenfalls in NET-Gelatine-Puffer verdünnt und die Membran für ebenfalls 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Proteine, die durch den Erstantikörper detektiert werden konnten, wurden mit ECL-Reagenz nach Protokoll des Herstellers sichtbar gemacht. Dies erfolgt durch einen sog. Chemilumineszenz-Effekt durch chemische Interaktion der Peroxidase, die an den Sekundärantikörper gebunden ist, mit der ECL-Reagenz. Das Ausmaß der Lichtreaktion ist direkt proportional zur Menge des an die Membran gebundenen Primärantikörpers.

DNA-Extraktion aus Gewebe

Der Aufschluß des Gewebes erfolgte mit Hilfe des Enzyms Proteinase K (PK). Proteine im Gewebe wurden hierdurch zersetzt, ohne die in den Zellkernen enthaltene DNA zu zerstören. Anschließend kam eine klassische Phenol/Chloroform-Extraktion zur Anwendung, bei der die extrahierte DNA anschließend mit Ethanol zur Ausfällung gebracht wurde.

Puffer und Lösungen:

Verdau-Puffer	100 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 1 % SDS pH 8,5
Natrium-Azetat	3 M, pH 5,5
Proteinase K	> 0,6 U/µl

Durchführung:

Die DNA-Extraktion erfolgte jeweils aus einem ca. 0,5 g schweren frischen Gewebestück, das mit einem sterilen Skalpell auf einem Glasobjektträger fein zerkleinert und abgewogen wurde. Der Verdau des Gewebes erfolgte in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 140 µl Verdau-Puffer nach Zugabe von 7,5 µl Proteinase K (Boehringer Mannheim). Es folgte eine Inkubation über Nacht in einem 55 °C warmen, rotierenden Thermoblock. Am nächsten Morgen wurden erneut 7,5 µl Proteinase K zugegeben, der Ansatz gründlich vermischt und nochmals für 4-5 h unter den genannten Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Proben 3 min bei 3000 rpm bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 150 µl Phenol und 150 µl Chloroform-/Isoamylalkoholgemisch (24:1) wurden die Reaktionsgefäße 1 min heftig geschüttelt und dann 10 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert. Die obere Phase, die die DNA enthielt, wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Arbeitsschritte ab der Zugabe von Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol wiederholt. Nachdem die obere Phase wieder abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt worden war, wurde in einer weiteren Wiederholung der Schritte das Phenol weggelassen und nun ausschließlich 150 µl Chloroform-/Isoamylalkoholgemisch zugegeben, um alle Reste von Phenol zu entfernen. Hierauf wurde die enthaltene DNA durch Zugabe von 400 µl kaltem Ethanol (100 %) sowie 16 µl Natriumazetat gefällt und das Reaktionsgefäß über Nacht bei -70 °C inkubiert. Am

nächsten Morgen wurde die Probe 30 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Zum Niederschlag wurde 1 ml Ethanol (70 %) gegeben und gut vermischt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und die o. g. Prozedur noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Niederschlag nach Entfernen des Ethanols erst im Reaktionsgefäß bei RT getrocknet und anschließend die DNA in 50 - 100 µl Aqua bidest. resuspendiert und in neue Reaktionsgefäße überführt.

RNA-Extraktion aus Gewebe

Zur Gewinnung von RNA aus Gewebe stehen mehrere kommerzielle Systeme und Kits zur Verfügung, die alle auf dem ursprünglichen Protokoll von Chomczynski, P. und Sacchi, N. (Chomczynski et al., 1987) unter Verwendung von hochmolarem Guanidinium basieren. Chomczynski wertete in einer veröffentlichten Stellungnahme die kommerziellen Protokolle als gleichwertig zum Originalprotokoll (Chomczynski et al., 1995).

Die Vorzüge des verwendeten Produktes TRIzol liegen in der Einfachheit der Anwendung, der schnellen Durchführbarkeit und der Möglichkeit, aus dem gleichen Ansatz RNA, DNA und Protein zu isolieren (Chomczynski et al., 1995).

Material: - Keramik-Mörser Ø 10 cm und Keramik-Pistill

Puffer und Lösungen:

- TRIzol[®] Reagenz
- Chloroform 100%
- Isopropanol 100%
- 75 % Ethanol
- RNase-freies Aqua bidest.

Durchführung:

Von dem in flüssigem Stickstoff gelagerten Gewebe wurden ca. 100 mg in einem ebenfalls mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Keramikmörser mit einem Keramikpistill zu einem feinen Puder zerrieben. Aus 1 mg Gewebe konnte zwischen 1 und 10 µg Gesamt-RNA extrahiert werden. Dies ist abhängig von der Art und Qualität des Gewebes. Während das Gewebe zerrieben wurde, wurde der Mörser immer wieder mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Nach Zugabe von 1 ml TRIzol[®]-Reagenz, das ebenfalls im Mörser sofort gefror, wurde nun mit dem Pistill ein homogenes Gemisch mit dem zu einem feinen Puder zerriebenem Gewebe hergestellt. Das Gemisch ließ man nun im Mörser ca. 30 min auftauen, da die Bestandteile der TRIzol[®]-Reagenz die Degradation der RNA bei Raumtemperatur verhinderten. Die

vollständig aufgetaute visköse Flüssigkeit wurde in ein RNase-freies 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Dissoziation der Kernproteinkomplexe zu erreichen. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Gemisch ca. 15 sec heftig geschüttelt und wieder für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es bildeten sich 2 Phasen aus, nachdem das Reaktionsgefäß für 15 min bei 12.000 x g und +4 °C zentrifugiert wurde. Die wässrige obere Phase enthielt die RNA und wurde in ein frisches 1.5 ml RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. In der organischen unteren Phase sammelten sich DNA und höhermolekulare Proteine. Die Präzipitation der RNA wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und vorsichtiges Mischen mit der wässrigen Phase erreicht. Anschließend wurde die Probe 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die enthaltene RNA für weitere 10 min bei 12.000 g und +4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das geleeartige RNA-Pellet durch starkes Schütteln ("Vortexen") mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Nach nochmaligem Abzentrifugieren des Pellets bei 7.500 x g für 5 min bei +4 °C wurde der Überstand wieder abgenommen und das RNA-Pellet im Reaktionsgefäß bei RT ca. 15 min getrocknet. Die RNA wurde in 30-100 µl RNase-freiem Wasser aufgelöst, im Photometer deren Konzentration (siehe Formel S. 45) und Reinheit spektralphotometrisch überprüft und anschließend in Aliquots bei -80 °C gelagert. Die RNA gilt als „rein“, wenn der Quotient aus den Absorptionswerten der RNA bei den Wellenlängen 260nm und 280nm zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

DNase-I-Verdau

Um sicherzustellen, daß die mit TRIzol[®]-Reagenz extrahierte RNA keine Spuren von DNA mehr enthält, wurde die RNA einer Behandlung mit DNase-I unterzogen, damit das Risiko falsch-positiver Ergebnisse in der anschließenden PCR reduziert wurde, falls beide Primer innerhalb eines Exons liegen.

Gerät: - Perkin Elmer PCR-Cycler 2400

Puffer und Lösungen:

- RNase-Inhibitor, 10 U/µl
- DNase-I, RNase-frei, 100 U/µl
- 10x DNase Puffer: 200mM Tris-HCl (pH 8.4),
20 mM MgCl₂, 500 mM KCl
- EDTA, 25mM
- RNase-freies Aqua bidest.
- Random primer p(dN)₆; 50A_{260nm} in 200 µl Aqua bidest

Durchführung:

Der DNase-I Verdau wurde in einem 200 µl PCR-Reaktionsgefäß angesetzt, um direkt mit dem folgenden Schritt der Reversen Transkription im selben Gefäß fortfahren zu können.

x	µl	RNA (ca. 1µg)
(6-x)	µl	RNase-freies Aqua bidest.
1	µl	RNase-Inhibitor
1	µl	DNase-I
1	µl	10x DNase-Puffer
gesamt	9	µl

Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der DNase-I Verdau wurde durch Zugabe von 1 µl EDTA gestoppt, die DNase-I durch Erhitzen für 10 min auf 70 °C denaturiert. Da bei einer Temperatur von 70 °C alle Primer als Einzelstränge vorliegen, wurde 1 µl random Primer für die im Anschluß erfolgende Reverse Transkription zugegeben. Dann wurde der Ansatz kurz auf Eis aufbewahrt.

RT-PCR

Zur Erstellung von cDNA aus mRNA stehen unterschiedliche Enzymvarianten der sogenannten Reversen Transkriptasen zur Verfügung. Die Reverse Transkriptase Superscript-II-RT H^r weist eine Punktmutation in der RNase H-Domäne (H) auf, wodurch eine sehr effiziente cDNA-Synthese ermöglicht wird. Im Gegensatz zu vergleichbaren Enzymen wird hier nämlich die mRNA nach der initialen RNA-abhängigen DNA-Synthese nicht hydrolysiert und dient weiter als Matrize für die Synthese neuer cDNA.

Gerät: - Perkin Elmer PCR-Cycler 2400

Puffer und Lösungen:

- Superscript-II RNase H^r RT, 200 U/µl
- 5x Synthese Puffer: 250 mM Tris-Cl, pH 8.3,
375 mM KCl, 15 mM MgCl₂
- DTT 0.1 M
- dNTP-mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 10 mM)
- Mineral-Öl (für PCR)

Durchführung:

Der unter DNase-I-Verdau beschriebene Reaktionsansatz von 11 µl Gesamtvolumen in einem 200 µl PCR-Gefäß wurde nun weiterverwendet. Zusätzlich kamen hinzu: 4 µl 5x Synthese Puffer, 2 µl DTT, 1 µl dNTP-Mix und 1 µl Reverse Transkriptase. Dies wurde vorsichtig vermischt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um eine Kondensation an der Wand des Reaktionsgefäßes zu vermeiden und gleichzeitig als Schutz gegen DNA-Kontamination zu wirken. Der Synthesevorgang erfolgte im PCR-Cycler in folgenden Schritten: 1) 10 min, 25 °C; 2) 10 sec, 30 °C; 3) 10 sec 35 °C; 4) 50 min, 42 °C. Nach erfolgter Abkühlung auf 4 °C konnte die cDNA entweder eingefroren oder in eine anschließende PCR mit genspezifischen Primern eingesetzt werden.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde Mitte der achtziger Jahre von Mullis (Mullis et al., 1987) entwickelt. Bei der PCR nutzt man die Eigenschaften der DNA-Replikation und ermöglicht hierdurch die Herstellung einer sehr großen Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz. Man verwendet eine DNA-Polymerase, die eine Einzelstrang-DNA als Matrize für die Erstellung eines komplementären Strangs benützt. Durch Zugabe eines Oligonukleotidpaares, den sog. Primern (siehe S. 32), die sich an die Einzelstrang-DNA anlagern, wird der DNA-Polymerase ein Startpunkt für die DNA-abhängige DNA-Synthese gegeben.

Im ersten Schritt wird das Reaktionsgemisch auf 94°C erhitzt, so dass es zur vollständigen Trennung der DNA-Doppelstränge kommt (Denaturierung). Je nach dem Schmelzpunkt der verwendeten Oligonukleotid-Primer wird die Temperatur abgesenkt, um eine optimale Anlagerung an die komplementären DNA-Abschnitte zu ermöglichen (Annealing). Die Annealingtemperatur bestimmt entscheidend über die Spezifität einer PCR. Im nächsten Schritt erhöht man die Temperatur auf 72 °C (Elongation); bei dieser Temperatur arbeitet die hitzestabile Taq-Polymerase (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) optimal. Am Ende eines Zyklus beginnt man wieder mit dem Schritt der Denaturierung und der soeben synthetisierte Doppelstrang teilt sich und fungiert als Matrize für den nächsten Syntheseyklus. Der gesamte Zyklus wird ca. 25-35 mal wiederholt. Hierdurch steigt die Anzahl identischer DNA-Kopien exponentiell.

Gerät:

- Perkin Elmer PCR-Cycler 2400

Puffer und Lösungen:

- dNTP -Mix; je 2,5 mM (dATP; dCTP; dGTP; dTTP)
- Expand High Fidelity PCR-Polymerase (3,5 U/μl)
- 10 x Polymerase Puffer mit 15 mM MgCl₂
- 25 mM MgCl₂
- 5'-Primer für Rac1 (10 pmol/μl):
ATG CAG GCC ATC AAG TGT GTG GTG
- 3'-Primer für Rac1 (10 pmol/μl):
TTA CAA CAG CAG GCA TTT TCT CTT CC

Durchführung:

In die PCR-Reaktion wurde sowohl die in einer Reversen Transkription hergestellte cDNA, als auch direkt aus Gewebe extrahierte genomische DNA verwendet. Je nach Gewebe wurde zwischen 0,5 und 1,0 μg cDNA bzw. genomische DNA eingesetzt. In einem Reaktionsvolumen von 100 μl befanden sich folgende Reagenzien in den angegebenen Endkonzentrationen: 200 μM dNTP-Mix; 2 mM MgCl₂; 300 nM 3'-Primer; 300 nM 5'-Primer; 2,6 U PCR-Polymerase

Pipettierschema:

x	μl	cDNA/DNA (0,5-1,0 μg)
8	μl	dNTP-Mix
3	μl	5'-Primer
3	μl	3'-Primer
2	μl	MgCl ₂
10	μl	10 x PCR-Puffer
0,75	μl	PCR-Polymerase
<hr/>		
ad 100	μl	Aqua bidest.

Die Amplifikation der DNA fand im Thermocycler unter den folgenden Bedingungen statt:

1 Zyklus	94 °C	2 min
<hr/>		
30 Zyklen	94 °C	30 sec
	55 °C	30 sec
	72 °C	30 sec
<hr/>		
1 Zyklus	72 °C	7 min

Das fertige PCR-Produkt wurde bei +4 °C gelagert.

Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, genomische DNA, cDNA oder Plasmid-DNA der Größe nach aufzutrennen. Polymerisierte Agarose bildet ein gleichmäßiges Maschennetz aus, durch das die DNA in Richtung Anode bis zu dem Punkt wandert, an dem es ihrer spezifischen Größe entspricht.

Puffer und Lösungen:

50 x TAE-Puffer (lichtgeschützt lagern)	0,2 M EDTA 2 M Essigsäure (H ₃ C-COOH) 4 M Tris-HCl; pH 8,2 vor Gebrauch mit Aqua bidest auf einfache Konzentration (1x) einstellen
Ladepuffer	0,133 M EDTA; pH 8,0 4,0 g Saccharose 15 mg Bromphenolblau ad 7,5 ml Aqua bidest.
Ethidiumbromid	10 µg/ml in Aqua bidest.
Gelkammer	50 ml Gelvolumen; Fa. Pharmacia, Schweden

Durchführung:

Je nach Fragmentgröße wurden 0,5 – 1,0 g Agarose in 50 ml 1x TAE-Puffer aufgeschmolzen und Ethidiumbromid zugeben, um 1- bis 2-prozentige Gele zu erhalten. Wollte man in einem präparativen Gel eine besonders genaue Trennung der DNA-Banden in große und kleine Fragmente erreichen, so wurden Gele bis zu 4 % (w/v) aus einer speziellen Agarose mit einem niedrigen Schmelzpunkt (Nu-Sieve Agarose) verwendet. Dies ermöglichte die anschließende Elution der DNA aus dem Gel.

Nach dem Erhitzen läßt man die Agarose abkühlen und gießt sie lauwarm in die Gelkammer. Anschließend wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und die Kammer so mit TAE-Puffer aufgefüllt, daß das Gel und die Geltaschen bedeckt sind. Die Proben wurden nun mit Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Es wurde darauf geachtet, daß bei allen Proben ungefähr das gleiche Verhältnis von Probe zu Auftragspuffer vorliegt. Im Idealfall sollte sich ein Verhältnis von 4:1 (v/v) ergeben. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Das im Gel eingebundene Ethidiumbromid wurde mittels UV-Anregung bei 302 nm zum Leuchten gebracht und das Ergebnis mit einer Polaroid-Sofortbildkamera dokumentiert.

Subklonierung von PCR-Produkten

Isoliert man mRNA aus humanem Gewebe und amplifiziert die in der Reversen Transkription entstandene cDNA in einer anschließenden PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern, so erhält man nicht zwangsläufig vollkommen identische DNA-Sequenzen als Ergebnis. Die initialen mRNA Transkripte können sich bereits erheblich voneinander unterscheiden, da sie verschiedenen Zellen entstammen und so Ausdruck unterschiedlicher Regulationsvorgänge, z. B. im Rahmen eines alternativen Splicings, sein können. Bei der Sequenzierung eines PCR-Produktes wird wiederum lediglich eine Information über die Basenfolge des Großteils der amplifizierten DNA geliefert. Es ist auf diese Weise also nicht möglich, zu erfahren, ob einzelne andere Sequenzen unter den PCR-Produkten vorhanden sind. Durch das Subklonieren eines PCR-Produktes gelingt es jedoch, sich nach dem Zufallsprinzip eine einzige der vervielfältigten DNA-Sequenzen herauszunehmen und wiederum selektiv zu amplifizieren und zu analysieren. Für diesen Zweck wurde das TOPO-TA-Cloning-System (Invitrogen, Carlsbad) verwendet.

Klonierung eines Expressionsplasmids

Es wurde der Vektor pCR 2.1 TOPO (Invitrogen, Carlsbad) verwendet, der eine einfache Ligation von PCR-Produkten, die mit Taq-Polymerase amplifiziert wurden, ermöglichte. PCR-Produkte, die mit dieser Polymerase hergestellt wurden, besitzen an ihrem 3'-Ende einen einzelnen Deoxyadenosin(A)-Überhang. Der verwendete Vektor liegt bereits in der linearisierten Form mit einem einzelnen Deoxythymidin(T)-Überhang vor. Anstelle einer konventionellen DNA-Ligase wird ein Enzym mit dem Namen Topoisomerase-I verwendet, das eine koordinierte Spaltung und Wiederverschließung von DNA katalysiert.

Durchführung:

Nach Auftrennung des mit genspezifischen Primern für Rac 1 wt hergestellten PCR-Produktes über ein 1 % Low-Melting-Agarose-Gel, wurde die dem Rac 1 wt entsprechende Bande bei ca. 600 bp mit einem sterilen Skalpell nach UV-Kontrolle ausgeschnitten, bei 65 °C in einem Reaktionsgefäß geschmolzen und bei 37 °C flüssig gehalten. Nach Zugabe von 1 µl pCR 2.1 TOPO-Vektor (Invitrogen, Carlsbad) zu 5 µl geschmolzener Agarose erfolgte die Ligation des PCR-Produktes in den Vektor durch Inkubation bei 37 °C für 5 min.

Transformation von Plasmid-DNA

Die Vervielfältigung des hergestellten Expressionsplasmides gelingt durch das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen. Auf einem Plasmid sind zusätzlich ein oder mehrere Antibiotikumresistenzgene kloniert, um die Plasmid-tragenden Bakterien selektieren zu können. Die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, werden gegen ein Antibiotikum, z.B. Ampicillin resistent. Die Plasmid-DNA läßt sich nun durch selektive Anzucht der Bakterien, die gegen das spezielle Antibiotikum resistent sind, vervielfältigen.

Puffer und Lösungen:

kompetente Zellen	E. coli TOP-10 One Shot (aus TOPO TA-Cloning Kit)
SOC-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefe Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ x 7H ₂ O* 10 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O* 20 mM Glucose * Diese Salze wurden erst nach dem Autoklavieren des Mediums aus 1M steril filtrierten Stammlösungen zugegeben
LB- (Luria-Bertani) Medium	0,5 % NaCl 0,5 % Hefeextrakt 1 % Trypton mit Aqua bidest. auffüllen; umgehend autoklavieren
LB-Agar	15 g Bactoagar pro Liter LB-Medium, autoklavieren
X-Gal (40 mg/ml, -20°C)	20 mg X-Gal in 500 µl Dimethylformamid auflösen
Ampicillin	Stammlösung: 100 mg/ml in Aqua bidest. (-20°C)

Durchführung:

30 µl kompetente TOP-10 E.coli Bakterien (Invitrogen, Lagerung bei -70 °C) wurden auf Eis aufgetaut und durch Zugabe von 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol auf die Transformation vorbereitet durch Permeabilisierung der Bakterienmembran. Nach Zugabe von 4 µl der Plasmid-DNA aus der oben beschriebenen Ligation blieb der Reaktionsansatz 30 min auf Eis stehen und wurde dann für genau 30 sec in einem 42 °C warmen Heizblock erhitzt. Danach wurden die Zellen auf Eis für 2 min abgekühlt und 250 µl SOC-Medium ohne

Antibiotikum vorsichtig zugegeben und vermischt. Die Zellen wurden für 30 min bei 37 °C und 220 rpm im Bakterienrüttler geschüttelt. 50 µl der Bakterienlösung wurden auf die vorgewärmten und mit 40 µl X-Gal-Lösung beschichteten LB-Agarplatten (Ø 10cm), die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienklone aufgrund ihrer Farbe selektiert und als Vorkultur in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin hochgezogen. Blaue Kolonien bedeuteten, dass das aufgenommene Plasmid nicht das gewünschte DNA-Stück enthielt. Stattdessen ist eine Re-Ligation des Vektors mit sich selbst erfolgt. Aufgrund des im Vektor enthaltenen LacZ-Fragments kommt es zur Umwandlung des in den LB-Agarplatten enthaltenen Substrates X-Gal und somit zur Blaufärbung.

Präparation von Plasmid-DNA

Je nach Anforderung hinsichtlich gewünschter Menge und Reinheit wurde das Mini-Präparations- und verschiedene Qiagen-Plasmidaufreinigungsverfahren zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienzellen eingesetzt.

Mini-Präparation

Die Plasmid-Mini-Präparation eignet sich besonders gut zur schnellen Kontrolle der Identität der amplifizierten DNA. Man bricht die Zellen durch alkalische Lyse (Birnboim et al. 1979; Birnboim et al., 1993) auf. Durch Zugabe einer 2,6 M Kaliumazetatlösung werden genomische DNA, Zelltrümmer, Proteine und SDS präzipitiert und durch Zentrifugation entfernt. Mit Isopropanol wird die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA gefällt. Während die gewonnene Plasmid-DNA aufgrund ungenügender Reinheit für Sequenzierungen meist ungeeignet ist, eignet sie sich hervorragend für Restriktionsanalysen.

Puffer und Lösungen:

Puffer1 (Lagerung bei 4 °C)	50 mM Tris-HCl; pH 7,5-8,0 10 mM EDTA; pH 8,0 100 µg/ml RNase A
Puffer 2	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer 3 (Lagerung bei 4 °C)	2,6 M Kaliumazetat; pH 5,2

Durchführung:

2 ml Bakterienvorkultur wurden bei 14.000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl Puffer 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Puffer 2 und Schütteln der Lösung wurden die Bakterien lysiert. Anschließend fügte man 200 µl Puffer 3 hinzu und schüttelte die Lösung erneut. Es bildete sich ein weißer, wolkiger Niederschlag aus genomischer DNA, Zelltrümmern, Proteinen und SDS. Der Niederschlag wurde bei 14.000 rpm für 5 min bei RT abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die letzten beiden Schritte wurden so lange wiederholt, bis der abgenommene Überstand völlig klar war. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 420 µl (0,7-faches Volumen) Isopropanol und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Die Plasmid-DNA wurde bei 14.000 rpm für 15 min abzentrifugiert, das entstandene Pellet einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend noch einmal bei 14.000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl Aqua bidest. resuspendiert.

Qiagen-Aufreinigungsverfahren

Wurde hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen benötigt, kam ein Plasmidaufreinigungsverfahren von Qiagen zur Anwendung. Je nach benötigter Menge an Plasmid-DNA gibt es unterschiedliche Kit-Größen (Mini-, Midi-, Maxi-Kit etc.) Die Extraktion der Plasmid-DNA erfolgt jedoch jeweils nach dem gleichen Prinzip. Die Bakterien werden durch alkalische Lyse (Birnboim et al., 1979; Birnboim et al., 1983) aufgebrochen, und man führt eine Präzipitation von genomischer DNA, Zelltrümmern, Proteinen und SDS mit einem Kaliumazetatpuffer herbei. Unter niedrigen Salz- und pH-Bedingungen erfolgt anschließend die Bindung der Plasmid-DNA an die Qiagen Anionenaustausch-Säule. Verunreinigungen, RNA und Proteine werden durch Waschen mit einem Puffer mittleren Salzgehaltes entfernt. Die Elution der Plasmid-DNA gelingt durch Zugabe eines Puffers mit hohem Salzgehalt. Das Salz wird anschließend durch Isopropanol-Präzipitation entfernt. Im folgenden wird die Qiagen Mini-Plasmid-Präparation dargestellt.

Puffer und Lösungen:

Puffer P1 (Lagerung bei 4 °C)	50 mM Tris-HCl; pH 7,5-8,0 10 mM EDTA; pH 8,0 100 µg/ml RNase A (frisch zugeben)
Puffer P2	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS

Puffer P3 (Lagerung bei 4 °C)	3 M Kaliumazetat; pH 5,5
Puffer QBT (Äquilibrierungspuffer)	750 mM NaCl 50 mM MOPS; pH 7,0 15 % Isopropanol 0,15 % Triton-X-100
Puffer QC (Waschpuffer)	1 M NaCl 50 mM MOPS; pH 7,0 15 % Isopropanol
Puffer QF (Elutionspuffer)	1,25 M NaCl 50 mM Tris-HCl; pH 8,5 15 % Isopropanol

Durchführung:

2,0 ml Bakterienkultur wurden fraktioniert in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 14.000 rpm für 1 min zum Pellet abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Hierauf wurden 300 µl Puffer P2 zugegeben und durch vorsichtiges Invertieren des Reaktionsgefäßes der Ansatz vermischt und die Zellen dabei lysiert. Es folgte eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 300 µl Puffer P3, vorsichtigem Mischen und anschließender Inkubation auf Eis für 15 min wurden genomische DNA, Zelltrümmer, Proteine und SDS präzipitiert. Das Präzipitat wurde bei 14.000 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der klare Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde abgenommen und auf eine zuvor mit 1 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Säule geladen. Nachdem sich die Säule durch die Gravitationskraft entleert hatte, wurde sie vier Mal hintereinander mit je 1 ml Puffer QC gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der Plasmid-DNA von der Säule durch Beladen der Säule mit 800 µl Puffer QF. Die DNA wurde durch Zugabe von 560 µl Isopropanol zum Eluat gefällt und bei 14.000 rpm für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, noch einmal bei 14.000 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Reaktionsgefäß luftgetrocknet. Nach dem Resuspendieren der Plasmid-DNA in sterilem Aqua bidest. (10-20 µl) wurde die DNA photometrisch vermessen (siehe unten) und eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die aromatischen Ringsysteme der Nukleinsäuren der DNA haben die Eigenschaft, im kurzwelligen Bereich Licht zu absorbieren. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde in einer Quarzküvette ein Aliquot der DNA vermessen und die ermittelten Absorptionswerte folgendermaßen ausgewertet:

Für doppelsträngige DNA gilt:

$$\text{Konzentration} = \frac{\text{Gemessene OD}_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g}}{\text{Probenvolumen}}$$

1 OD_{260nm} entspricht 50 µg DNA

Restriktionsanalyse

Die Restriktionsanalyse ermöglicht eine Beurteilung der Plasmid-DNA hinsichtlich des Erfolges des gesamten Klonierungs- und Transformationsvorganges. Die Plasmid-DNA wird mit 1 bis 2 spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten. Da die spezifischen Schnittstellen im Vektor und die Größe des Plasmids bekannt sind, kann man die Größe der nach dem Schneidevorgang erwarteten DNA-Fragmente berechnen und in einem Agarosegel (siehe Abb. 10, S.71) kontrollieren, ob das richtige Plasmid vervielfältigt wurde.

Hier ein Beispiel für einen Standard-Restriktionansatz:

1 µg Plasmid-DNA
1 µl Restriktionspuffer (1/10 Volumen; abhängig vom Enzym)
1 µl Restriktionsenzym
ad 10 µl Aqua bidest.

Dieser Ansatz wurde für 1 bis 2 h bei 37 °C (abhängig vom verwendeten Enzym) inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl Auftragspuffer wurde die Probe in einem 1,5 % diagnostischen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe unten). Um eine Aussage über die Nukleotidsequenz zu treffen, wurde eine Sequenzierung der Plasmid-DNA durchgeführt.

DNA-Sequenzanalyse

Alle Sequenzierungen wurden unter Verwendung eines ABI PRISM 377 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) von der Firma TopLab, Martinsried (Deutschland) durchgeführt.

Man verwendet eine DNA-Polymerase wie bei einer PCR, um eine bestimmte Sequenz einer Einzelstrang-DNA zu kopieren. Hierzu benötigt man ebenfalls Oligonukleotid-Primer und die 4 Desoxyribonukleosidtriosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Zusätzlich fügt man noch die 2',3'-Dideoxyanaloga dieser Nucleotide hinzu. Wird im Syntheseprozess eines dieser Analoga eingebaut, wird das Wachstum der Kette blockiert, weil das 5'-Hydroxylende fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Auf diese Weise entstehen Fragmente verschiedener Länge mit einem Dideoxyanalogon am 5'-Ende. Jedes der verwendeten Nucleotide ist mit einem individuellen fluoreszierenden Farbstoff markiert, der bei Anregung Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Man läßt die fluoreszierenden Fragmente durch ein Sequenziergel laufen, das sich in einem ca. 5 mm durchmessenden Schlauch in einer Sequenziermaschine befindet. Hier passieren die DNA-Fragmente einen Laserstrahl. Die Fluorochrome werden angeregt und das emittierte Licht wird von einer Photozelle registriert. Die Gele, von denen in einer Sequenziermaschine 50 Stück parallel bearbeitet werden können, werden auf diese Weise in Echtzeit während der Elektrophorese ausgelesen und die Emissionsspitzen computeranalytisch ausgewertet.

Northern Blot

Um die Expression von Rac1 auf Ebene der messenger RNA (mRNA) zu untersuchen, wurden Northern-Blot-Untersuchungen durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Nach Extraktion von RNA wird diese auf eine Nitrozellulosemembran immobilisiert und anschließend mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert. Die Quantifizierung der RNA-Expression erfolgt autoradiographisch.

Puffer und Lösungen:

10x MOPS	200 mM MOPS 50 mM Natriumazetat 10 mM EDTA pH 7,0
Danaturierungspuffer (Volumenangabe)	500 µl Formamid 50 µl 10 x MOPS 175 µl Formaldehyd 37 % 275 µl DEPC-H ₂ O

RNA-Ladepuffer	0,133 M EDTA; pH 8,0 4,0 g Saccharose 15 mg Bromphenolblau ad 7,5 ml DEPC-H ₂ O
20x SSC	3 M NaCl 0,5 M Natriumzitat ph 7,0 mit HCl einstellen
Church-Puffer	0,5 M NaPO ₄ , pH 7,5 1 mM EDTA 7 % SDS
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0

DEPC-H₂O

Durchführung:

Zuerst wurde ein denaturierendes Formaldehyd/Agarosegel in einem sterilen Erlmeyerkolben auf folgende Weise gegossen:

1 g Agarose wurde in 72,2 ml DEPC-H₂O aufgekocht, nach Abkühlung auf 60 °C wurden 10 ml 10 x MOPS, 17,8 ml Formaldehyd (37 %) und 3 µl Ethidiumbromid zugegeben. Anschließend wurde das Gel unter einem Abzug gegossen.

Während das Gel abkühlte wurden die Proben vorbereitet. Dazu wurden von jedem untersuchten Fall 10 µg Gesamt-RNA aus dem RNA-Extrakt abpipettiert und in einer Vakuumzentrifuge (Fa. Savant) eingedampft. Die entstandenen Pellets wurden in 20 µl Denaturierungspuffer resuspendiert. Es folgte eine Denaturierung für 10 min bei 65 °C, anschließend eine kurze Zentrifugation und die Zugabe von 5 µl RNA-Ladepuffer. Danach wurde das Northern-Gel in eine nur für RNA-Untersuchungen benutzte Gelelektrophoresekammer gegeben und diese mit Laufpuffer, bestehend aus 1x MOPS, aufgefüllt. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte für 3-4 Stunden bei 40 V. Da der Laufpuffer (1x MOPS) sich elektrolytisch zersetzt, ließ man ihn während dem Gellauf in der Kammer mittels einer Pumpe zirkulieren. Nachdem die Bromphenol-Blau-Farbbande des verwendeten Ladepuffers etwa 1 cm vor dem Ende des Gels angelangt war, wurde die Elektrophorese beendet. Um die RNA sichtbar zu machen, wurde das Gel unter eine UV-Leuchte (302 nm) gelegt und die durch Ethidiumbromid induzierten Fluoreszenzbanden mit Hilfe einer Polaroidsofortbildkamera fotografiert. Das Gel wurde in einer Plastikwanne 5 min unter laufendem Leitungswasser gespült. Anschließend wurde das

Gel ca. 30 min in 2x SSC geschwenkt. Danach wurde der Blot, ein Kapillarblot, in Form des folgenden Modells aufgebaut (Abb. 6):

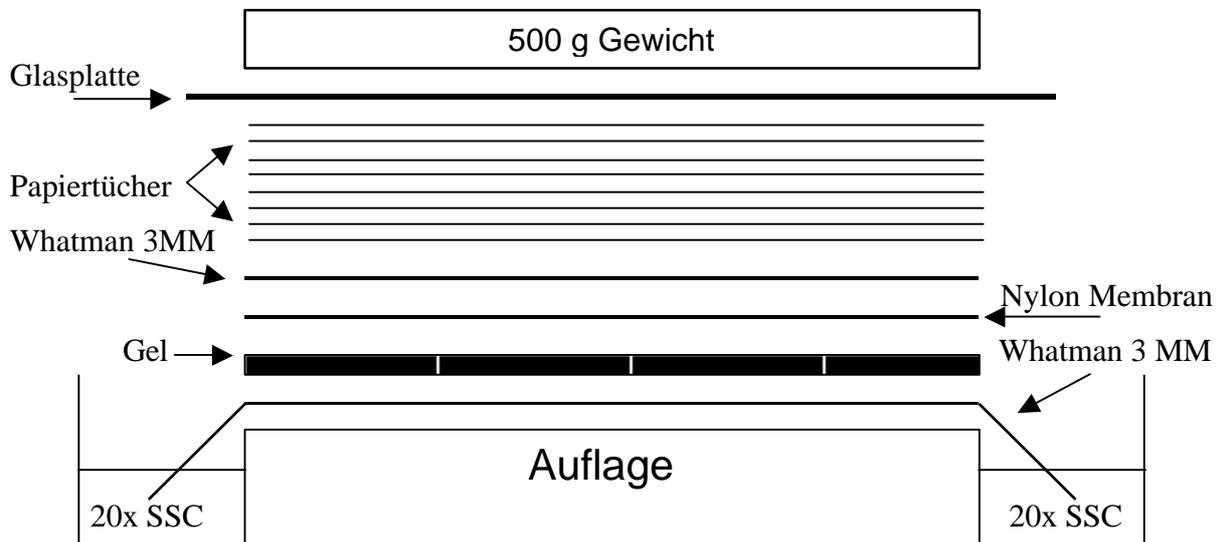


Abbildung 6: **Schematischer Aufbau eines Kapillarblots** (in Anlehnung an Sambrook et al., 1989)

Nach 1 Tag wurde der Blot abgebaut und die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt. Danach wurde der Blot für 2 h bei 80 °C gebacken, um die DNA auf der Membran zu fixieren. Die transferierte RNA wurde anschließend mit Hilfe von UV-Vernetzung (UV-Strata-Linker, Fa. Stratagene) während einer 12 sec langen Belichtung kovalent an die positiv geladene Nylon-Membran (Fa. Boehringer Mannheim) gebunden. Es folgte eine Prähybridisierung der Membran in 20 ml Church-Puffer mit 250 µl t-RNA (10 µg/µl, Boehringer Mannheim). Hierzu wurde ein ca. 20 cm langes Glas-Hybridisierungsröhrchen mit 5 cm Durchmesser in einem Hybridisierungssofen über Nacht rotiert.

Am nächsten Tag folgte die eigentliche Hybridisierung. Als Sonden wurde cDNA verwendet von Rac1wt, GAPDH und von 18S-RNA, die mit den Restriktionsenzymen HindIII und Xho I aus dem Vektor pcDNA 3.1 herausgeschnitten und aufgereinigt wurde. Die radioaktive Markierung erfolgte unter Verwendung des „Random Primed DNA Labeling Kits“ (Boehringer Mannheim). 50 ng der jeweiligen Sonde wurden mit Aqua bidest. in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 10 min bei 95 °C denaturiert. Zur Verhinderung der Renaturierung folgten 2 min auf Eis, anschließend wurde kurz zentrifugiert. Für die

Markierung der denaturierten Probe wurden 2 µl des 10x Reaktionsgemisches mit den Hexanukleotiden, 3 µl eines äquimolaren Gemisches der Nukleotide dATP, dCTP und dTTP, 5 µl radioaktives [$\alpha^{32}\text{P}$] dGTP (50 µCi) und 1 µl Exonuklease-defiziente Klenow-Polymerase (2 U/µl) zugegeben und der Reaktionsansatz 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die anschließende Aufreinigung der markierten Probe und Elimination von freien Nukleotiden erfolgte mit Hilfe des NICKTM-Säulen-Aufreinigungssystems (Fa. Pharmacia): Zuerst wurde die Säule mit 3 ml TE-Puffer äquilibriert. Nach Aufbringen der markierte Sonde, wurde einmal mit 400 µl TE-Puffer nachgespült. Die erste Spülfraktion wurde verworfen. Beim zweiten Spülen der Säule mit weiteren 400 µl TE-Puffer löste sich die Sonde wieder von der Säule und es erfolgte die Elution der gereinigten Sonde. Es schloß die Überprüfung der Sonden-Aktivität im Szintillationsmeßgerät (Fa. Beckmann) durch Zugabe von 1 µl Eluat auf 10 ml Szintillationslösung an. Die erhaltene Aktivität lag mit Werten zwischen 160.000 und 250.000 Zählheiten pro Minute (cpm) im Konfidenzbereich. Um Einzelstränge zu erhalten, wurde die markierte Sonde nun für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die bereits prähybridisierten Blots wurden nun durch Zugabe der Einzelstrang-Sonde zu 10 ml Church-Puffer und 250 µl tRNA und Inkubation über Nacht bei 65 °C hybridisiert.

Am folgenden Tag wurden die Blots je nach verwendeter Sonde 2 x 15 min und 3 x 30 min in Waschlösung (2x SSC / 1 % SDS) bei 60 °C gewaschen. Die Blots wurden hierauf zwischen Filterpapier getrocknet, in Frischhaltefolie eingewickelt und über Nacht zum Zwecke der quantitativen Auswertung auf einen Phosphor-Screen des Phosphor Imager 445SI (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) gelegt. Eine anschließende Röntgenfilmexposition (X-O-Mat AR, Kodak) der Blots erfolgte für mindestens 3 und maximal 14 Tage bei -70 °C unter Verwendung einer speziellen Verstärkerfolie, die sich zwischen Blot und Röntgenfilm befand. Die Entwicklung wurde mit einem automatischen Entwickler (Fa. Kodak) durchgeführt

Doppelhybridisierung

Für eine erneute Hybridisierung des Blots mußte zuerst die alte hybridisierte Sonde von diesem entfernt werden. Dazu wurde der Blot 2 x für je 15 min in einer kochenden Lösung (2x SSC / 1% SDS) gewaschen. Anschließend wurde der Blot erneut prähybridisiert und mit einer anderen Sonde gemäß dem obigen Protokoll hybridisiert.

Southern Blot

Analog zum Northern Blot wird beim Southern-Blot statt der Rac1-RNA-Expression der Rac1-DNA-Gehalt im Mammagewebe untersucht. Nach Extraktion von DNA wird sie auf eine Nitrozellulosemembran immobilisiert und anschließend mit einer radioaktiv-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Die autoradiographische Quantifizierung erfolgt identisch zum Vorgehen beim Northern Blot.

Puffer und Lösungen:

DNA-Ladepuffer	0,133 M EDTA; pH 8,0 4,0 g Saccharose 15 mg Bromphenolblau ad 7,5 ml Aqua bidest.
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 0,5 M Natriumzitat ph 7,0 mit HCl einstellen
Church-Puffer	0,5 M NaPO ₄ , pH 7,5 1 mM EDTA 7 % SDS
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0

Durchführung:

Von jedem Patientengewebe wurden 15 µg DNA eingesetzt und einem Verdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI (High concentration, Fa. Boehringer Mannheim) unterzogen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C mit insgesamt 30 U EcoRI. Am nächsten Morgen wurde ein 0,8 % Agarosegel in TAE-Puffer mit Ethidiumbromid angefertigt und die verdauten DNA-Proben nach kurzem Erwärmen auf 56 °C und Zugabe von Ladepuffer in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte für 2 h bei 65 V. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel unter eine UV-Leuchte (302 nm) gelegt und photographiert. Hierauf wurde das Gel 5 min in einer kleinen Wanne mit Aqua bidest. gespült. Um einen möglichst

guten Transfer der DNA vom Gel auf die Membran zu bekommen, wurde das Gel für 10 min in 0,25 M HCl depurinisiert, um die DNA zu strecken. Dann wurde das Gel 2x 3 min mit Aqua bidest. gespült und 2x 20 min in Denaturierungslösung auf dem Schüttler rotiert. Es folgte nach wiederholtem kurzem Spülen mit Aqua bidest. eine Inkubation des Gels für 20 min in Neutralisierungslösung. Um den Transfer der DNA auf die Membran zu ermöglichen, sollte sich nun ein pH < 9,0 einstellen.

Der Aufbau des Kapillarblots erfolgte wie in Abbildung 6 beschrieben. Auch beim Southern Blot wurde eine positiv geladenen Nylonmembran (Boehringer Mannheim) verwendet. Nach 1 Tag wurde der Blot abgebaut und die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt. Danach wurde der Blot für 1 h bei 80 °C gebacken. Die transferierte RNA wurde anschließend mit Hilfe von UV-Vernetzung (UV-Strata-Linker, Fa. Stratagene) während einer 12 sec langen Belichtung kovalent an die positiv geladene Nylon-Membran (Fa. Boehringer Mannheim) gebunden. Es folgte eine Prähybridisierung der Membran in 15 ml Church-Puffer mit 250 µl t-RNA (10 µg/µl, Boehringer Mannheim). Hierzu wurde ein ca. 20 cm langes Glas-Hybridisierungsröhrchen mit 5 cm Durchmesser in einem Hybridisierungssofen für 5 h bei 65 °C rotiert. Anschließend folgte die eigentliche Hybridisierung.

Als Sonde wurde Rac1wt cDNA verwendet, die mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xho I aus dem Vektor pcDNA 3.1 herausgeschnitten und aufgereinigt wurde. Die radioaktive Markierung erfolgte unter Verwendung des „Random Primed DNA Labeling Kits“ (Boehringer Mannheim). 50 ng der Sonde wurden mit Aqua bidest. in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 10 min bei 95 °C denaturiert. Zur Verhinderung der Renaturierung folgten 2 min auf Eis, anschließend wurde kurz zentrifugiert. Für die Markierung der denaturierten Probe wurden 2 µl des 10x Reaktionsgemisches mit den Hexanukleotiden, 3 µl eines äquimolaren Gemisches der Nukleotide dATP, dGTP und dTTP, 4 µl radioaktives [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (50 µCi) und 1 µl Exonuklease-defiziente Klenow-Polymerase (2 U/µl) zugegeben und der Reaktionsansatz 45 min bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung der markierten Probe erfolgte mit Hilfe des NICK™-Säulen-Aufreinigungssystems (Fa. Pharmacia): Zuerst wurde mit 3 ml TE-Puffer die Säule gespült, dann die markierte Sonde aufgebracht, mit 400 µl TE-Puffer gespült und mit weiteren 400 µl TE-Puffer die Sonde eluiert. Es folgte die Messung der Sonden-Aktivität im Szintillationsmeßgerät (Fa. Beckmann) durch Zugabe von 2 µl Eluat auf 10 ml Szintillationslösung.

Die erhaltene Aktivität lag mit Werten zwischen 180.000 und 210.000 Zählleinheiten pro Minute (cpm) im selbstbestimmten Konfidenzbereich. Um Einzelstränge zu erhalten,

wurde die markierte Sonde nun für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die bereits prähybridisierten Blots wurden nun durch Zugabe der Einzelstrang-Sonde zu 20 ml Church-Puffer und 500 µl tRNA und Inkubation über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Am folgenden Tag wurden die Blots 1 x 15 min bei 58 °C, 2x 20 min bei 62 °C und 1x 30 min bei 62 °C in Waschlösung (2x SSC / 1 % SDS) gewaschen. Der Blot wurde hierauf zwischen Filterpapier getrocknet, in Frischhaltefolie eingewickelt und über Nacht zum Zwecke der quantitativen Auswertung auf einen Phosphor-Screen des Phosphor Imager 445SI (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) gelegt. Eine anschließende Röntgenfilmexposition (X-O-Mat AR, Kodak) des Blots erfolgte für mindestens 3 und maximal 14 Tage bei -70 °C. Die Entwicklung wurde mit einem automatischen Entwickler (Fa. Kodak) durchgeführt.

MAPKinase-Assays

Mit Hilfe der MAPKinase-Assays ist es möglich, die enzymatische Aktivität von MAPKinasen (Erk, Jnk, p38) zu messen. Die Gewebeproben wurden lysiert und die jeweilige MAPK mit einem spezifischen Antikörper immunopräzipitiert. Es folgte eine Inkubation mit einem geeigneten Substrat und radioaktivem [γ -³²P] ATP. Als Substrat für Erk1 wurde myelinisch-basisches Protein (MBP) aus dem eigenen Labor verwendet, während für den Jnk-Kinase-Assay rekombinantes, als GST-Fusionsprotein hergestelltes c-Jun (AS 3-121) eingesetzt wurde. Setzt man gleiche Proteinmengen ein, so ist die Menge des phosphorylierten Substrates ein Maß für die Aktivität der MAPK. Für den p38 MAPK-Assay wurde ein nicht-radioaktiver Assay verwendet, der weiter unten näher beschrieben wird.

Gewebeaufschluß für MAPKinase-Assays

Zwischen 2 g und 8 g des in flüssigem Stickstoff gelagerten Gewebe wurde von jeder Patientin in einem Mikrodismembrator (Braun-Melsungen) pulverisiert (30 sec, auf höchster Stufe). Anschließend wurden die enthaltenen Zellen durch Zugabe von Puffer A (50 mM HEPES pH7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 % Glycerin; 1 % Triton X-100; frisch zugeben: 10 mM Natriumfluorid; 1 mM Natriumorthovanadat; 10 µg/ml Aprotinin und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) lysiert. Das Zellysate wurde bei 14.000 rpm, 4 °C, für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mit einem Reagenz der Fa. Pierce.

ERK-Kinase-Assay

Puffer und Lösungen:

HNTG-Puffer	20 mM HEPES 150 mM NaCl 10 % Glycerin 10 mM Natriumpyrophosphat
Waschpuffer	20 mM HEPES 10 mM MgCl ₂ frisch hinzufügen: 400 µM Natriumorthovanadat 1 mM DTT
Kinasepuffer	Waschpuffer frisch hinzufügen: 1 µg/µl MBP 50 µM ATP 1 µCi [γ - ³² P] ATP 5 mM para-Nitrophenylphosphat
Lämmli-Puffer reduzierend (2x)	62,5 % Tris-HCl; pH 6,8 4 % (w/v) SDS 10 % Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 5 % β -Mercaptoethanol

Durchführung:

Nach einer BCA-Proteinbestimmung wurden je nach Versuchsreihe 200 µg oder 500 µg des beim Gewebeaufschluß erhaltenen Zellysates für 3 h mit 30 µl Protein A -Agarose, die vorher dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen wurde, und 1 µg anti-Erk1 Antikörper auf einem Drehrad bei 4 °C rotiert. Nach Abschluß der Immunopräzipitation wurden die Protein A-Agarose beads dreimal mit je 500 µl kaltem HNTG-Puffer gewaschen, jeweils bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit einer dünnen Kanüle vorsichtig abgesaugt. Hierauf erfolgte ein weiterer Waschschrift mit je 750 µl Waschpuffer, der nach 10 min Inkubation und einer Zentrifugation von 3 min bei 4 °C verworfen wurde. Es schloß sich die Inkubation der Protein-A Agarose mit radioaktivem Kinasepuffer für 15 min bei 30 °C im Heizblock an. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 2x reduzierendem Lämmli-Puffer und Erhitzen der Proben auf 95 °C für 3 min. Die Deckel der Reaktionsgefäße wurden hierbei durch Parafilm und Anlegen eines festen Verschlusses gesichert. Die beads wurden bei 14000 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Orientierend an der 30 kD-Bande des Molekulargewichtsmarkers wurde das Gel an dieser Stelle horizontal mit einem sterilen Skalpell durchtrennt. Im unteren Teil des Gels befindet

sich bei 21 kD die Bande des radioaktiv phosphorylierten MBP. Dieser Teil des Gels wurde in einem Gelrockner getrocknet und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mehrere Stunden autoradiographiert. Die Erk-Proteine mit einem Molekulargewicht von 42-44 kD, die im oberen, nichtradioaktiven Teil des Gels liegen, wurden auf Nitrozellulose transferiert und in einem Kontroll-Western Blot mit einem anti-Erk1 Antikörper detektiert.

JNK-Kinase-Assay

Puffer und Lösungen:

HNTG-Puffer	20 mM HEPES 150 mM NaCl 10 % Glycerin 10 mM Natriumpyrophosphat
Waschpuffer	20 mM HEPES 10 mM MgCl ₂ frisch hinzufügen: 400 μM Natriumorthovanadat 1 mM DTT
Kinasepuffer	Waschpuffer frisch hinzufügen: 2 μg GST-c-Jun 20 μM ATP 1 μCi [γ - ³² P] ATP 5 mM para-Nitrophenylphosphat
Lämmli-Puffer reduzierend (2x)	62,5 % Tris-HCl; pH 6,8 4 % (w/v) SDS 10 % Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 5 % β -Mercaptoethanol

Durchführung:

Nach einer BCA-Proteinbestimmung wurden 300 μg des beim Gewebeaufschluß erhaltenen Zelllysates für 3 h mit 30 μl Protein A-Agarose, die vorher dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen wurde, und 1 μg anti-Jnk1 Antikörper auf einem Drehrad bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ rotiert. Nach Abschluß der Immunopräzipitation wurden die Protein A-Agarose beads dreimal mit je 500 μl kaltem HNTG-Puffer gewaschen, jeweils bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit einer dünnen Kanüle vorsichtig abgesaugt. Hierauf erfolgte ein weiterer Waschschrift mit je 500 μl Waschpuffer, der nach 10 min Inkubation auf Eis und einer Zentrifugation von 3 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ verworfen wurde. Es schloß sich die Inkubation der

Protein-A Agarose mit jeweils 30 µl Kinasepuffer für 30 min bei 30 °C im Heizblock an. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 2x reduzierendem Lämmli-Puffer und Erhitzen der Proben auf 95 °C für 3 min. Die Deckel der Reaktionsgefäße wurden hierbei durch Parafilm und Anlegen einer festen Kappe gesichert. Die beads wurden bei 14000 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand in einer 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde in einem Gelrockner getrocknet und anschließend bei –80 °C für mehrere Stunden autoradiographiert.

p38-Kinase-Assay

Dieser Assay funktioniert im Allgemeinen analog zu den radioaktiven Kinase-Assays. Die Gewebeproben wurden lysiert und p38 mit einem bereits an Protein G beads gebundenen spezifischen Antikörper, der uns freundlicherweise von Dr. Colleen Fearn (The Scripps Research Institute, La Jolla, USA) zur Verfügung gestellt wurde, immunopräzipitiert. Es folgte eine Inkubation mit GST-ATF2 (AS 1-96) als Substrat und nichtradioaktivem ATP. Im Falle von p38 stand nämlich ein Antikörper zur Verfügung, der imstande ist, ausschließlich phosphoryliertes ATF-2 (THR71, New England Biolabs) zu erkennen. Auf diese Weise war eine Bestimmung des phosphorylierten Substrates mittels Western Blot Analyse und ECL-Detektion möglich.

Puffer und Lösungen:

Lysis-Puffer	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 % Triton-X 100 2,5 mM Natriumpyrophosphat 400 µM Natriumorthovanadat 1 µM Leupeptin 1 mM PMSF
--------------	--

Kinase-Puffer	25 mM Tris-HCl 2 mM DTT 10 mM MgCl ₂ 100 µM Natriumorthovanadat 5 mM β-Glycerophosphat
---------------	---

Lämmli-Puffer red. (3x) 62,5 % Tris-HCl; pH 6,8
6 % (w/v) SDS
10 % Glycerin
0,1 % (w/v) Bromphenolblau
5 % β -Mercaptoethanol

Durchführung:

Von jedem Gewebeaufschluß wurden 150 μ g Protein mit 50 μ l p38 -beads, die vorher dreimal mit Lysispuffer gewaschen wurden, 2 h bei 4 °C auf einem Drehrad rotiert. Es folgten zwei Waschschrirte mit je 500 μ l Lysispuffer und zwei Waschschrirte mit je 500 μ l Kinasepuffer mit einer Zentrifugation nach jedem Schritt bei 3000 rpm. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Anschließend wurden die abzentrifugierten beads in 50 μ l Kinasepuffer vorsichtig resuspendiert, die Lösung auf eine Konzentration von 200 μ M ATP eingestellt und 2 μ g ATF2-Fusionsprotein als Substrat zugegeben. Die Phosphorylierung des Substrates erfolgte während einer Inkubationzeit von 30 min bei 30 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3x reduzierendem Lämmli-Puffer und Erhitzen der Proben auf 95 °C für 2 min abgestoppt. Von jeder Probe wurden 75 % des Reaktionsansatzes in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend über Nacht, gemäß dem Protokoll für Western Blots, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der monoklonale Maus-anti-phospho-ATF2-Antikörper wirkte eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Blot ein. Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonaler, peroxidasegekoppelter anti-Maus-Antikörper (1:3000) verwendet, so daß die Proteinbanden mittels Chemilumineszenz mit dem ECL-Reagenz sichtbar gemacht werden konnten.

Herstellung rekombinanter Proteine

Hier soll exemplarisch die Herstellung von rekombinantem, in E.coli exprimiertem Rac1wt-Protein beschrieben werden.

Die cDNA von Rac1wt wird in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert und in Bakterien transformiert. Man läßt die Bakterienkulturen wachsen und induziert die Expression des Proteins als Fusionsprotein mit einem GST-Teil (Glutathion-Sepharose-Transferase), über den anschließend selektiv das Protein isoliert und aufgereinigt werden kann.

Puffer und Lösungen:

Lysispuffer
50 mM Tris, pH 7,5
150 mM NaCl
5 mM MgCl₂
1 mM DTT
1 mM PMSF
1 mM EDTA
1 μM GDP

Waschpuffer
50 mM Tris, pH 8,0
150 mM NaCl
5 mM MgCl₂
1 mM DTT
1 mM PMSF
1 μM GDP
5 μl/ml Aprotinin

Thrombinpuffer (pH = 8,3)
50 mM Tris, pH 8,0
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂
1 mM DTT
2,5 mM CaCl₂
1 μM GDP

Durchführung:

Für die Herstellung eines geeigneten DNA-Konstruktes wurde der für Proteinexpression in Bakterien geeignete GST-Vektor pGEX-2T (Pharmacia, Schweden) verwendet. Das DNA-Konstrukt wurde nach üblichem Schema in pBL-21 E.coli Bakterien transformiert, die eine besonders niedrige Proteaseaktivität besitzen.

1000 ml LB-Medium wurden mit den transformierten Bakterien versetzt und bei 37 °C inkubiert bis im Photometer bei 600 nm ein Extinktionswert von ungefähr 0,8 erreicht war (Dauer 3 Stunden). Durch Zugabe von 100 μl 1 M IPTG (Isopropyl-thio-β-D-Galactosidase; Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde die Transkription/Translation induziert. Es folgte eine Inkubationszeit von 3 h bei 37 °C. Die Bakterien wurden nun 10 min bei 4°C und 4000 rpm zum Pellet abzentrifugiert. Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4 °C, um eine Proteolyse zu verhindern. Die Pellets wurden in insgesamt 20 ml Lysispuffer resuspendiert und 15 min auf Eis in einem 50 ml-Röhrchen inkubiert. Mit Hilfe von Ultraschallwellen (Sonicator[®]) wurde die Hülle der Bakterien mechanisch zerstört und das enthaltene Protein freigesetzt. Es folgte wiederum eine Inkubation auf Eis für 15 min. Durch Zugabe des Überstandes zu 1 ml Glutathion-Sepharose-beads (GS-beads, Pharmacia, Schweden), die vorher mit Lysis-Puffer gewaschen und äquilibriert worden waren, entstand ein Komplex aus dem Fusionsprotein und

den GS-beads. Diese Komplexbildung erfolgte durch langsame Rotation des Reaktionsgefäßes für 1,5 Stunden bei 4 °C. Die beads wurden dann bei 2000 rpm für 5 min bei 4°C vorsichtig abzentrifugiert und anschließend dreimal mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und der Überstand jeweils abgenommen. Es schlossen sich zwei Waschschriffe mit jeweils 10 ml Thrombinpuffer an. Zwischen dem exprimierten Protein Rac1wt und dem GST-Teil des Fusionsproteins befand sich eine sog. Thrombinschneidestelle, an der der Einsatz von Thrombin zu einer Abtrennung des Rac1wt-Proteins führt. Zu diesem Zweck wurden 2ml Thrombinpuffer und 20 U Thrombin (Calbiochem, Bad Soden) zu den gewaschenen beads gegeben und 45 min bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Um die Thrombinfunktion abzustoppen, wurden EDTA und PMSF zugegeben (Endkonzentration je 1mM). Die noch in der Lösung enthaltenen beads mit dem gebundenen GST-Teil wurden 5 min bei 3000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, dreimal mit je 2 ml Thrombinpuffer gewaschen und der Überstand, der nun das Rac1wt-Protein enthielt, in einem frischen Reaktionsgefäß gesammelt. Durch Zugabe von 200 µl p-Amino-Benzamidin-beads (Sigma-Aldrich, Steinheim), die vorher mit Thrombinpuffer äquilibriert wurden, und Inkubation für 60 min bei 4 °C unter Rotieren wurde das noch enthaltene Thrombin gebunden und durch anschließende 5 min Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C auf dem Boden des Reaktionsgefäßes isoliert. Der das Protein enthaltende Überstand wurde nun in vier Schritten in einem Dialyseschlauch (Spectra/Por, MWCO: 8,000) gegen den angegebenen Dialysierpuffer bei 4 °C dialysiert. Im ersten und zweiten Schritt wurde der Dialysepuffer noch zusätzlich auf eine Endkonzentration von 1µM GDP eingestellt. Alle vier Dialyseschriffe dauerten 1 Stunde, mit Ausnahme des zweiten, der über Nacht erfolgte. Das im Dialyseschlauch nach diesen vier Schritten gereinigte Protein wurde zuletzt mit Hilfe von Centricon-10[®] Röhrchen (Millipore, Schweden) konzentriert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

„Aktivierung“ von rekombinantem Rac1

Die rekombinant hergestellten G-Proteine liegen normalerweise in der inaktiven, der GDP-gebundenen Form vor. Mit dem hier beschriebenen Experiment ist es möglich, G-Proteine mit GTP zu laden, also zu aktivieren. Hierdurch erhält man Aufschluß darüber, ob überhaupt, die Fähigkeit zur GTP-Bindung besteht, es sich also um ein funktionsfähiges Protein handelt oder nicht. Desweiteren kann man die aktivierten G-Proteine als Positivkontrollen im unten näher beschriebenen Rac1-Aktivitätsassay einsetzen.

Man verwendet hierzu ein GTP-Analogon, das nichtradioaktive GTP γ S, das aufgrund seiner Struktur nicht hydrolysierbar ist.

Puffer und Lösungen:

Reaktionspuffer	25 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA 1 mM DTT 5 mM MgCl ₂
EDTA	0,1 M
GTP γ S	10 ⁻³ M
Stopplösung	1 M MgCl ₂

Durchführung:

Zu 1,4 μ g rekombinatem Rac1wt/Rac1b gibt man in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 5 μ l EDTA, 5 μ l GTP γ S und Reaktionspuffer bis zu einem Gesamtvolumen von 18,8 μ l. Es folgt eine Inkubation bei 30 °C im Wasserbad. Schließlich wird die Reaktion durch Zugabe von 1,2 μ l Stopplösung beendet. Das Gesamtvolumen von 20 μ l ist geeignet für die Verwendung im folgenden Rac1-Aktivitäts-Assay.

Rac1-Aktivitäts-Assay

Das Ziel dieses Experimentes ist die Detektion und Unterscheidung von aktivem und inaktivem Rac1 in Zell- oder Gewebslysaten.

Pak1 oder genauer „p21-activated kinase“ ist ein distaler Bindungsparameter von Rac1 (Abb.3), der aktive Formen von Rac1 durch seine p21-Bindungsdomäne (PBD) binden kann. Die Bindungsdomäne entspricht der Aminosäuresequenz 67-105 von humanem PAK1. Aktives GTP-Rac1 wurde im Mammagewebe mit einem sogenannten „pull down assay“ mit dem GST-Fusionsprotein, GST-PBD, gekoppelt an Sepharose beads präzipitiert.

Puffer und Lösungen:

Bindungspuffer	25 mM Tris (pH 8.0) 1 mM DTT 30 mM MgCl ₂ 40 mM NaCl 0,5 % NP-40
----------------	---

Waschpuffer mit NP-40 25 mM Tris (pH 8.0)
 1 mM DTT
 30 mM MgCl₂
 40 mM NaCl
 1 % NP-40

Waschpuffer ohne NP-40 25 mM Tris (pH 8.0)
 1 mM DTT
 30 mM MgCl₂
 40 mM NaCl

Durchführung:

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 300 µg Gewebslysat mit Bindungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 400 µl gebracht. Nach Zugabe von 10 µg rekombinanter GST-Proteinbindungsdomäne (Pak1) und 15 µl gewaschenen Glutathion Sepharose 4B beads (Pharmacia, Schweden), die in Bindungspuffer gewaschen und äquilibriert wurden, wurde der Ansatz 1h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Es bildete sich nun ein Komplex aus dem Mammagewebe enthaltendem GTP-Rac1, GST-PBD und Glutathion-Sepharose beads. Diese Komplexe wurden 3 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und der das GDP-gebundene Rac1 enthaltende Überstand abgenommen und asserviert. Es folgte ein dreimaliges Waschen der beads mit je 1 ml Waschpuffer (mit NP-40) und einem einmaligen Waschen mit 1 ml Waschpuffer (ohne NP-40) mit jeweiligem Abzentrifugieren der beads vor jedem neuen Waschschrift.

Die Quantifizierung von GTP-Rac1 erfolgt folgendermaßen:

20 µl reduzierender 3x Lämmli-Puffer wurden direkt in das Reaktionsgefäß zu den isolierten beads gegeben und die Proben 5 min bei 95 °C gekocht. Danach wurde die gesamte Probe mit den beads auf ein 12,5 % PAA-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte ein übliches Western-Blot-Verfahren mit einem monoklonalen Antikörper gegen Rac1 wie oben beschrieben. Sollte nicht-GTP-gebundenes Rac1 detektiert werden, so wurden statt der isolierten beads 50 µl des initialen Überstandes nach der einstündigen Inkubation mit den frischen beads in einen Western Blot eingesetzt und nach Rac1 detektiert.

Immunhistochemie

Mit der Immunhistochemie kann man unter anderem eine direkte Aussage über die Lokalisation eines bestimmten Proteins im Gewebsverbund treffen.

Für die immunhistochemischen Färbungen von Rac1 an formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebsschnitten wurde eine indirekte Detektionsmethode unter

Verwendung des Streptavidin/Biotin/Peroxidase-Systems mit DAB (Diaminobenzidin) als Substrat verwendet. Als Primärantikörper kamen zum Einsatz:

1. Anti-Rac-Antikörper (monoklonaler Maus-Antikörper) (UBI, Lake Placid, NY) #05-389
2. Anti-Rac-Antikörper (polyklonaler Kaninchen-Antikörper) (von Prof. U. Knaus, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) (Quinn et al., 1993)

Zur Detektion wurde der DAKO ChemMate Detection Kit DAB (DAKO, Hamburg) verwendet, der nach folgendem Prinzip funktioniert:

Nachdem der Primärantikörper an das Antigen gebunden hat, wird ein biotinylierter Sekundärantikörper zugegeben, der sich an den Primärantikörper bindet. Peroxidasegekoppeltes Streptavidin bindet wiederum in einem nächsten Schritt an die Biotin-Reste des Sekundärantikörpers. Gibt man nun DAB hinzu, das ein Substrat für die Peroxidase darstellt, so kommt es zu einer Braunfärbung des Gewebes an den Stellen, an die initial ein Primärantikörper gebunden hat. Der Vorteil dieser indirekten Nachweismethode ist die Signalverstärkung, da mehrere Peroxidasmoleküle an das Biotin des Sekundärantikörpers binden können.

Puffer und Lösungen:

10 x Trispuffer (Stocklösung)	60,5 g TrisBase-Base (Sigma, Deisenhofen) 90 g NaCl (Merck, Darmstadt) pH 7,6 einstellen ad 1000 ml Aqua bidest. Gebrauchslösung 1:10
-------------------------------	---

PBS	7,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 37 mM NaCl 2,7 mM KCl; pH 7,2
-----	--

Durchführung:

Die Gewebsschnitte werden zunächst über eine absteigende Alkoholreihe entparaffinisiert. Hierzu erfolgt eine initiale Inkubation der Schnitte bei 65 °C im Brutschrank über Nacht. Die folgenden Schritte gliedern sich wie folgt:

- 4 x 5 min in frisches Xylol
- 2 x 5 min in Isopropylalkohol (100 %)
- 2 x 5 min in Ethanol (96 %)
- 2 x 5 min in Ethanol (70 %)
- 2 x 5 min in Aqua bidest spülen
- 3 x 5 min in Trispuffer spülen

Zur Demaskierung der Antigene wurden die entparaffinierten und in Trispuffer gespülten Schnitte für 20 min in eine 0,1 % Proteaselösung (P-8038, Sigma, Deisenhofen) gestellt. Durch dreimaliges Abspülen der Schnitte mit frischem Trispuffer wurde eine Nachandauung verhindert. Um keine falsch positiven Ergebnisse zu erhalten, wurde eine etwaige endogen vorhandene Peroxidasaktivität des Gewebes durch eine Inkubation des Schnittes für 30 min in 3 % Wasserstoffperoxid (in Methanol) geblockt. Die Einwirkzeit der Primärantikörper betrug jeweils 2 Stunden in einer Konzentration von 10 µg/ml in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Nach Spülen mit PBS wurde der biotinylierte Sekundärantikörper aufgetragen. Eine Kontrolle der Spezifität der Rac-Färbungen erfolgte durch Verwendung irrelevanter Kontrollantikörper (IgG-Kontrolle). Mittels Hämatoxylin erfolgte eine blaue Gegenfärbung der Zellkerne. Die Auswertung der Färbungen erfolgte nach einem festen Schema, in dem die relative Farbstärke und der Prozentsatz an positiven Zellen insgesamt erfaßt wurden (Remmele et al., 1987).

Nukleotid-Austausch-Assay

Wie in der Einleitung beschrieben, sind kleine GTPasen nur aktiv, wenn sie GTP gebunden haben. Mit dem Nukleotid-Austausch-Assay kann man den Austausch von GTP durch GDP bei kleinen G-Proteinen untersuchen. Bei diesem Versuch nutzt man die Eigenschaft der kleinen G-Proteine, GTPγS irreversibel zu binden. Es kann nicht hydrolysiert werden. Entscheidend beeinflusst wird die Nukleotid-Austauschrates durch die MgCl₂-Konzentration.

Puffer und Lösungen:

„Hotmix“	500 nM MgCl ₂
	25 mM HEPES
	500 µM DTT
	50 µg/µl BSA
	2,5 mM Tris-HCl, pH 8,0
	+ 20 µCi [³⁵ S]GTPγS (auf 1000ml Aqua bidest.)

Stoppuffer
50 mM Tris-HCl, pH 7,6
50 mM NaCl
9,15 mM MgCl₂
0,1 mg/ml BSA

Durchführung:

Für die jeweiligen Ansätze wurden silikonisierte Glasröhrchen verwendet, um eine mögliche GTP-Bindung an Kunststoffoberflächen zu verhindern.

Je 1,5 µg rekombinant hergestelltes Rac1wt-Protein und Rac1b-Protein wurden in einem Gesamtvolumen von jeweils 100 µl durch Zugabe von „Hotmix“ und Inkubation für 5 min im schüttelnden Wasserbad bei 30 °C mit radioaktivem [$\gamma^{35}\text{S}$] GTP „geladen“. Am Ende dieses Schrittes befindet sich nur aktives [$\gamma^{35}\text{S}$]-GTP-Rac1-Protein im Glasröhrchen. Die Bindung ist jedoch reversibel. Nach Ablauf von 5 min wurde in jedes Röhrchen nicht-radioaktives GTP γS bis zu einer Endkonzentration von 1 mM pipettiert und weiter im Wasserbad inkubiert, um zeitabhängig das Verhältnis von [$\gamma^{35}\text{S}$]-GTP-Rac1 und γS -GTP-Rac1 zu bestimmen. Da nicht-radioaktives GTP γS im Überschuß vorhanden ist und irreversibel an Rac1 bindet, erhöht sich der Anteil an nicht-radioaktivem γS -GTP-Rac1. Nach Ablauf von 0, 1, 2, 5, 10, 20 und 30 min wurde je eine Reaktion durch Zugabe von 3 ml eiskaltem Stoppuffer (9,15 mM MgCl₂) beendet.

Um die Menge an radioaktivem GTP zu messen, das noch an das G-Protein gebunden ist, wird der Inhalt des gesamten Röhrchens auf eine vorher befeuchtete Nitrozellulosemembran (Protran[®] BA85; 0,45 µm, Ø 25 mm, Schleicher & Schüll, Dassel) gegeben, die unter Vakuum steht. Die Membran bindet nur Protein. Durch mehrere Waschschrte mit Stoppuffer bleibt auch die Radioaktivität, die an das Rac1-Protein gebunden ist, auf der Membran fixiert. Die Membran wird anschließend unter einer Infrarotlampe getrocknet, in Szintillationslösung aufgelöst und die proteingebundene Radioaktivität in einem automatischen ³⁵S-Counter bestimmt (Chuang et al., 1994).

GTP-Hydrolyse-Assay

Dieser Versuch dient der Untersuchung charakteristischer Funktionseigenschaften von GTPasen. Zuerst „lädt“ man rekombinantes Rac1wt und Rac1b mit reversibel bindendem radioaktivem [$\gamma^{32}\text{P}$]-GTP. Rac1 liegt also als [$\gamma^{32}\text{P}$]-GTP-Rac1 vor. Durch Zugabe von MgCl₂

und Erhitzen der Probe wird die Hydrolyse, also die Spaltung von GTP unter H₂O-Aufnahme, initiiert. Es entsteht GDP-Rac1. Radioaktives [³²P] wird abgespalten und befindet sich frei in Lösung. Die jeweils verbliebene Menge an proteingebundenem [³²P]-GTP wird anschließend gemessen. Da es sich bei der Hydrolyse um eine Enzymreaktion handelt, muß nicht-radioaktives GTP im Überschuß vorhanden sein, damit die Ergebnisse nicht durch Nukleotidaustausch verfälscht werden.

Puffer und Lösungen:

Ladepuffer	20 mM Tris-HCl 0,1 mM DTT 25 mM NaCl 4 mM EDTA 0,16 mM MgCl ₂
Versuchspuffer	17 mM MgCl ₂ 20 mM Tris, pH 7,6 0,1 mM DTT 1 mg/ml BSA 10 µM GTP
Stoppuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,6 50 mM NaCl 5 mM MgCl ₂

Durchführung:

Das „Laden“ von jeweils 2,4 µg der rekombinanten Proteine Rac1wt und Rac1b erfolgte durch Zugabe von 30 µCi [³²P]-GTP und von Ladepuffer in einem Gesamtvolumen von 120 µl. Dieser als „Hotmix“ bezeichnete Ansatz wurde dann 10 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend auf Eis gestellt, um eine endogene Hydrolyse zu verhindern.

Nun wurden entsprechend viele silikonisierte Glasröhrchen mit je 33 µl Versuchspuffer (mit und ohne nicht-radioaktivem GTP) vorbereitet, um die GTP-Hydrolyse nach 0 min, 1 min, 1,5 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min und 20 min zu bestimmen. Für jeden Zeitpunkt wurde ein paralleler Doppelansatz durchgeführt. Außerdem wurden Negativ- und Nullproben durchgeführt, das heißt Ansätze ohne GTP und Ansätze ohne G-Protein. Der Versuch begann mit der Zugabe von je 3 µl der entsprechenden „geladenen“ Probe des G-Proteins in ein Röhrchen mit 33 µl Versuchspuffer. Es erfolgt nun die Inkubation des Röhrchens bei 30 °C für die entsprechenden angegebenen Zeiten. Mit 1 ml eiskaltem Stoppuffer wurde die Reaktion terminiert und das Röhrchen sofort auf Eis gestellt. Um die

Menge an radioaktivem GTP zu messen, das noch an das G-Protein gebunden ist, wird der Inhalt des gesamten Röhrchens auf eine vorher mit Aqua bidest. befeuchtete Nitrozellulosemembran (Protran[®] BA85; 0,45 µm, Ø 25 mm, Schleicher & Schüll, Dassel) gegeben, an welche ein Vakuum angelegt wird. Durch mehrere Waschschriffe mit Stoppuffer bleibt nur an Protein gebundene Radioaktivität auf der Membran fixiert, die unter einer Infrarotlampe getrocknet, in Szintillationslösung aufgelöst und deren Gehalt an Radioaktivität in einem automatischen [³²P]-Counter bestimmt wurde.

Ergebnisse

Sequenzanalyse von Rac1 im benignen und malignen Mammagewebe

In Zellkultorexperimenten zeigte sich die transformierende Eigenschaft einer konstitutiv aktiven Mutante von Rac1. Dies führte zu Spekulationen, daß in Analogie zu Ha-Ras auch Rac1 *in vivo* bei Brustkrebs mutiert ist (Anand-Apte et al., 1997; Keely et al., 1997; Khosravi-Far et al., 1998; Qiu et al., 1995). Unterstützt wurden diese Vermutungen zum einen durch die große Homologie in der Aminosäuresequenz von Ras und Rac1. Zum anderen war bereits gezeigt worden, daß Rac1 ebenso wie Ras zu einer Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionsweges führt (Coso et al., 1995) und die Aktivität der MAPK im Mammakarzinomgewebe erhöht ist (Sivaraman et al., 1997). Desweiteren wurde der Nachweis erbracht, daß eine erhöhte MAPK-Aktivität und MAPK-Expression maßgeblich zum invasiven Potential und zur Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen beitragen können (Brunet et al., 1996). In keiner Arbeit wurde jedoch nach Mutationen im Rac1-Gen beim Mammakarzinom gesucht.

Um oben genannte Vermutungen zu verifizieren bzw. zu widerlegen, wurde eine Mutationsanalyse von Rac1 an zehn malignen und sieben benignen Mammageweben durchgeführt (Tabelle 1A, S. 61). Aus Gewebe, das in flüssigem Stickstoff gelagert wurde, wurde zunächst Gesamt-RNA extrahiert und diese in cDNA revers transkribiert. In einer genspezifischen PCR wurde die cDNA amplifiziert und das PCR-Produkt anschließend in ein Plasmid subkloniert. Von jeder Patientin wurden mindestens sechs Klone analysiert, sequenziert und mit Hilfe des Winsconsin-Programm GCG (Version 9.0) mit der Rac1wt-Sequenz aus der Datenbank verglichen. Der Nachweis von Rac1wt gelang in jeder der Proben. Das Risiko einer Kontamination mit genomischer DNA wurde durch einen DNaseI-Verdau vor der Reversen Transkription reduziert. Versuchsreihen ohne DNase-Verdau lieferten den Nachweis von Verunreinigungen mit genomischer DNA.

Im Rahmen der Mutationsanalyse wurden bei dem Kollektiv aus 17 Patientinnen ca. 150 Sequenzierungen durchgeführt. Zusammengefaßt konnte keine einzige wiederkehrende Mutation im benignen oder malignen Mammagewebe nachgewiesen werden. Es konnten aber 17 verschiedene Punktmutationen definiert werden (Tabelle 1A, S. 61). Abbildung 7 (S. 64) zeigt die Nukleotidsequenz von Rac1wt (A) und einen untersuchten Klon, der eine Punktmutation aufweist (B). Mittels Computeranalyse wurden sowohl die Nukleotid- als auch die Aminosäuresequenzen einander gegenübergestellt (Abbildung 8 und 9, S. 65-69). Alle beschriebenen Rac1-Mutationen wurden in drei von fünf normalen Geweben, in einem von zwei Fibroadenomgeweben und in sechs von zehn Mammakarzinomgeweben nachgewiesen.

Tabelle 1A

Pat. ID	Alter Jahre	Histologie	Grading	Nodalstatus	ER	PR	Rezidiv	Nukleotid-austausch	Änderung der AS-Sequenz	Rac1b
1	24	normal	-	-	-	-	-	G→A bei 79 G→A bei 277 T→C bei 278	Ala→Thr bei 27 Val→Ile bei 93 Val→Ala bei 93	-
2	21	normal	-	-	-	-	-	C→T bei 85 A→G bei 389 T→C bei 513	Pro→Ser bei 29 Lys→Arg bei 130 Val→Ala bei 168	-
3	29	normal	-	-	-	-	-	keiner	-	+
4	32	normal	-	-	-	-	-	A→G bei 293 A→G bei 373	Tyr→Cys bei 98 Thr→Ala bei 125	+
5	24	normal	-	-	-	-	-	keiner	-	+
6	30	Fibro-adenom	-	-	-	-	-	keiner	-	+
7	46	Fibro-adenom	-	-	-	-	-	A→G bei 76 A→G bei 188	Asn→Asp bei 26 Asp→Gly bei 63	+
8	69	invasiv duktal	2	positiv	+	+	Nein	T→C bei 167 A→T bei 373	Trp→Arg bei 56 Thr→Ser bei 125	+
9	63	invasiv duktal	3	positiv	-	-	Nein	T→C bei 41 T→C bei 131	Val→Ala bei 14 Val→Ala bei 44	-
10	65	invasiv duktal	2	positiv	+	+	Nein	keiner	-	+
11	53	invasiv duktal	3	positiv	-	-	Nein	G→A bei 175	Ala→Thr bei 59	-
12	54	invasiv duktal	2	positiv	-	+	Nein	keiner	-	-
13	66	invasiv duktal	3	positiv	+	-	Ja	T→C bei 82	Leu→Phe bei 19	-
14	79	invasiv duktal	3	positiv	+	+	Ja	keiner	-	+
15	60	invasiv duktal	2	positiv	-	+	Ja	keiner	-	-
16	59	invasiv duktal	3	positiv	+	+	Ja	A→G bei 397 T→A bei 545	Lys→Glu bei 133 Val→Glu bei 182	+
17	58	invasiv duktal	2	positiv	-	+	Ja	C→T bei 323	Thr→Ile bei 108	+

Tabelle 1B

Karzinom-Zelllinie	Nukleotidtausch	Änderung der AS-Sequenz	Rac1b
MDA-231	C→T bei 538	Pro→Ser bei 180	-
ZR-75	G→T bei 161	Gly→Val bei 54	-
IDZ	T→G bei 278	Val→Gly bei 93	-

Tabelle 1 (Seite 61): **Klinische Daten des Patientenkollektivs und Rac1-Mutationsanalyse in Mammagewebe (A) und Karzinomzelllinien (B).** Aus Mammagewebe wurde RNA von 17 Patientinnen (5 Reduktionsplastiken, 2 Fibroadenome, 10 Mammakarzinome) extrahiert, ebenso aus 8 Mammakarzinomzelllinien. Die RNA wurde revers in cDNA transkribiert und in einer genspezifischen PCR für Rac1 vervielfältigt. Die Sequenzanalyse aus Mammagewebe erfolgte nach Subklonierung der Rac1-cDNA, bei den Zelllinien direkt aus cDNA. Mindestens 6 Einzelklone von jeder Patientin/Zelllinie wurde sequenziert. Neben den oben aufgeführten Punktmutationen zeigten alle Klone auch die Rac1-wt Sequenz. Die Angabe der Mutationen erfolgt nach der Konvention von Beaudet und Tsui (Beaudet et al., 1993).

Tumor Grading: 1 = hoch differenziert, 2 = mittel differenziert, 3 = niedrig differenziert; ER Östrogenrezeptor; PR Progesteronrezeptor. Histologie: invasiv-duktral = invasiv duktales Mammakarzinom. Der Hormonstatus wurde immunhistochemisch bestimmt.

Tabelle 2A

Pat. ID	Alter Jahre	Histologie	Van Nuys Gruppe
18	74	MaCa in situ	2
19	61	MaCa in situ	2
20	66	MaCa in situ	1
21	68	MaCa in situ	1
22	56	MaCa in situ	3
23	70	MaCa in situ	2
24	56	MaCa in situ	3
25	48	MaCa in situ	1
26	40	MaCa in situ	2
27	69	MaCa in situ	3

Tabelle 2B

Pat. ID	LK code	Alter Jahre	Histologie	Grading	Nodal-status	ER	PR	Rezidiv
28	N28	73	invasiv duktal	3	positiv	+	+	Nein
29	N29	41	invasiv duktal	2	positiv	-	+	Nein
30	N30	66	invasiv duktal	3	positiv	+	+	Nein
31	N31	33	invasiv duktal	2	positiv	-	-	Nein
32	N32	49	invasiv duktal	3	positiv	+	+	Nein
33	N33	33	invasiv duktal	2	positiv	-	-	Ja
34	N34	57	invasiv duktal	3	positiv	-	-	Ja
35	N35	63	invasiv duktal	2	positiv	-	-	Ja
36	N36	49	invasiv duktal	3	positiv	-	-	Ja
37	N37	49	invasiv duktal	3	positiv	-	+	Ja

Tabelle 2: **Klinische Daten des erweiterten Patientenkollektivs.** Die Durchführung der Mutationsanalyse, der Western-, Southern- und Northern-Blots erfolgte an dem Kollektiv in Tabelle 1A und 1B. Für die immunhistochemischen Färbungen wurde das Kollektiv um die Gewebeproben aus Tabelle 2A und 2B erweitert. Tumor Grading: 1 = hoch differenziert, 2 = mittel differenziert, 3 = niedrig differenziert; ER Östrogenrezeptor; PR Progesteronrezeptor. Histologie: invasiv-duktral = invasiv duktales Mammakarzinom. MaCa in situ = In situ Mammakarzinom. Der Hormonstatus wurde immunhistochemisch bestimmt. Die Angabe Rezidiv bezieht sich auf den Beobachtungszeitraum.

Die Lokalisation der Punktmutationen und die Beziehung zu den Funktionsdomänen ist aus Abbildung 10 (S. 70) und aus Tabelle 1A (S.61) ersichtlich. Es zeigte sich, daß diese Mutationen sowohl bei Karzinompatientinnen mit Rezidiv als auch bei solchen ohne Rezidiv auftraten. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Rac1-Mutationen und der Expression des Östrogen- oder Progesteronrezeptors bzw. dem Tumorigradung konnte nicht festgestellt werden. Das Verteilungsmuster legt den Schluß nahe, daß es sich hierbei am ehesten um Polymorphismen im Rac1-Gen im Mammagewebe handelt. Unter einem DNA-Polymorphismus versteht man das Auftreten unterschiedlicher Basensequenzen auf allen Loci in einer größeren Häufigkeit als dies alleine durch Mutationen zu erwarten wäre. In der Praxis gilt ein genetischer Locus als polymorph, wenn das seltenste Allel in einer Häufigkeit von mindestens 1 % vorkommt. Lediglich drei der in dieser Studie entdeckten Mutationen waren in mehr als einem Gewebe zu finden. Jede dieser Mutationen wurde an die SNP-Datenbank (single nucleotide polymorphism) des NCBI (National Center for Biotechnology Information) übermittelt und für jedermann über das Internet frei zugänglich gemacht. Über die Namen "Lengyel/Schnelzer" sind die Polymorphismen unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> jederzeit abrufbar (Tab. 3).

Tabelle 3A

Submitter Handle	Submitter Local SNP ID	NCBI Assay ID
Lengyel/Schnelzer	17916-1	7317
Lengyel/Schnelzer	17916-2	7318
Lengyel/Schnelzer	17916-3	7319
Lengyel/Schnelzer	17984-1	7320
Lengyel/Schnelzer	17984-2	7321
Lengyel/Schnelzer	18088-1	7322
Lengyel/Schnelzer	18088-2	7323
Lengyel/Schnelzer	24397-1	7324
Lengyel/Schnelzer	24397-2	7325
Lengyel/Schnelzer	18310-2	7326
Lengyel/Schnelzer	23223	7327
Lengyel/Schnelzer	24077-1	7328
Lengyel/Schnelzer	24077-2	7329
Lengyel/Schnelzer	24265-1	7330
Lengyel/Schnelzer	24265-2	7331
Lengyel/Schnelzer	24440	7332
Lengyel/Schnelzer	24725	7333

Tabelle 3B

Submitter Handle	Submitter Local SNP ID	NCBI Assay ID
Lengyel/Schnelzer	BCCL-1	18484
Lengyel/Schnelzer	BCCL-2	18485
Lengyel/Schnelzer	BCCL-3	18486

Tabelle 3 (S. 63): **SNP (Single Nucleotide Polymorphism)-Internet-Datenbankauszug:** In Tabelle 3A sind die Links für die gefundenen Punktmutationen im Mammagewebe aufgeführt. Tabelle 3B zeigt die drei verzeichneten Punktmutationen bei den untersuchten Mammakarzinomzelllinien. BCCL-1=MDA-231; BCCL-2=ZR75; BCCL-3=IDZ (Submitter-Handle = Name der Einsender; Submitter Local SNP ID = Bezeichnung der Einsendung durch den Einsender; NCBI Assay ID=Kennung, die vom NCBI vergeben wird)

Die beschriebene Mutationsanalyse wurde um acht Mammakarzinomzelllinien erweitert. Lediglich in den Zelllinien MDA-231, ZR-75 und IDZ zeigten sich Mutationen, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führten. Bei der IDZ-Zelllinie fiel bei Kodon 93 an einer Stelle eine Mutation auf, an der auch bei einer Mammareduktionsplastik mit benignem Gewebe zwei Punktmutationen zu finden waren. Diese Daten wurden ebenfalls an die SNP-Datenbank übermittelt (Tabelle 3B, S. 63). Keine der gefundenen Mutationen, die in benignem oder malignem Mammagewebe gefunden wurden, waren in der Literatur vorher beschrieben worden. Es konnte keine der für in vitro-Untersuchungen an Zelllinien verwendeten konstitutiv aktiven Rac1-Varianten im Mammagewebe nachgewiesen werden (Khosravi-Far et al., 1995; Qiu et al., 1995; Anand-Apte et al., 1997; Keely et al., 1997).

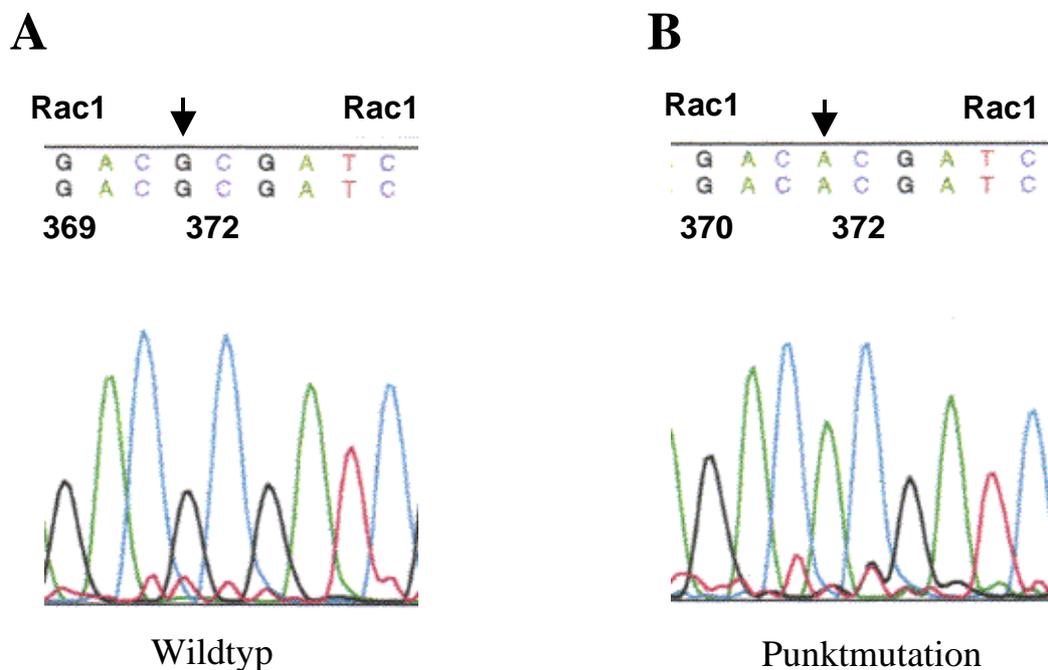


Abbildung 7: **Sequenziermuster zweier Klone aus dem selben Mammagewebe.** Ein Klon (A) zeigt die Rac1wt-Sequenz, während der andere (B) eine Punktmutation bei Nucleotid 373 (siehe Pfeil) aufweist. Hier findet sich anstelle eines Guanosenrestes ein Adenosinrest. Dies führt zu einer Änderung der Aminosäuresequenz von Threonin zu Alanin.



Data Collection

File: 24*9.5 - RAC1-5'
 Sample: 9.5 - RAC1-5'
 Comment:
 Lane Number: 24
 Channel Number: 122
 Number of Scans: 9688
 Length: 634
 Run started at: 2/4/1998, 09:43
 Run stopped at: 2/4/1998, 14:15
 Gel: Gel File
 Dyeset/Primer: DT {BD Set Any-Primer}
 Comb:
 Instrument Name: 377 # 10000057
 Collect Vers.: 2.1

Data Analysis

Base Call Start: 1420
 Base Call End: 9688
 Primer Peak Loc.: 1378
 Signal: G (403), A (396), T (219), C (478)
 Matrix Name: drhod
 Channels Ave.: 3
 Analysis Vers.: Version 3.0
 Base Spacing: 12.78 - ABI200

1	GTGGGAGAG GAGCTGTAGG TAAAACTTGC CTACTGATCA GTTACACAAC CAATGCATTT CCTGGAGAAT ATATCCCTAC TGTCTTTGAC AATTATTTCTG CCAATGTTAT	110
111	GGTAGATGGA AAACCGGTGA ATCTGGGCTT ATGGGATACA GCTGGACAAG AAGATTATGA CAGATTACGC CCCCTATCCT ATCCGCAAC AGTTGGAGAA ACGTACGGTA	220
221	AGGATATAAC CTCCCGGGC AAAGACAAGC CGATTGCGGA TGTGTCITTA AHTTGTCTTTT CCTTTTGTGAG TCCCTGCATCA TTTCGAAATG TCCGTGCAAA GTGGTATCCT	330
331	GAGGTGGGC ACCACTGCC CAACACTGCC ATCAUCCTAG TGGGAACATA ACTTGTATCTT AGGGATGATA AAGACACGAT CGAGAAACTG AAGGAGAAGA AGCTGACTCC	440
441	CAATACCTAT CCGCAGGGIC TAGCCATGCC TAAGGAGATT GGTCTGTGTA AATPACCTGGA GTGCTCGGGC CTACACAGC GAGGCTCAA GACAGTGTIT GACGAGCGA	550
551	TCCGAGCAGT CCTCTGCCG CCTCCCGTGA AGAAGAGAA GAGAAAATGC CTGCTGTGTGT AAAAGGGCGA ATTCCAGCAC AC	660

Feature key: Range(s):

B

TRANSLATE of: plasmid1101 check: 1726 from: 1 to: 675
generated symbols 1 to: 225.
plasmid1101

to: rac1-s.pep check: 7938 from: 1 to: 192

TRANSLATE of: rac1-s check: 3856 from: 1 to: 578
generated symbols 1 to: 192.
RL;HSRACA - Human ras-related C3 botulinum toxin substrate (rac) mRNA,
complete
ID HSRACA standard; RNA; HUM; 579 BP.
XX . . .

Symbol comparison table:
/osfapp/gcgadm/gcg910/gcgcore/data/rundata/blosum62.cmp
CompCheck: 6430

Gap Weight: 12 Average Match: 2.912
Length Weight: 4 Average Mismatch: -2.003
GAP of: plasmid1101.pep check: 9136 from: 1 to: 225

Quality: 972 Length: 233
Ratio: 5.063 Gaps: 0
Percent Similarity: 99.457 Percent Identity: 99.457

Match display thresholds for the alignment(s):
| = IDENTITY
: = 2
. = 1

plasmid1101.pep x rac1-s.pep April 8, 1998 21:38 ..

```

      . . . . .
1  .....VGDGAVGKTCLLLISYTTNAFFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKP 42 KLON 11.1
      |||
1  MQAIKCVVVGDGAVGKTCLLLISYTTNAFFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKP 50 Rac1wt
      . . . . .
43 VNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQTDVFLICFSLVSPASFENVRAKWYPE 92
      |||
51 VNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQTDVFLICFSLVSPASFENVRAKWYPE 100
      . . . . .
93 VRHHCNTPIILVGTKLDRDDKDAIEKLKEKLTPTITYPQGLAMAKEIG 142
      |||
101 VRHHCNTPIILVGTKLDRDDKDTIEKLKEKLTPTITYPQGLAMAKEIG 150
      . . . . .
143 AVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRAVLCPPPVKRKRKCLLL*KGEFQHT 192
      |||
151 AVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRAVLCPPPVKRKRKCLLL..... 192
```

Abbildung 9: **Originalausdrucke aus einem Nukleotidvergleich (A)** einer Sequenz aus Mammagewebe (Klon 11.1, obere Reihe) mit der Rac1wt-Sequenz (untere Reihe). (GCG, Wisconsin Package 9.0). Es handelt sich um eine Punktmutation an Nukleotidposition 373, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führt (B). Aus Threonin wird Alanin (T→A) an der Aminosäureposition 125.

Rac1 weist unterschiedliche Funktionsbereiche auf, die unterschiedliche Aufgaben besitzen. Die Position der gefundenen Punktmutationen ist somit abhängig von ihrer Lage zu diesen Domänen zu beurteilen. Während die Effector-Domäne für die Bindung von p67phox und somit für die Aktivierung der NADPH-Oxidase **und** von PAK (p21 aktivierte Kinase) verantwortlich ist, wird durch Interaktion mit der Insert-Region nur die NADPH-Oxidase-Funktion beeinflusst. Die Funktion der Switch II-Region ist für den Austausch von GDP durch GTP und somit für die Aktivierung der GTPase Rac1 essentiell. Das basische C-terminale Ende von Rac1, die Polybasische Region, ist verantwortlich für die Membranbindungsfähigkeit von Rac1 und stellt einen wesentlichen Unterschied zu anderen Rac-Isoformen dar, die weniger basisch sind (Abb. 10).

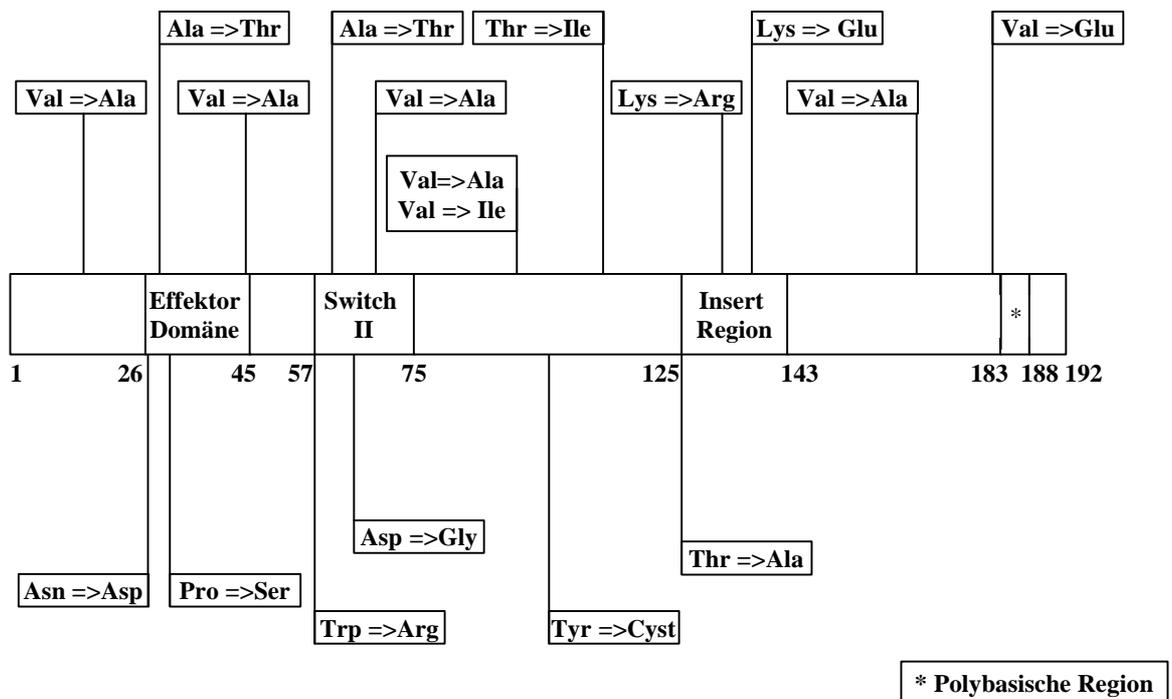


Abbildung 10: Zusammenfassung der Mutationen, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen und deren Zuordnung zu den funktionellen Rac1-Domänen.

Aufgaben der Funktionsbereiche von Rac1:

Effector-Domäne: Bindung/Aktivierung von NADPH-Oxidase und von PAK (p21 aktivierte Kinase)

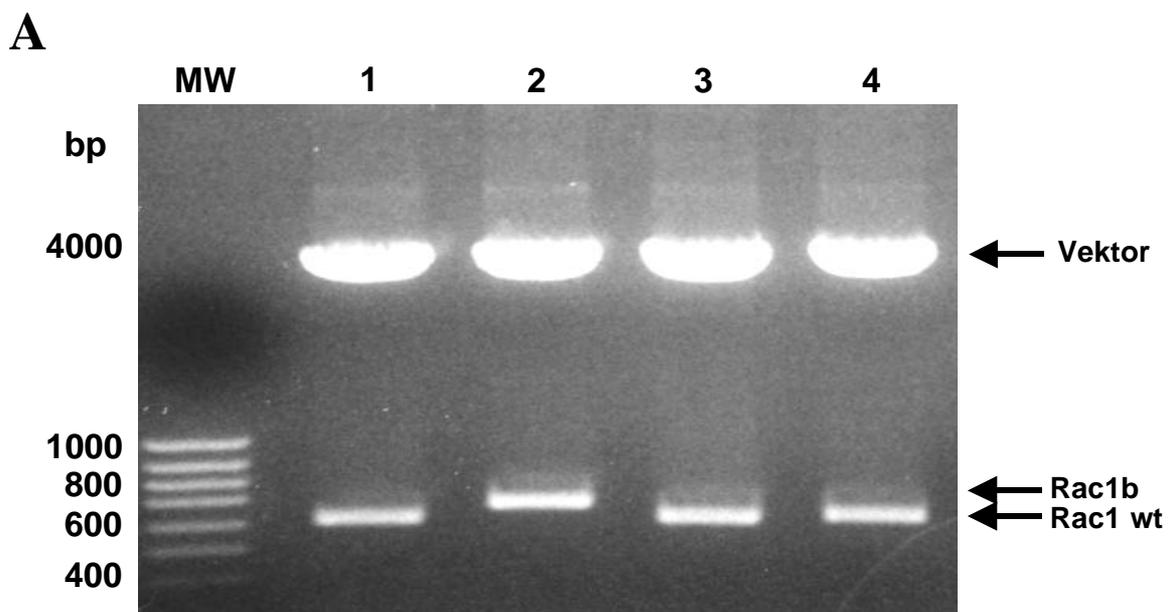
Switch II : Austausch von GDP durch GTP

Insert-Region : Aktivierung der NADPH-Oxidase

Polybasische Region: Membranbindung von Rac

Differenzierung der amplifizierten Rac1-PCR-Produkte

Zur weiteren Qualitätskontrolle der Reinheit des PCR-Produktes wurde im Rahmen der durchgeführten Mutationsanalyse, die insgesamt ca. 150 Sequenzierungen umfaßte, nach der Rac1-spezifischen PCR ein Agarosegel angefertigt. Bei einigen Geweben zeigten sich zwei nahe aneinanderliegende Banden im Gel, so daß beide Banden aus dem Gel exzidiert, die DNA extrahiert, subkloniert und die aufgereinigte DNA eines einzelnen Klons anschließend erneut über ein Agarosegel aufgetrennt wurde. Die Abb. 11A zeigt eine Bande bei etwa 580 kB (Abb. 11A, S. 71, Bahn 1, 3, 4) bzw. eine einem etwas größeren Produkt entsprechende Bande (Abb. 11A, Bahn 2). Dieser Klon wurde sequenziert, und es zeigte sich eine Rac1-Sequenz, die sich von der Rac1-wt-cDNA durch einen zusätzlichen Abschnitt von 57 Nukleotiden zwischen Nukleotidposition 225 und 226 unterscheidet (Abb. 11B, S. 72). Das Ergebnis dieser Sequenzierung wurde durch wiederholte Sequenzierungen sowohl dieses als auch anderer Klone, die im Agarosegel ein entsprechendes Laufverhalten zeigten und aus anderen Geweben stammten, bestätigt. Die Position dieses zusätzlichen Nukleotidabschnittes liegt nahe der Switch-II-Region von Rac1wt (Didsbury et al., 1989; NCBI Accession Number M29870) und verschiebt den Leserahmen für die Proteinexpression nicht (Abb. 11C, S. 72). Diese neue Form von Rac1 konnte in fünf benignen und fünf malignen Mammageweben des Kollektivs nachgewiesen werden (Tabelle 1A, S. 61), und zeigte in der Insertsequenz keine Mutation. Die neue Gesamtsequenz wurde als Rac1b bezeichnet.



B Nukleotidvergleich

```

151 GGACAAGAAGATTATGACAGATTACGCCCCCTATCCTATCCGCAAACAGT 200 Rac1b
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
178 ggacaagaagattatgacagattacgccccctatcctatccgcaaaca.. 225 Rac1wt

201 TGGAGAAACGTACGGTAAGGATATAACCTCCCGGGGCAAAGACAAGCCGA 250
--- .....
251 TTGCCGATGTGTTCTTAATTTGCTTTTCCCTTGTGAGTCCTGCATCATT 300
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
226 .....gatgtggtcctaatttgcttttcccttgtgagtcctgcatcattt 371

```

C Aminosäurevergleich

```

1 MQAIKCVVV
1 GDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTA 50
  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
10 GDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTA 59
51 GQEDYDRLRPLSYPQTVGETYGKDITSRGKDKPIADVFLICFSLVSPASF 100 Rac1b
  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
60 GQEDYDRLRPLSYPQT.....DVFLICFSLVSPASF 90 Rac1wt
101 ENVRAKWYPEVRHHCNPNTPIILVGTKLDLRDDKDTIEKLKEKKLTPITYP 150
  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
91 ENVRAKWYPEVRHHCNPNTPIILVGTKLDLRDDKDTIEKLKEKKLTPITYP 140
151 QGLAMAKEIGAVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRAVLCPVPVKKRKRKCL 200
  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
141 QGLAMAKEIGAVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRAVLCPVPVKKRKRKCL 190

201 LL 202
   ||
191 LL 192

```

Abbildung 12: Sequenzierung des neuen Inserts in der Rac1-Sequenz. Das Sequenziermuster eines Klon aus Mammagewebe zeigt einen bisher noch nicht beschriebenen Sequenzabschnitt (A). Die Gegenüberstellung der Nukleotidsequenzen aus Mammagewebe (B) (obere Reihe, Großbuchstaben) mit der Rac1wt-Sequenz (untere Reihe, Kleinbuchstaben). (GCG, Wisconsin Package 9.0) zeigt ein 57 bp langes Insert, das in der Rac1wt-Sequenz nicht vorhanden ist. Beim Vergleich der Aminosäuresequenz (C) wird ein 19 AS langes Insert deutlich, das im Leserahmen der Rac1wt-Sequenz liegt. Die Sequenz des hier sequenzierten Klon fängt aufgrund der Wahl der Sequenzierprimer erst bei Nukleotid Nr. 30 bzw. Aminosäure Nr. 10 an.

Um auszuschließen, daß in der durchgeführten PCR durch eine Kontamination genomische Rac1 DNA amplifiziert wurde, erfolgte eine Isolierung von mRNA aus einem Gewebe, das sowohl Rac1 als auch Rac1b exprimierte. Mittels einer Säule, die mit Thymidin gekoppelt ist, separierte man RNA, die einen poly-A-Rest aufweist. Die extrahierte mRNA wurde revers transkribiert und die erhaltene cDNA in einer PCR amplifiziert. Nach Auftrennung des PCR-Produktes über ein Agarose-Gel zeigten sich erneut zwei eng aneinanderliegende, einzelne Banden (Abb. 13, Bahn 1). Die Banden wurden separat mit einem Skalpell ausgeschnitten und in den TOPO-TA-Vektor subkloniert. Die anschließende Sequenzanalyse der Plasmid-DNA bestätigte, daß es sich bei der unteren Bande um Rac1wt und bei der oberen Bande um Rac1b handelt (Abb. 13, Bahn 2, 3). Es zeigte sich demnach, daß sich sowohl bei Extraktion von Gesamt-RNA als auch von mRNA ein identischer Abschnitt von 57 bp in der Rac1 Sequenz nachweisen ließ. Dies zeigt, daß Rac1b im Mammagewebe transkribiert wird.

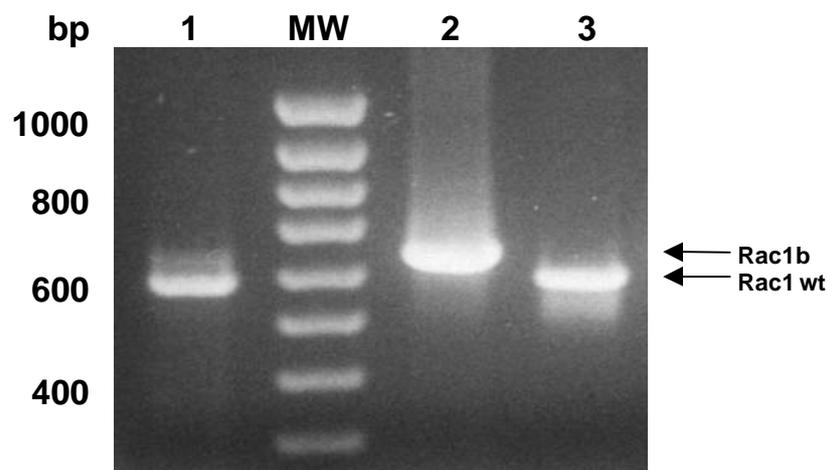


Abbildung 13: **Nachweis von Rac1b aus mRNA.** Es wurde Gesamt-RNA aus einem Mammakarzinom extrahiert, die enthaltene mRNA über oligo-dT-Affinitätssäulen gereinigt, in cDNA revers transkribiert und mit Rac1-spezifischen Primern amplifiziert (Bahn 1). Nach Subklonierung des PCR-Produktes mit anschließender Transformation wurden die beiden Klone (Bahn 2, 3) über ein 1,5 % Agarose-Gel aufgetrennt und sequenziert. Die Klone in Bahn 2 und 3 entsprechen nach der Sequenzierung den Sequenzen von Rac1b bzw. Rac1wt.

Anhand einer ausführlichen Recherche in den großen Nukleotiddatenbanken EMBL und GenBank konnte nachgewiesen werden, daß die neu entdeckte Rac1b Sequenz weder in voller Länge noch abschnittsweise bisher beschrieben worden war (Stand der Information: 09/98). Lediglich die „Human Expressed Sequence Tag“ (EST)-Datenbank zeigte eine Sequenz, die 95 % Homologie zur Aminosäuresequenz von Rac1b besitzt, in der sich jedoch

das identische Insert befindet, das auch das entscheidende Merkmal von Rac1b ist. Unter der Zugangsnummer AA526312 erhält man Zugriff auf eine Sequenz, die aus einer cDNA-Bibliothek einer mikrodisezierten intraepithelialen Neoplasie der Prostata stammt (Krizman et al., 1996). Diese Untersuchungen erfolgten im Rahmen des Cancer Genome Anatomy Project. Auf eine weitergehende Charakterisierung wurde jedoch damals verzichtet.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Sequenz von Rac1b wurde an GenBank übermittelt und am 21. März 1999 vom NCBI für die Öffentlichkeit unter der "accession number" AF136373 zur Verfügung gestellt.

Rac1b wird nicht nur im Mammagewebe exprimiert

Da Rac1b im Mammagewebe entdeckt wurde, ist von großem Interesse, ob die Insertsequenz auch in anderen Geweben nachweisbar oder die Expression auf Mammagewebe beschränkt ist. Zu diesem Zweck wurde RNA aus Gewebe einer endoskopischen Knipsbiopsie der Magenschleimhaut revers transkribiert und in eine für Rac1b spezifische PCR eingesetzt. Hierzu wurde der bekannte Rac1wt 5'-Primer verwendet und ein neuer 3'-Primer, der genau in der Rac1b-cDNA-Sequenz liegt. Nach Subklonierung und Sequenzierung der amplifizierten Sequenz zeigte sich, daß Rac1b auch in normaler Magenschleimhaut zu finden ist (ohne Abbildung). Während sich Rac1b in der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 (Bacher et al., 1992) nachweisen ließ, konnte die Sequenz in keiner von sieben Mammakarzinomzelllinien identifiziert werden.

GTP/GDP-Austausch und Hydrolyse von Rac1 und Rac1b

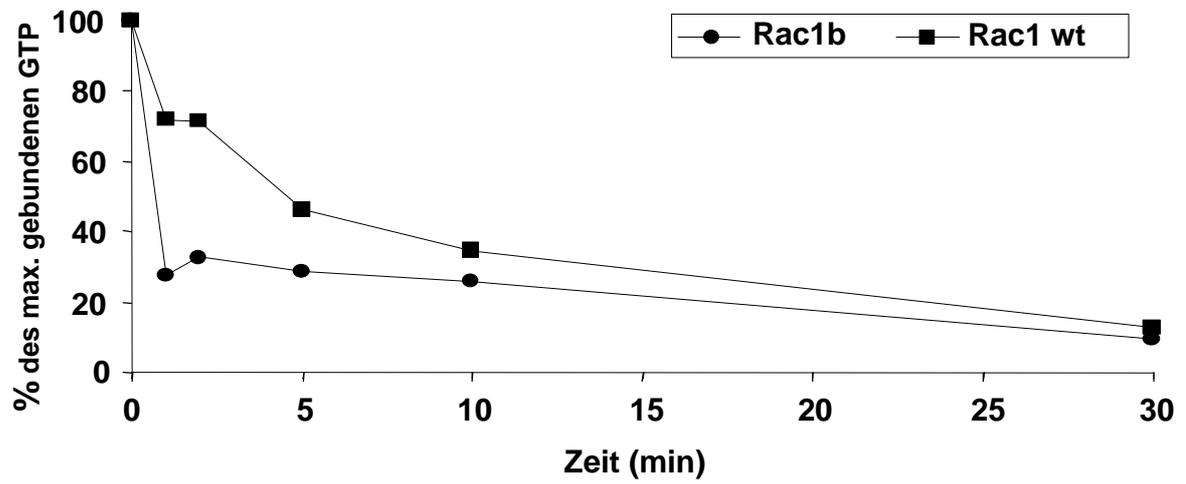
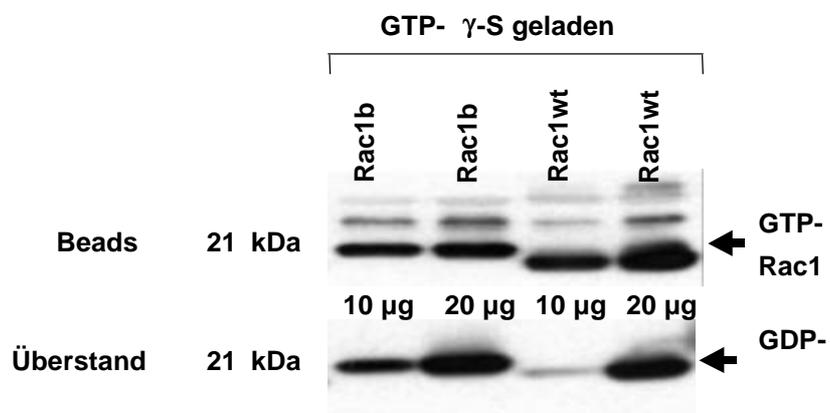
GTPasen wie Rac1 können zelluläre Funktionen nur beeinflussen, wenn es ihnen gelingt, von der GDP-gebundenen Form in eine GTP-gebundene aktive Form zu wechseln. Der Nachweis der GTP-Bindungsfähigkeit stellt somit eine grundsätzliche Voraussetzung für die Klassifizierung von Rac1b als GTPase dar. Aus diesem Grund wurde die Bedeutung des Insertbereiches von Rac1b für die GTP-Bindungsfähigkeit und die GTPase-Aktivität untersucht und mit den Eigenschaften von Rac1wt verglichen. Hierfür wurde die cDNA von Rac1wt und Rac1b in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-2T kloniert. Die Expression erfolgte in *E. coli* als Fusionsprotein mit einem GST-Anteil. Nach Auftrennung über ein Polyacrylamidgel und Färbung mit Coomassie Blue zeigte sich eine Reinheit der Proteinpräparation von über 95 % (Abb. 14A, S. 76).

Die GTP/GDP-Austauschrate wurde mit [³⁵S]GTPγS und den bereits erwähnten rekombinant hergestellten Proteinen (Abb. 14A, S. 76) bestimmt. Rac1wt und Rac1b wurden mit [³⁵S]GTPγS “geladen“ und der Nukleotidaustausch durch Zugabe von Puffer mit nicht-radioaktivem GTPγS, das im Überschuß zugegeben wurde, gestartet. Nach einem bestimmten Zeitplan wurde zu den in der Abbildung 14B (S. 77) angegebenen Zeiten die Reaktion abgestoppt die Menge an verbliebenem, proteingebundenem [³⁵S]GTPγS bestimmt. Proteine haben die Eigenschaft, an Nitrozellulose zu binden. Als Maß für das gebundene Protein bestimmt man die Menge an Radioaktivität auf der Nitrozellulosemembran (Chuang et al., 1994). Die Abb. 14B zeigt, daß bei Rac1b das gebundene radioaktive GTPγS schneller ausgetauscht wird als bei Rac1wt. Dies bedeutet, daß die intrinsische GTPase-Aktivität von Rac1b höher ist, als diejenige von Rac1wt. Bezüglich der [³⁵S]GTPγS-Bindungseigenschaften fiel weiter auf, daß Rac1b während des Ladevorganges zeitabhängig eine schnellere Nukleotidbindungsrate zeigte als das Rac1wt-Protein (ohne Abbildung).

Eine weitere nicht radioaktive Methode bestätigte die GTP-Bindungsfähigkeit von Rac1 und Rac1b. Das Protein PAK1, das in der Signaltransduktionskaskade distal von Rac1 liegt, bindet nur an GTP-gebundenes Rac1. Für die Rac1-Bindung ist die Proteinbindungsdomäne (PBD) von PAK1 entscheidend. Diese wurde als GST-Fusionsprotein rekombinant hergestellt und in einem sogenannten „pull-down assay“ mit rekombinantem Rac1 bzw. Rac1b, die vorher mit nicht-radioaktivem GTPγS geladen wurden, inkubiert. Anschließend wurde der Komplex aus GST-PBD und GTP-Rac vom restlichen Überstand getrennt und mit diesen beiden Fraktionen jeweils ein Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen Rac1 durchgeführt. Aus Abb. 14C (S. 77) wird deutlich, daß nach Beladung durch GTPγS sowohl Rac1wt als auch Rac1b an die PAK1-PBD bindet. Rac1b kann also mit GTP eine Bindung mit der Proteinbindungsdomäne (PBD) von PAK1 eingehen.

A



B**C**

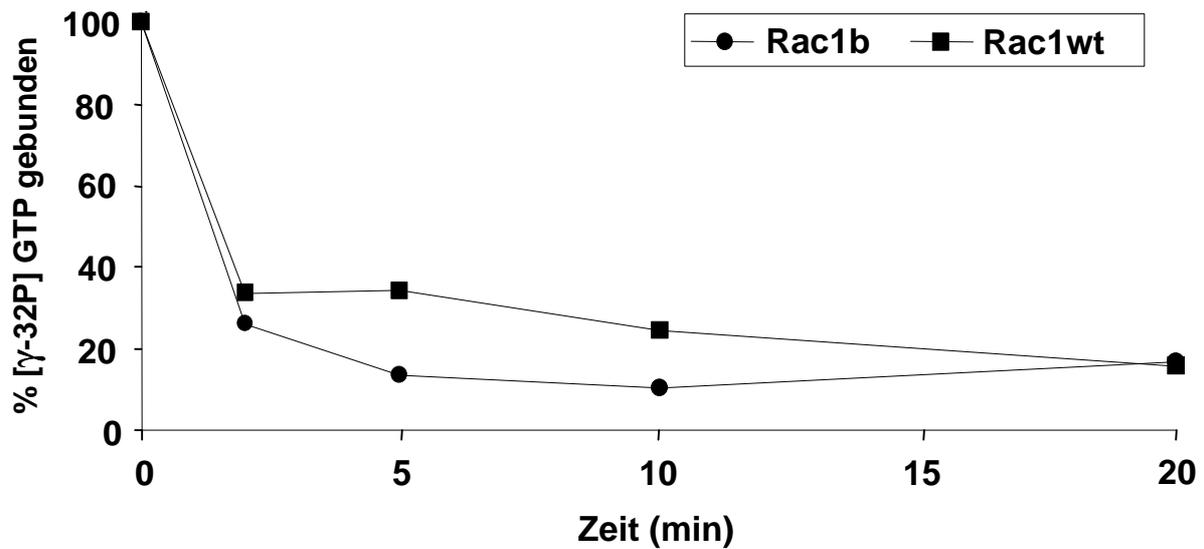
D

Abbildung 14: **Rac1b ist eine funktionsfähige GTPase.** Rekombinantes Rac1 und Rac1b wurde in *E.coli* exprimiert und im SDS-PAGE aufgetrennt (A). Kinetik des GDP/GTP-Nukleotidaustauschs nach dem Beladen von Rac1 und Rac1b mit [³⁵S]GTPγS (B). Der Nukleotidaustausch wurde durch Zugabe von Puffer mit oder ohne nicht-radioaktivem GTPγS und Protein-gebundenes [³⁵S]GTPγS zu den angegebenen Zeiten untersucht. Die Werte sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. 300 μg Lysat aus 2 verschiedenen Mammagewebe wurden mit nicht-radioaktivem GTPγS geladen (d. h. aktiv gemacht) und mit der Proteinbindungsdomäne von Rac1 (GST-PBD) und Sepharose inkubiert (C). Die beads und der Überstand wurden jeweils in einem 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Im oberen Teil von C, ist aktives GTP-Rac1 abgebildet, im unteren Teil inaktives GDP-Rac1. Bestimmung der GTPase-Aktivität von Rac1 und Rac1b, nachdem die GTPasen mit [³²P]GTP geladen und die Hydrolyserate zu den angegebenen Zeiten gemessen wurde (D). Die Werte sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten.

Für die Funktion von Rac1b als G-Protein ist jedoch auch die intrinsische GTP-Hydrolyse-Rate von Interesse. Um diese zu bestimmen, wurden die rekombinant hergestellten Proteine Rac1wt und Rac1b mit [³²P]GTP geladen. Die Hydrolyse von [³²P]GTP-Rac1 zu GDP-Rac1 + [³²P] bzw. von [³²P]GTP-Rac1b zu GDP-Rac1b + [³²P] wurde durch Zugabe von MgCl₂ und Erhitzen der Probe initiiert. Nicht-radioaktives GTP wurde im Überschuss zugegeben, um den GTP/GDP-Austausch vernachlässigen zu können. Die Reaktion wurde zu den angegebenen Zeiten gestoppt. Anschließend wurde Protein-gebundenes [³²P]GTP und freies [³²P]GTP und [³²P] durch Nitrozellulosefiltration voneinander getrennt. Wie oben beschrieben binden die Rac-Proteine an die Nitrozellulose, und die gebundene Radioaktivität

wird gemessen. Aus der Abbildung 14D geht hervor, daß sich die intrinsische GTP-Hydrolyserate von Rac1b nur geringfügig von der von Rac1wt unterscheidet.

Diese Ergebnisse (Abb. 14 B, C, D) zeigen, daß Rac1b die Eigenschaften eines voll funktionsfähigen GTP-bindenden Proteins besitzt.

Überexpression von Rac1-Protein beim Mammakarzinom

In der am Patientinnenkollektiv durchgeführten Mutationsanalyse zeigten sich keine Mutationen, die für eine konstitutive Aktivierung von Rac1 im Mammagewebe sprechen, wie sie z.B. für Ras beschrieben wurden (Bos et al., 1989). Trotzdem existieren noch andere Regulationsmöglichkeiten eines Proteins. Es war also nicht mit Sicherheit auszuschließen, ob Rac1 definitiv keine Rolle beim Mammakarzinom spielt, da auch nicht-mutiertes Rac1 eine Gewebetransformation bedingen könnte. Dies führte zu der Frage, wie Rac1 reguliert wird und ob Unterschiede in der Rac1-Proteinexpression im benignen und malignen Mammagewebe feststellbar sind. Zu diesem Zweck wurde von den Geweben des Patientinnenkollektivs Western Blots durchgeführt. Noch während der Operation der Patientinnen wurde nach Sicherung der Diagnose durch eine Schnellschnittuntersuchung vom Pathologen ein Stück des Tumorgewebes entnommen, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und für Folgeexperimente gelagert. Das restliche Gewebe wurde mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet und für die histologische Diagnostik bzw. immunhistochemische Färbungen verwendet.

Die in flüssigem Stickstoff gefrorenen Gewebstücke wurden für die Western Blot Experimente in einem gekühlten Keramikmörser fein zerrieben und die Proteine mit einem Detergens extrahiert. Zur Detektion der Proteine wurde ein monoklonaler anti-Rac1-Antikörper verwendet (Abb. 15A, S. 80). Die Western Blots wurden mit dem Scanpack III-Programm (Fa. Biometra, Göttingen) eingescannt und mit Hilfe eines densitometrischen Verfahrens ausgewertet und die Proteinexpression quantifiziert. Es zeigte sich bei allen „normalen“ Mammageweben und bei den beiden Fibroadenomen ein insgesamt schwächeres Signal als bei den Mammakarzinomen, obwohl von jedem Gewebe gleiche Mengen an Protein eingesetzt wurden. Bei Patientinnen mit Mammakarzinom lag die Rac1-Proteinexpression im Durchschnitt um den Faktor 2,7 höher ($p < 0,05$) als bei den benignen Vergleichsgeweben (Abb. 15B, S. 80). Trotz signifikanter Unterschiede im Patientinnenkollektiv hinsichtlich Rezidivfreiheit und postoperativem Überleben, ließ sich keine Korrelation zur Prognose ableiten. Die Durchführung des Western Blots mit einem

polyklonalen Antikörper gegen Rac1 (Quinn et al, 1993) bestätigte die Daten (ohne Abbildung).

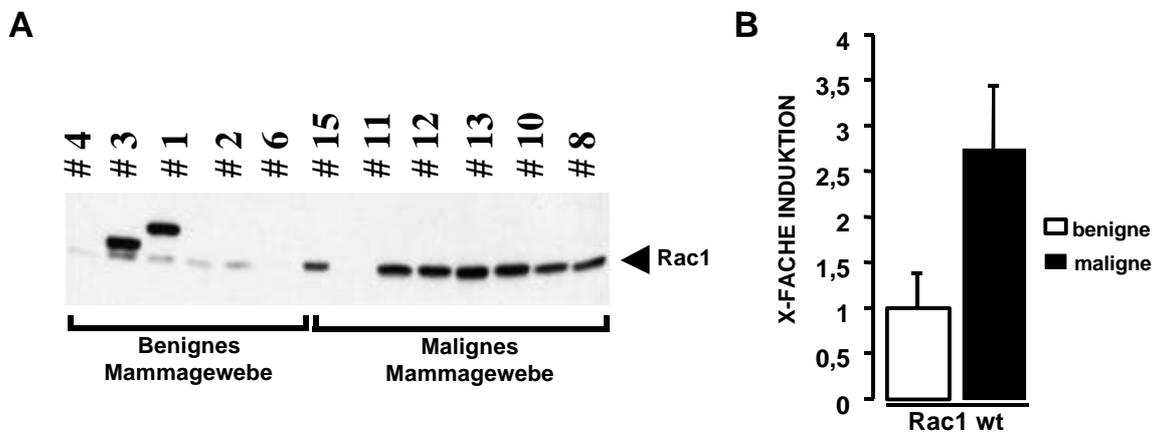


Abbildung 15: **Rac1-Protein ist im Mammakarzinom höher exprimiert als im benignen Mammagewebe.** Western Blot (A). Mammagewebe wurde mit Triton X-100 extrahiert und bezüglich gleicher Proteinmengen normalisiert (200 µg) und im 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose, wurde der Filter mit einem monoklonalen Rac1-Antikörper inkubiert. Die Proteine wurden mit ECL visualisiert. Die Expression von Rac1 von 7 gutartigen Mammageweben und 10 bösartigen Mammakarzinomen wurde im Western Blot bestimmt (wie in A) und die Rac1-Expression durch Scannen quantifiziert (B). Die Induktion von Rac1 im Mammakarzinom wird verglichen mit Rac1 im normalen Gewebe. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichungen aller untersuchten Gewebe.

Nachweis von Rac1b im Western-Blot

Im Rahmen der Western-Blot Experimente zur Rac1-Expression im Mammagewebe konnte zuerst lediglich Rac1wt, nicht jedoch Rac1b detektiert werden. Aus diesem Grund erfolgte zum einen eine längere Exposition der Röntgenfilme mit den Western Blots, zum anderen wurde gleichzeitig mehr Proteinextrakt (400 µg) von Mammageweben eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden HeLa-Zellen, die sich leicht transfizieren lassen, transient mit Rac1wt und Rac1b transfiziert. Die Zellen wurden anschließend lysiert, auf Protein standardisiert und gleiche Mengen Protein auf eine 8% SDS-PAGE geladen. Nach Inkubation der Blots mit einem monoklonalen Antikörper gegen Rac1 zeigte sich, daß der verwendete Antikörper auch Rac1b detektiert (Abb. 16A/B, S. 81). Weiter lieferten die neuen Western Blots den Beweis, daß sich, wenn auch in geringeren Mengen als Rac1wt, auch Rac1b-Protein in denjenigen Gewebeproben befindet, in denen auch Rac1b-RNA nachgewiesen werden konnte (Abb. 16A/B, S. 81).

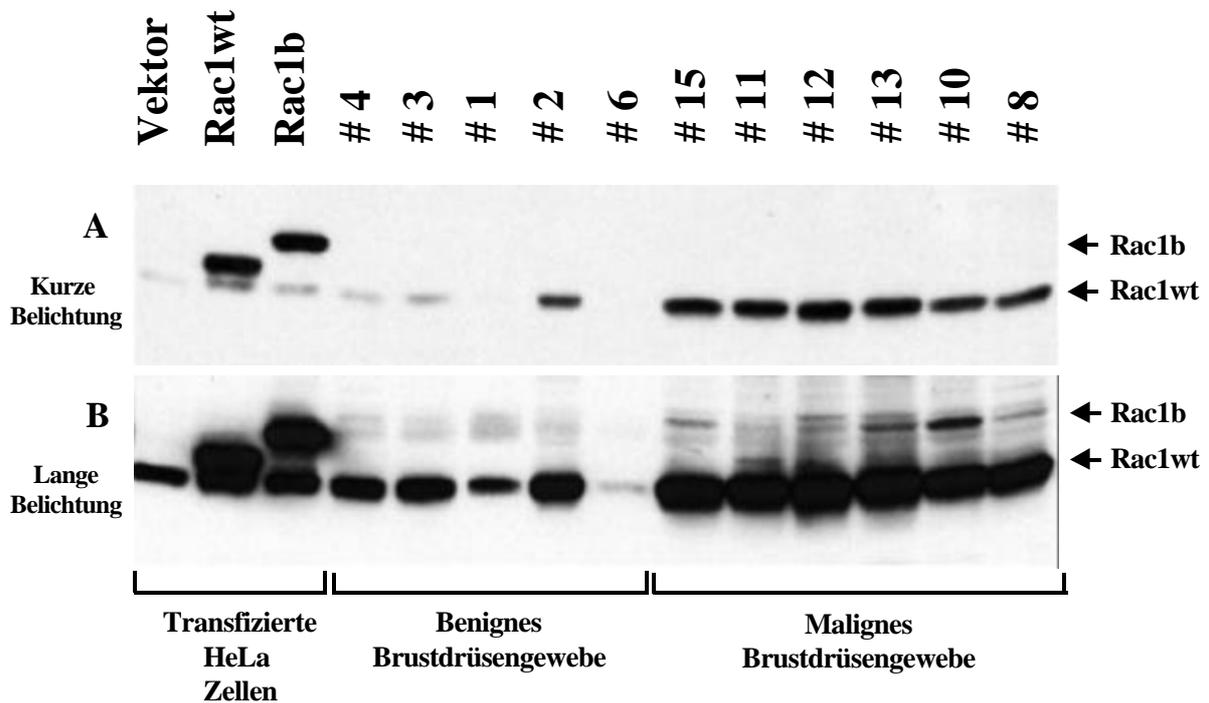


Abbildung 16: **Nachweis von Rac1b im Mammagewebe.** Western Blot aus HeLa-Extrakten, die mit pRK5-Rac1-wt, pRK5-Rac1b oder pRK5-Vektor transfiziert wurden. Das Rac1-Protein ist etwas größer als endogenes Rac1 aus HeLa-Zellen, da der Vektor ein myc-tag enthält, das mit dem Rac1-Protein in allen drei HeLa-Extrakten koexprimiert wird. Western Blot von Mammageweben mit 150 µg Protein und kurzer Belichtungszeit (A) und 400 µg Protein und langer Belichtungszeit (B). In Abbildung A und B wurden die Proteinlysate in der 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf Nitrozellulose wurde der Filter mit einem Rac1-Antikörper inkubiert. Vom Antikörper detektiertes Protein wurde mit ECL sichtbar gemacht.

Überexpression von Rac1-RNA beim Mammakarzinom

Die Rac1-Proteinexpression zeigte im Western Blot signifikante Unterschiede zwischen benignem und malignem Mammagewebe. Dies führte zur Frage, ob die Regulation dieser differentiellen Expression auf RNA-Ebene stattfindet. In einem Northern Blot wurde dieser Frage nachgegangen. Die hierfür notwendige Gesamt-RNA wurde ebenfalls aus einem in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Stück des selben Gewebes extrahiert, aus dem auch das Protein für den Western Blot gewonnen wurde. Der Northern Blot wurde wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt und die Nitrozellulosemembran mit einer für Rac1 spezifischen cDNA hybridisiert (Didsbury et al., 1989). Nach einer Autoradiographie erkennt man bei 16 von 17 Gewebeprobe 2 separate, klare Banden; eine Bande befindet sich bei 2,4 kB und eine Bande bei 1,1 kB (Abb. 17). Lediglich in einer Probe ließ sich nur abgebaute

RNA nachweisen. Zum Zwecke der Vergleichbarkeit der RNA-Expression wurde eine Normalisierung der Proben auf 18S-rRNA durchgeführt. Betrachtet man die 1,1 kb Bande, so war die durchschnittliche Rac1-RNA-Expression im malignen Mammagewebe doppelt so hoch wie in den benignen Gewebeproben. Zieht man die 2,4 kb Bande zum Vergleich heran, so zeigt sich lediglich eine um den Faktor 1,4 höhere Rac1-RNA Expression gegenüber gesundem Mammagewebe. Dies bedeutet, daß die im Western Blot gefundene hohe Rac1-Antigenexpression nur zum Teil durch eine erhöhte Bildung von Rac1-RNA bedingt ist und andere Gründe als Ursache gesucht werden müssen.

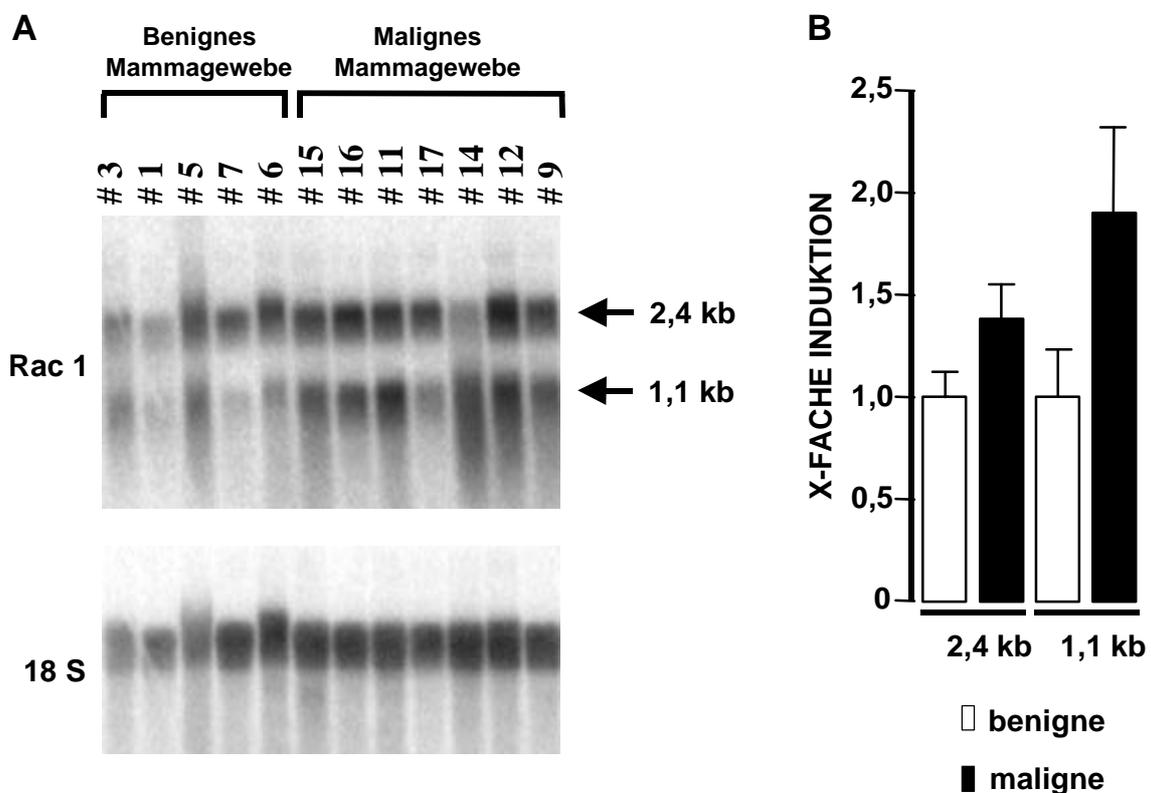


Abbildung 17: Rac1-RNA wird im malignen Mammagewebe höher exprimiert als in benignem Gewebe. Die RNA-Extraktion erfolgte aus Mammagewebe. Nach Auftrennung in einem 1 % Formaldehyd-Agarose-Gel wurde die RNA anschließend auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert (A). Es erfolgte nacheinander die Inkubation der Membran mit cDNA, die spezifisch an Rac1- und 18S-rRNA-Transkripte bindet. Die Quantifizierung der Radioaktivität wurde mit einem Phosphor-Imager durchgeführt (B). Die angegebenen Daten stellen Mittelwerte aller Patientinnen mit Standardabweichungen dar.

Mammakarzinome zeigen normalen Rac1-DNA-Gehalt

Ein Gen kann auch durch Amplifikation reguliert werden wie z.B. das ERBB-2-Gen. Dieses Gen kodiert für c-ErbB-2 (auch als Her2/neu bezeichnet), ein Protein, das einen inkompletten Rezeptor für Epidermal Growth Factors (EGF) darstellt und in einem Viertel der

Mammakarzinome (Gullick et al., 1990) und Ovarialkarzinome (Fajac et al., 1995) amplifiziert ist. Um genauer zu untersuchen, ob Rac1 amplifiziert ist, wurde ein Southern Blot von Gewebeproben des Kollektivs durchgeführt. Es handelt sich um eine quantitative Messmethode der Genamplifikation mittels DNA-DNA-Hybridisierung mit Hilfe einer radioaktiv markierten Sonde. Für diese Untersuchung wurde ebenfalls ein in flüssigem Stickstoff gefrorenes Gewebstück verwendet, aus dem mit Hilfe einer klassischen Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Alkohol-Fällung genomische DNA gewonnen wurde. Nach Durchführung des Southern Blots erfolgte die Hybridisierung mit einer für Rac1 spezifischen cDNA. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels eines Phosphor Imager 445SI von Molecular Dynamics (Sunnyvale, USA). Unter Berücksichtigung einer gewissen Variationsbreite der Werte im Southern Blot erkennt man in Abb. 18, daß alle untersuchten Gewebeproben eine ähnliche Anzahl von DNA-Kopien aufweisen und kein Hinweis für eine Gen-Amplifikation vorliegt. Dies wurde nach Quantifizierung mit dem Phosphor-Imager bestätigt (ohne Abbildung). Diese Ergebnisse erlauben die Schlußfolgerung, daß es weder in den benignen noch in den malignen Mammagewebe zu einer Amplifikation des Rac1-Gens kommt.

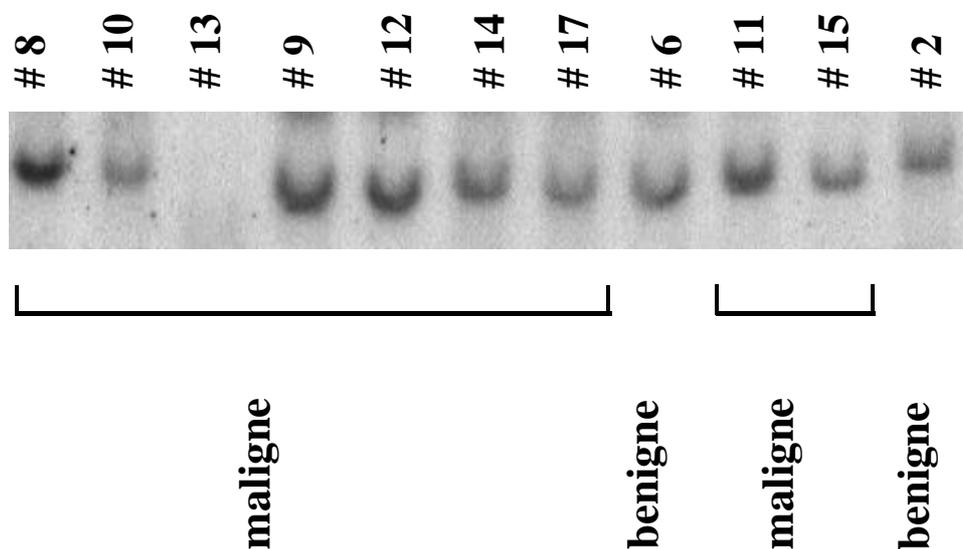


Abbildung. 18: **Southern Blot: Die Rac1-DNA-Expression unterscheidet sich in benignem und malignem Mammagewebe nicht.** DNA wurde aus Mammagewebe extrahiert, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit einer cDNA inkubiert, die ein Fragment aus Rac1 darstellt und somit spezifisch und komplementär an Rac1 bindet. Radioaktivität wurde mit einem Phosphor-Imager quantifiziert.

Rac1 wird in proliferativem Mammagewebe und im Mammakarzinom überexprimiert

Die Ergebnisse aus den vorher durchgeführten Western und Northern Blots zeigten eindeutig an dem Kollektiv aus 17 Patientinnen, daß Rac1 im Mammakarzinom sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine höhere Expression aufweist als in normalem Brustdrüsengewebe. Anhand der bisher angewendeten Methoden kann man jedoch keine Aussage darüber treffen, von welchem Zelltyp das Rac1 Protein exprimiert wird. Um dieser Frage nachzugehen, und um die bisher gewonnenen Aussagen zu bestätigen und den Stellenwert von Rac1 im Zusammenhang mit maligner Transformation genauer zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen gegen Rac1 an einem auf 37 Patientinnen erweiterten Kollektiv durchgeführt. Die Anzahl von Fällen invasiver Mammakarzinome wurde um 10 Patientinnen erweitert, bei denen auch korrespondierende Lymphknotenmetastasen verfügbar waren, die ebenfalls in die Studie einbezogen wurden (siehe Tabelle 2B, S. 62). Zusätzlich dehnte die Aufnahme von 10 duktalem Carcinomata in situ (DCIS) das Kollektiv auf den Bereich prämaligener Mammatumoren aus (siehe Tabelle 2A, S. 62). Beim DCIS handelt es sich um ein Karzinom, das die Milchgänge vollkommen oder teilweise mit einem breiten atypischen Epithel ausfüllt, das jedoch die Basalmembran noch nicht durchbrochen hat.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach der Avidin-Biotin-Methode durchgeführt. Als Primärantikörper kam ein monoklonaler (kommerzieller) anti-Rac1-Antikörper zum Einsatz. Es fiel auf, daß es bei normalem Brustdrüsengewebe (Abb. 19A offener Pfeil, S. 84) zu einer schwachen Anfärbbarkeit des Epithels kommt, während Myoepithelzellen von Drüsenausführungsgängen keine Immunreaktion aufwiesen. Meist zeigte sich in den Mammareduktionsplastiken gesunder Frauen unauffälliges Brustdrüsengewebe. Es ließen sich jedoch auch Bereiche mit mastopathisch verändertem Gewebe und in einem Fall sogar eine Papillomatose nachweisen. Hierbei handelt es sich um eine benigne epitheliale Hyperplasie der Ductuszellen. Die Papillome kommen meist bei fibrös-zystischer Mastopathie vor, können aber auch isoliert auftreten. Bei der Papillomatose, dem multiplen Auftreten von Papillomen, muß jedoch wahrscheinlich von einem erhöhten Entartungsrisiko ausgegangen werden. Bei den benignen proliferativen Erkrankungen wie der Mastopathie und der Papillomatose (Abb. 19A geschlossener Pfeil, S. 85) war die Rac1-Expression stets stärker ausgeprägt als in normalem, unauffälligem Mammagewebe. Diese verstärkte Expression ließ sich auch in 60-100 % der Tumorzellen der 10 duktalem Carcinomata in situ (DCIS) nachweisen (Abb. 19B, S. 85). Alle 20 primären Mammakarzinome zeigten ebenfalls eine intensive, granuläre Braunfärbung. Das

Färbeverhalten einzelner Abschnitte im Mammakarzinomgewebe war teilweise sehr heterogen. Im Unterschied dazu wies das umliegende normale Brustdrüsengewebe keine oder nur eine signifikant schwächere Färbung auf. Sowohl bei den Mammakarzinomen (Abb. 19C und E) als auch bei den jeweils korrespondierenden Lymphknotenmetastasen (Abb. 19D und F) ließen sich mindestens 50 % der Tumorzellen positiv anfärben.

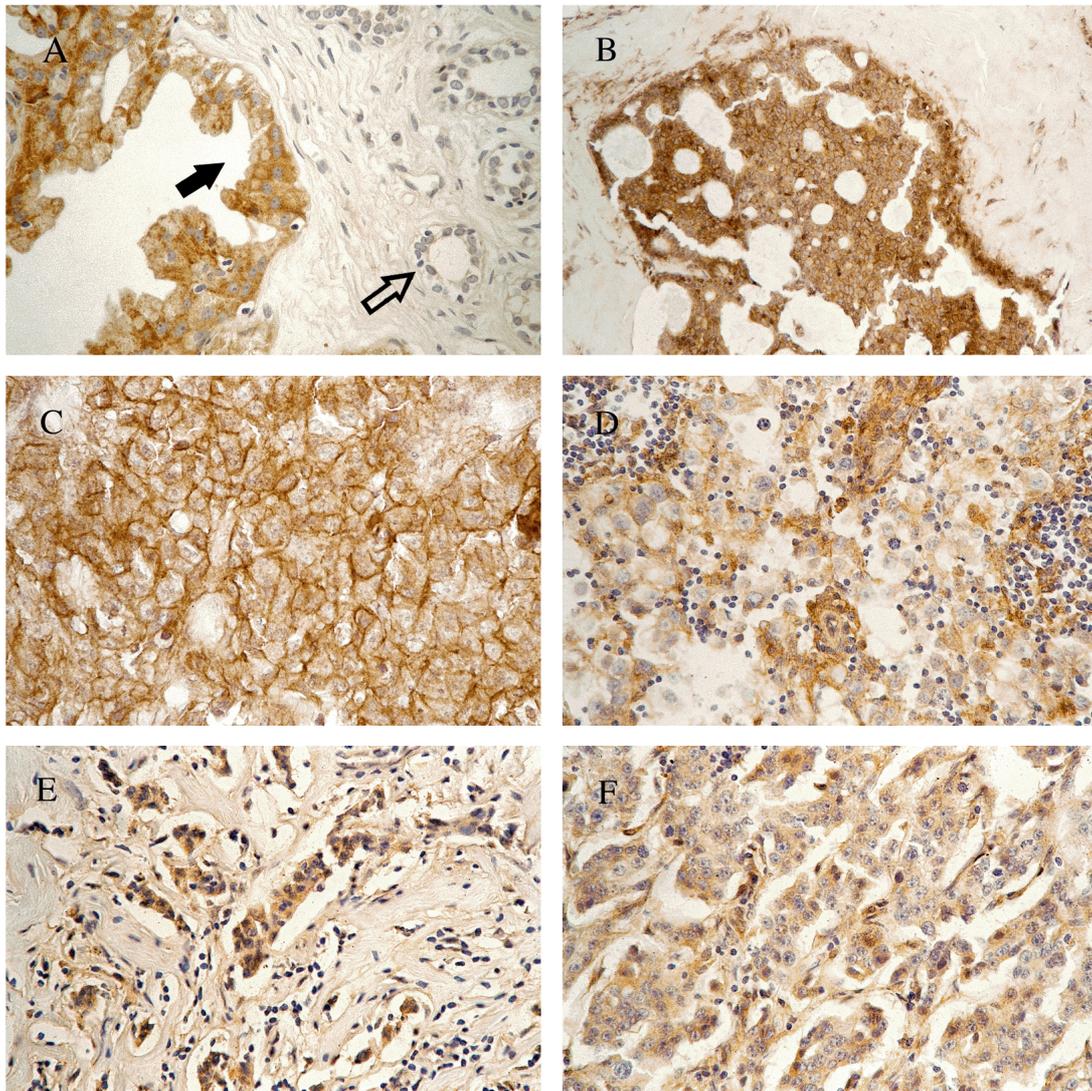


Abbildung 19: **Immunhistochemischer Nachweis der Lokalisation von Rac1 in Brustdrüsengewebe.** Die Gewebsschnitte wurden mit einem monoklonalen Rac1-Antikörper inkubiert. Die Anfärbung erfolgte mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Technik. Eine Braunfärbung zeigt eine positive Reaktion. (A) Die Fibrozystische Mastopathie mit epithelialer Hyperplasie (geschlossener Pfeil) zeigt eine starke Rac1-Färbung, während sich hingegen normale Drüsenendstücke (offener Pfeil) nur schwach anfärben lassen, (1:200). (B) Färbeverhalten eines duktales Carcinoma in situ der Brust, (1:100). (C) Invasiv duktales Mammakarzinom, (1:400) und (D) dazugehöriger Lymphknoten, bei dem sich sowohl das Zytoplasma als auch die Zellmembran mit dem Rac1-Antikörper anfärben lassen, (1:200). (E) Invasiv duktales Mammakarzinom, (1:200) und (F) der dazugehörige Lymphknoten, bei dem sich lediglich das Zytoplasma anfärben läßt, (1:200).

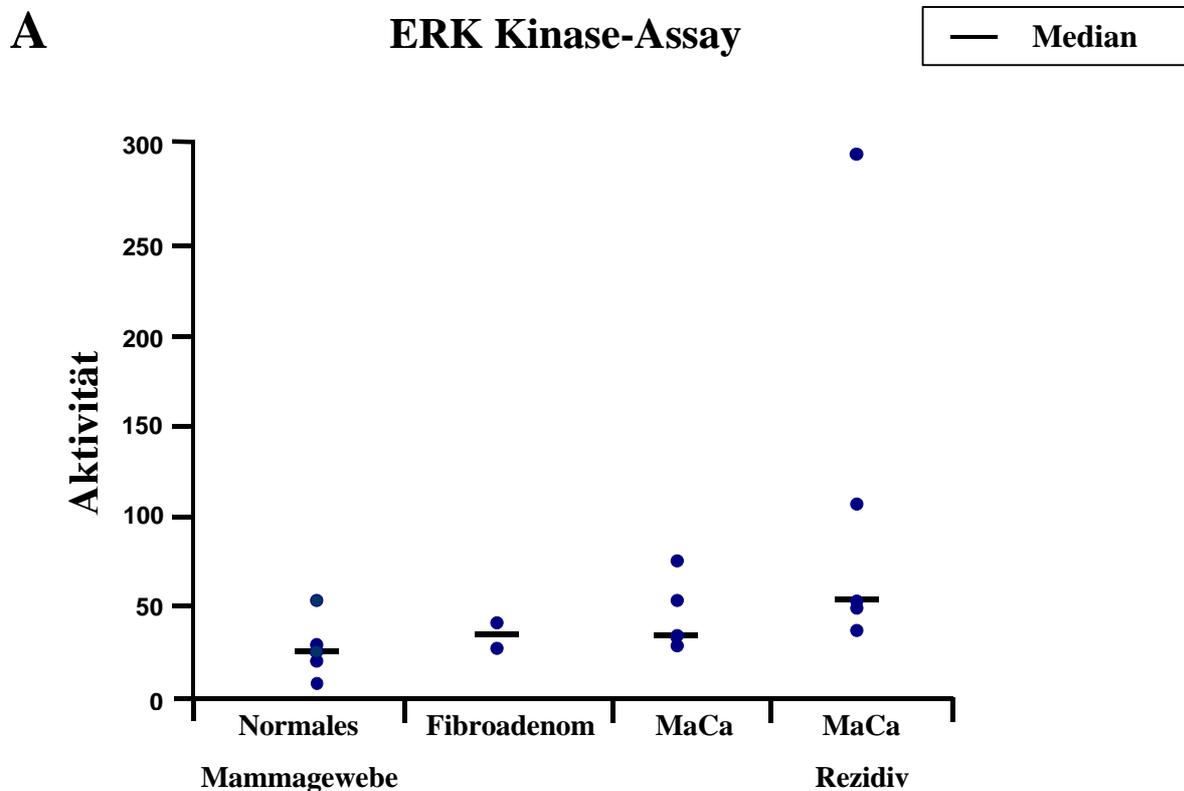
Nach Maßgabe einer semiquantitativen Auswertung der Intensität der Immunreaktion ließ sich kein Unterschied in der Färbeintensität zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase erkennen (Abb. 19C bis F, S. 85).

Auffällig war jedoch, daß die Mammakarzinome eine deutlich stärkere Rac1 Expression zeigten als die normalen oder benigne veränderten Mammagewebe. Ebenso konnten in den Mammakarzinomen und den untersuchten Lymphknotenmetastasen zwei gänzlich verschiedene Färbemuster beobachtet werden: Entweder zeigten die Schnitte eine zytoplasmatische Färbung zusammen mit einer starken Membranfärbung (Abb. 19 C und D, S. 85), oder es ließ sich lediglich eine Färbung des Zytoplasmas ohne Membranreaktion nachweisen (vgl. Abb. 19 E und F, S. 85). Weder in normalem noch in proliferativ verändertem Mammagewebe ließ sich eine derartige Membranfärbung darstellen. Dieses Ergebnis paßt gut zu Zellkulturexperimenten mit transformierten Zellen, die zeigen, daß Rac1 nach Aktivierung an die Zellmembran transloziert (Fleming et al., 1996). Dies weist darauf hin, daß ein Teil von Rac1 in den untersuchten Tumorzellen in Form von GTP-Rac1 aktiv ist. Es fiel auf, daß die beobachtete starke Membranfärbung und somit der Nachweis eines aktivierten Rac1 fast ausschließlich bei Patientinnen mit Mammakarzinom zu finden war. Betrachtet man das rezidiv-freie Überleben dieser Patientinnen, so betrug die durchschnittliche rezidiv-freie Zeit nach der Primärbehandlung bei Patientinnen mit starker Anfärbbarkeit der Plasmamembran 35 Monate im Unterschied zu 69 Monaten bei Patientinnen ohne Anfärbbarkeit der Membran.

Als Kontrolle wurden die immunhistochemischen Färbungen mit einem polyklonalen Antikörper (Quinn et al., 1993) gegen Rac1 wiederholt. Hier zeigte sich in allen untersuchten Geweben die gleiche Rac1-Expression wie bei Verwendung des angegebenen monoklonalen Antikörpers. Um die Spezifität der Antikörper zu überprüfen, wurden beide Antikörper vor Zugabe zu den Gewebsschnitten mit rekombinantem Rac1 präabsorbiert. Die anschließend durchgeführten Färbungen zeigten kein signifikantes Signal (ohne Abbildung).

Regulation der MAPKinasen durch Rac1-Expression

Welche Konsequenzen ergeben sich nun aus der erhöhten Rac1-Expression? Von großem Interesse in diesem Zusammenhang ist der Einfluß auf die Aktivität der MAPKinasen. Man hätte eigentlich erwartet, daß die Überexpression eines Rho-Proteins wie Rac1 zu einer Aktivierung des JNK- und p38-Signaltransduktionsweges führt. In unseren Experimenten zeigte sich jedoch, daß sich lediglich die ERK-Aktivität signifikant in benignem und malignem Mammagewebe unterschied ($p=0,028$) (Abb. 20A). Zwar zeichnete sich auch bei der Aktivität der JNK- und p38-Kinase tendenziell eine Zunahme der Aktivität bei den Mammakarzinomen ab, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 20B und C, S. 88). Für eine repräsentative Aussage müßte man die Untersuchungen an einem größeren Kollektiv wiederholen, da in der vorliegenden Arbeit die Streubreite der Einzelwerte zu groß war. Die erhöhte Rac1-Expression im Mammakarzinom führt demnach nach unseren Daten nicht zu einer Stimulierung des JNK- und p38-Signaltransduktionsweges. Der Mechanismus der Aktivierung des ERK-Signalweges durch Rac1 ist noch ungeklärt.



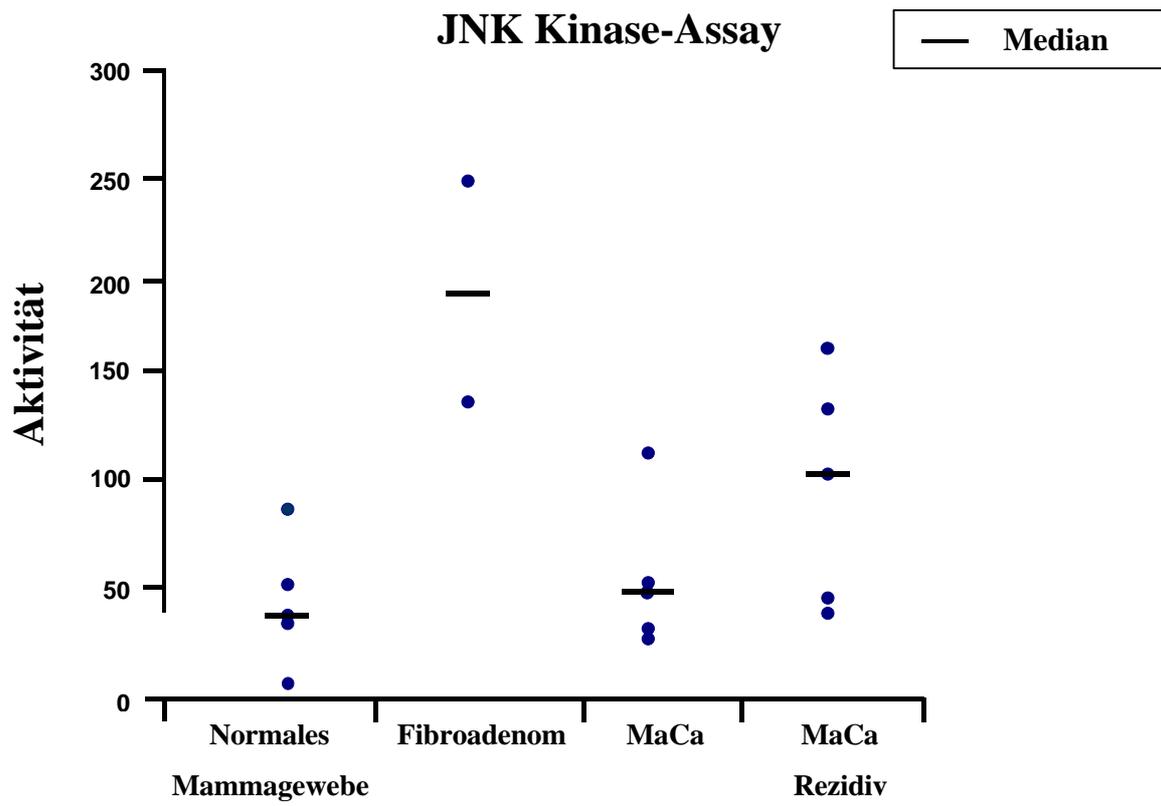
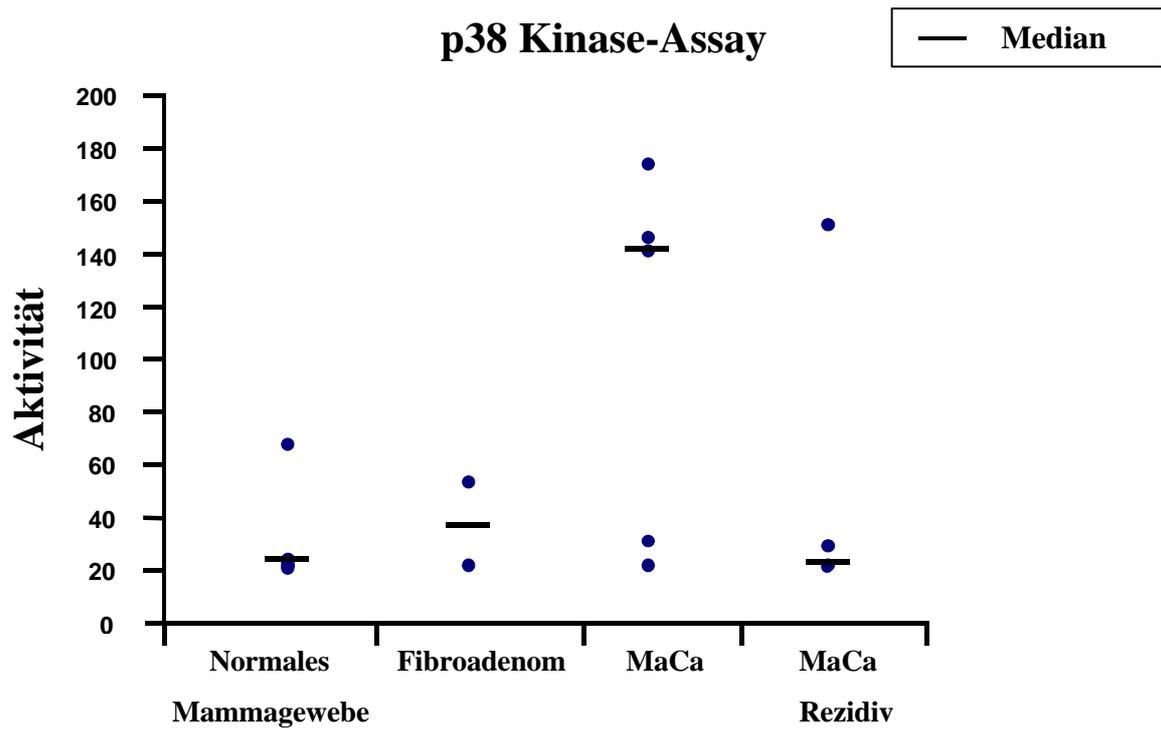
B**C**

Abbildung 20: Aktivität der Kinasen ERK (A), JNK (B) und p38 (C) im Mammagewebe zum Zeitpunkt der Entnahme aus dem Patienten. Nach Immunopräzipitation der jeweiligen MAPKinase mit dem entsprechenden Antikörper (anti-ERK1, anti-JNK1, anti-p38) und Zugabe eines kinasespezifischen Substrates (MBP bei ERK; GST-cJun (AS 3-121) bei JNK; GST-ATF2 (AS 1-96) bei p38) wurde die Aktivität autoradiographisch bestimmt. Die angegebenen Aktivitätsniveaus beziehen sich auf Positivkontrollen stimulierter Ovarialkarzinomzelllinien, deren Aktivität gleich 100% gesetzt wurde. Statistische Signifikanz beim Vergleich des benignem mit malignem Mammagewebe liegt nur bei den Aktivitäten der ERK-Kinase vor ($p=0,028$).

Diskussion

Rac1 beim Mammakarzinom: Überexpression, Mutationsanalyse und Charakterisierung einer neuen Rac1-Isoform, Rac1b

Nahezu alle Arbeiten, die sich mit der Charakterisierung von Signaltransduktionswegen beschäftigen, basieren auf Zellkulturexperimenten. Aus diesem Grunde lassen sich nur eingeschränkte Aussagen darüber treffen, welche Bedeutung dem jeweiligen Signaltransduktionsweg *in vivo* zukommt. Zudem bleibt unklar, ob Erkenntnisse hinsichtlich der Eigenschaften von Zellen in einer Zellkulturschale, in künstlichem Nährmedium, Aufschluß darüber geben können, wie sich Tumorzellen im Mikromilieu eines Tumors *in vivo* verhalten. Dort befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Tumor z.B. zahlreiche Fibroblasten, Granulozyten und diverse andere Zelltypen, die durch Expression unterschiedlicher Proteine die Wachstumsbedingungen eines Tumors entscheidend beeinflussen können. Selbst der Analogieschluß vom Mausmodell zur Tumorerkrankung eines Menschen ist sehr gewagt. Injiziert man z.B. Mäusen humane Tumorzellen, so bekommt man unter Umständen durch unkontrollierbare Antigen-Antikörper-Reaktionen ein verzerrtes Ergebnis. Letztendlich können *in-vitro*-Erkenntnisse meist nicht analog auf die *in-vivo*-Situation übertragen werden. Im Idealfall sollten demnach die Erkenntnisse zur Tumorbilogie aus *in vivo*-Untersuchungen gewonnen werden. Die Signaltransduktion, die Informationsübermittlung von der Zelloberfläche zum Zellkern, ist jedoch ein dynamischer Prozeß. Wird der Tumor im Rahmen einer chirurgischen Operation aus dem Körper entfernt, so ergeben sich gerade hier Schwierigkeiten, an einem nicht mehr am Stoffwechsel teilnehmenden Gewebe dynamische Vorgänge zu untersuchen. Um dennoch *in-vivo*-Erkenntnisse über Signaltransduktionsproteine gewinnen zu können, versucht man, das Gewebe möglichst unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockzugefrieren, um zumindest eine Aussage über Funktion und Aktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt messen zu können. Alle in dieser Studie vorgestellten Untersuchungen basieren auf Gewebe, das auf diese Weise gewonnen wurde.

Werden verschiedene Proto-Onkogene durch Amplifikation, Mutation oder Proteininstabilität so verändert, daß sie onkogen werden, so kommt es zur malignen Transformation einer Zelle (Kinzler et al., 1996; Zhang et al., 1997). Rac1 und Ha-Ras spielen eine Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion (Hunter et al., 1997) und gehören beide zur Ras-Superfamilie der GTP-bindenden Proteine. Durch Mutationen in der GTP-Austauschdomäne des Onkogens Ha-Ras kommt es zu dessen konstitutiver Aktivierung

(Parada et al., 1982). Diese aktivierenden Mutationen ließen sich in unterschiedlichen Tumoren nachweisen (Bos et al., 1989). Im Falle von Brustkrebs weisen nur ca. 8 % der Mammakarzinome Mutationen von Ha-Ras auf (Spandidos et al., 1987), eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionsweges findet sich jedoch in über 50% aller Brustkrebsfälle (Sivaraman et al., 1997). Als Ursache hierfür muß also ein anderer Aktivator der MAPKinasen wirken. Denkbar wäre die Aktivierung durch ein anderes Mitglied der Ras-Superfamilie wie z.B. durch Rac1. Für andere Ras-GTPasen vom Rho-Typ konnte auch eine direkte transformierende Wirkung nachgewiesen werden. Es ist durchaus denkbar, daß diese G-Proteine im Mammakarzinom in einer mutierten Form vorliegen. Hier wird insbesondere der GTPase Rac1 eine besondere Rolle zugeschrieben. Die Charakterisierung der transformierenden Wirkung von Rac1 (Anand-Apte et al., 1997; Keely et al., 1997; Qiu et al., 1995) ist in Zellkulturexperimenten mit z.B. NIH3T3-Zellen unter Erstellung von konstitutiv-aktiven Mutanten untersucht worden. Die Zellkultur bietet hierbei den Vorteil standardisierter Bedingungen mit bis ins Detail charakterisierten Zelllinien. Dies ist für die Untersuchung von Regulationsvorgängen von Vorteil, bedeutet jedoch auch eine eingeschränkte Übertragbarkeit hinsichtlich der Vorgänge *in vivo*. Die Daten für die verwendeten Rac1-Konstrukte basierten lediglich auf Analogieschlüssen aus den Erkenntnissen zu anderen bekannten konstitutiv-aktiven Rho-GTPasen. Bislang erfolgte die Charakterisierung von drei Mutationen im Rac1-Gen, die zu einem konstitutiv-aktiven Erscheinungsmuster führen. Es sind dies Rac1 V12, Rac1 I115 und Rac1 L61. Jede dieser drei Mutationen führte zur malignen Transformation der Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3. Obwohl Rac1 bisher noch nie im Tumorgewebe charakterisiert und keine dieser Mutationen jemals *in vivo* nachgewiesen wurde, wird, basierend auf diesen Daten, dem kleinen G-Protein Rac1 immer wieder eine große tumorbiologische Bedeutung zugeschrieben. Es stellte sich deshalb die Frage, inwieweit die *in-vitro*-Ergebnisse auf die *in-vivo*-Situation übertragbar sind.

Rac1 ist im Mammakarzinom nicht mutiert

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung von Rac1 auf RNA-, DNA- und Proteinebene. Neben Proben von benignem Mammagewebe und Mammakarzinomen umfaßte das Kollektiv auch verschiedene Mammakarzinomzelllinien. Obwohl von jedem Gewebe und jeder Zelllinie mindestens sechs unterschiedliche Klone isoliert und sequenziert wurden, konnte keine der Mutationen nachgewiesen werden, die in der Zellkultur konstitutiv-aktivierend wirken. Dieses Ergebnis zeigt, daß man Erkenntnisse aus Zellkulturexperimenten

nur bedingt und sehr eingeschränkt auf die *in-vivo*-Verhältnisse übertragen kann. Der Einsatz von Rac1-Mutanten, die in Analogie zu den konstitutiv-aktiven Rho-GTPase-Mutanten erstellt wurden, kann sehr nützlich sein, um den Einfluß von Rac1 auf das Zytoskelett (Keely et al., 1997) zu untersuchen und die molekularen Aktivierungsmechanismen anderer Signaltransduktionsproteine offenzulegen. Diese Studie zeigt aber, daß es nicht möglich ist, aus den Ergebnissen in der Zellkultur, Schlußfolgerungen bezüglich der tumorbiologischen Rolle von Rac1 *in-vivo* zu ziehen.

Die Mutationsanalyse des gesamten untersuchten Kollektivs ergab den Nachweis von insgesamt 17 unterschiedlichen Rac1-Mutationen, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Rac1-Proteins führen. Keine dieser Mutationen konnte jedoch in mehr als zwei unterschiedlichen Geweben entdeckt werden. Es bleibt jedoch unklar, ob diese Mutationen Auswirkungen auf die Eigenschaften des exprimierten Proteins haben. Am ehesten handelt es sich bei dieser genetischen Heterogenität um sogenannte Polymorphismen, also genetische Variationen, die spontan und ohne Selektionsdruck entstehen. Diese Mutationen sind funktionell unbedeutend und werden als sog. „silent mutations“ bezeichnet. Auch wenn jedoch bisher eine eindeutig eingrenzbar Funktion dieser Variationen nicht erklärt werden kann, so ist eine klinische Relevanz dieser unterschiedlichen Rac1-Formen durchaus denkbar. Unter dem Gesichtspunkt der zentralen Bedeutung von Rac1 bei der Signaltransduktion, könnte das Vorhandensein eines bestimmten Rac1-Polymorphismus oder eine Kombination von zwei Rac1-Polymorphismen z.B. eine Prädisposition für ein Mammakarzinom darstellen, im Gegensatz zu Patientinnen, die nur den genetischen Code für Rac1wt besitzen. Die genetische Heterogenität könnte auch bei der Resistenz gegenüber bestimmten Chemotherapeutika eine Rolle spielen oder die Entstehung anderer Tumoren oder Krankheiten begünstigen. Jeder der entdeckten Rac1-Polymorphismen wurde an die NCBI-Datenbank für „Single Nucleotide Polymorphisms“ im „World Wide Web“ (WWW) übermittelt und ist unter der Internetadresse „<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>“ für die Öffentlichkeit zugänglich.

Die für die Mutationsanalyse benutzte Methode birgt jedoch auch ein gewisses Risiko für Fehler. Die Rac1-genspezifische PCR erfolgte nach Extraktion von RNA, DNase I-Verdau und reverser Transkription dieser RNA in cDNA. Bereits beim Schritt der reversen Transkription ist es möglich, daß einzelne Basen nicht richtig „übersetzt“ werden. In der anschließenden PCR wird demnach ein falsches „template“ vervielfältigt. Auch bei der eigentlichen PCR-Prozedur kann es Ablesefehler geben, die zur Generierung von Mutationen führen, die rein artifiziell sind (Futo et al., 1998). Durch Verwendung eines Gemisches aus

zwei unterschiedlichen DNA-Polymerasen wurde dieses Problem in der hier vorgestellten Arbeit relativiert. Zusammen mit der üblichen Taq-Polymerase kam eine sogenannte Pwo-Polymerase zum Einsatz. Diese arbeitet zwar deutlich langsamer als die Taq-Polymerase, sie besitzt jedoch die Fähigkeit zum Korrekturlesen der vervielfältigten DNA-Fragmente. Wird ein falsches Basenpaar entdeckt, so kann die Pwo-Polymerase mittels ihrer Exonukleasefähigkeit dieses ausschneiden. Die beiden Polymerasen ergänzen sich somit in ihrer Funktion und führen zu einer signifikanten Reduzierung von Ablesefehlern. Obwohl zudem jede PCR mehrfach wiederholt wurde, kann man nicht mit Sicherheit ausschließen, daß es im Rahmen der Mutationsanalyse zu PCR-Fehlern kam. Desweiteren besitzen die untersuchten Gewebe keine homogene Zusammensetzung. Meist bestehen die aufgearbeiteten Gewebestücke nur zum Teil aus Tumorzellen. Folglich extrahiert man mit der in dieser Studie verwendeten Technik auch RNA aus Fibroblasten, mesenchymalen Zellen, Granulozyten und aus sonstigen Zellen der Extrazellulärmatrix. Andererseits wurden aus jedem Gewebe mehrere Einzelklone sequenziert, so daß sichergestellt war, daß RNA unterschiedlicher Einzelzellen untersucht wurde. In Zukunft wird man dieses Problem mit Hilfe der sog. „laser capture“ umgehen können. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem mit Hilfe eines Laserstrahls einzelne Zellen aus einem Gewebsverband mikrodisseziert werden können. Alternativ ist es mit dem Verfahren der „in situ PCR“ bereits möglich, eine PCR direkt an einem hauchdünnen Gewebestück durchzuführen und mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes zu unterscheiden, welche Zelle am Präparat die amplifizierte DNA aufweist.

Auch wenn sich die vorliegende Studie auf die Mutationsanalyse der GTPase Rac1 beschränkt, ist es sehr gut vorstellbar, daß Mutationen in anderen GTPasen der Ras-Superfamilie vorliegen und evtl. für eine maligne Transformation verantwortlich sind.

Entdeckung einer neuen Rac1-Isoform, Rac1b

Die Sequenzierung von Rac1 in den verschiedenen Mammageweben zeigte neben den bereits beschriebenen Punktmutationen die Koexistenz zweier unterschiedlicher Rac1-Formen. Im Leserahmen der bereits bekannten Rac1wt-Sequenz konnte ein Insert identifiziert werden, das sich über 19 Kodons erstreckt und zwischen Aminosäure 75 und 76 in der Nähe der funktionell wichtigen „Switch II“-Region liegt. In jedem Gewebe, in dem die bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht publizierte neue Rac1-Sequenz gefunden wurde, fand sich stets auch die Rac1wt-Sequenz. Bemerkenswert ist, daß weder auf der 5‘- noch auf 3‘-Seite

Konsensus „splicing-sites“ zu finden sind. Auf der Suche nach Ähnlichkeiten mit anderen kleinen G-Proteinen in den Datenbanken GenBank und EMBL zeigte sich ein anderes Protein aus der Ras-Superfamilie mit dem Namen RagB (Schürmann et al., 1995), das ebenfalls ein Insert aufweist. Dieses Insert befindet sich ebenfalls in der Nähe der „switch II“-Region, ist 28 Kodons lang und liegt zwischen Aminosäure 77 und 78. Die Sequenzen, die das jeweilige Insert am 5'- (splice donor site) und 3'-Ende (splice acceptor site) von RagB und Rac1b eingrenzen, sind identisch. Aufgrund des Fehlens von „consensus splicing sites“ und der Analogie von Rac1 zu RagB liegt der Schluß nahe, daß Rac1 und Rac1b durch alternatives „splicing“ aus dem selben Gen entstanden sind. Hierfür spricht das gleichzeitige Vorhandensein von 2 Banden im Western Blot. Das Fehlen einer zweiten Bande im Northern Blot ist durch die geringe Größe des Inserts bedingt.

Während wir unsere Ergebnisse zur Publikation eingereicht haben (Schnelzer et al., 2000; eingereicht am 06.09.1999, veröffentlicht am 13.02.2000), publizierten Jordan et al. (Jordan et al., 1999; eingereicht am 11.02.1999, veröffentlicht am 18.11.1999) ebenfalls die Entdeckung von Rac1b. Nachgewiesen wurde die Splice-Variante zuerst in humanem Kolonkarzinomgewebe, wobei sie insbesondere im Epithel des gesamten Intestinaltrakts und in der Haut exprimiert wurde. Während Jordan et al. zwar herausfanden, daß die Expression von Rac1b im Verhältnis zu Rac1wt im colorektalen Tumor zunahm, so erfolgte im Rahmen der von ihm publizierten Arbeit keine biochemische Charakterisierung der neuen Splicevariante. Jordan et al. vermuteten, daß der Insertbereich, der 2 potentielle Threonin-Phosphorylierungsstellen für die Caseinkinase II und die Proteinkinase C aufweist, eine neue Effektorbindungsstelle in der Signaltransduktionskaskade darstellt.

Von entscheidender Bedeutung ist die Frage, ob es sich bei der neuen Rac1-Sequenz um eine funktionsfähige GTPase handelt. Um Rac1b genauer zu charakterisieren, wurden verschiedene Versuchsansätze gewählt. Zum einen wurden Rac1wt und Rac1b hinsichtlich ihrer GTP-Bindungsfähigkeit verglichen. Aus der Abb. 14B (S. 76) geht hervor, daß der GTP-Austausch von Rac1b schneller erfolgt als der von Rac1wt. Die veränderte Dynamik der GTP-Bindung könnte z.B. durch eine Änderung der Proteinarchitektur und die konsekutive Ausbildung einer abweichenden Tertiärstruktur durch das Insert bedingt sein. In Zusammenarbeit mit der University of North Carolina (Dr. Sharon Campbell, Lineberger Comprehensive Cancer Center) ist demnächst die Kristallisierung und Darstellung der NMR-Struktur von Rac1b geplant.

In weiteren Versuchsreihen zeigte sich, daß sich Rac1wt und Rac1b hinsichtlich ihrer intrinsischen GTP-Hydrolyserate sehr ähnlich sind (Abb. 14D, S. 78). Diese auffallend

ähnliche Hydrolyserate und die hohe Nukleotid-Dissoziationsrate, also der Austausch von GTP durch GDP, sind ein Beweis dafür, daß es sich bei Rac1b um eine funktionsfähige GTPase handelt; weiter legt dieses Ergebnis den Schluß nahe, daß das Rac1b-Protein überwiegend in der aktiven, also GTP-gebundenen Form vorliegt. Vergleichbare Ergebnisse (Xu et al., 1997, Lin et al., 1997) wurden in der Literatur bei zwei Rho-GTPasen berichtet, in die Mutationen in der Switch I-Region (Rac2 F28L und Cdc42Hs F28L) eingebracht wurden. Xu (Xu et al., 1997) zeigte, daß für den Nukleotidaustausch eine intakte SwitchI- und SwitchII-Region vorhanden sein müssen und beschrieb funktionelle Interaktionen zwischen diesen beiden Regionen und einem mutierten Rac2 (Rac2 G12V). Cdc42Hs F28L weist bei uneingeschränkter GTPase-Aktivität einen hohen spontanen GTP/GDP-Austausch auf wie Lin (Lin et al., 1997) in seiner Arbeit zeigt. Fibroblastenzelllinien, die mit Cdc42Hs F28L stabil transfiziert wurden, entwickelten Kennzeichen maligne transformierter Zellen, wie reduzierte Kontaktinhibition oder mehrschichtiges Wachstum in der Kulturschale. Unabhängig von den Beobachtungen aus den Zellkulturexperimenten mit GTPase-Mutanten, wurde ein ähnliches biochemisches Verhalten bisher noch nie bei einer *in-vivo*-GTPase - wie in dieser Studie zu Rac1b - beschrieben.

Weiterhin bleiben jedoch noch viele Fragen hinsichtlich der biologischen Funktion von Rac1b unbeantwortet. Von großem Interesse ist seine Rolle im Netzwerk der Signaltransduktionsproteine und seinen Auswirkungen auf den Umbau des Zytoskeletts, da der Einfluß von Rac1wt in diesem Bereich nachgewiesen ist (Hall, 1998; Hunter et al., 1997) und ein im Sinne von Rac1b verändertes Protein die Funktionen entscheidend beeinflussen könnte. Möglicherweise spielt Rac1b eine Rolle bei der Progression kolorektaler Tumoren, da Jordan et al. (Jordan et al., 1999) bei Kolonkarzinomgewebe im Vergleich zu normaler intestinaler Mukosa einen Unterschied in der Rac1b-Expression beschrieb. Eine transformierende Wirkung bei Überexpression von Rac1b ist durchaus denkbar. Durch die beiden neuen Phosphorylierungsstellen im Insertbereich ergeben sich zum einen vielfältige Interaktions- und Regulationsmöglichkeiten. Ob Rac1b jedoch andererseits einen lediglich proliferativen Effekt hat, der sowohl in benignem, als auch in malignem Gewebe zu finden ist, oder aber alleine eine Transformation bewirken kann, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und ist im Moment spekulativ.

Nach unseren Erkenntnissen spielt Rac1b bei der Entstehung des Mammakarzinoms keine Rolle. Tendenziell ließ sich kein Unterschied hinsichtlich der Rac1b-Expression bei benignem und malignem Mammagewebe feststellen.

Ein weiteres Ziel der Charakterisierung von Rac1b war die Messung der Aktivitätsniveaus von Rac1 und Rac1b im Gewebe. Hierfür wurde ein nach einem nicht-radioaktiven Verfahren arbeitendes Protokoll verwendet, das von Fr. Dr. V. Benard (Benard et al., 1999) an Fibroblastenzelllinien etabliert worden ist. Aus der Signaltransduktionsforschung weiß man, daß aktives GTP-Rac1 selektiv an die Proteinbindungsdomäne (PBD) von Pak1, einem „downstream-target“ von Rac1, bindet (Abb. 3, S. 12). Unter Zuhilfenahme dieser PBD gelingt es, aktives Rac1 zu präzipitieren und anschließend in einem Western Blot mit einem Rac1-spezifischen Antikörper zu quantifizieren. Modifiziert man diese Methode für die Anwendung mit Gewebe (Hannke-Lohmann et al., 2000), so gelingt sowohl die Detektion von aktivem Rac1wt als auch von aktivem Rac1b. Dieser Nachweis gelang jedoch im Mammagewebe des Kollektivs nicht. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß das Gewebe durchschnittlich für eine Dauer von 30 min. nach der Entnahme des Primärtumors aus dem Körper lediglich auf Eis gekühlt wird, bevor es in flüssigem Stickstoff schockgefroren wird. Dieser Ablauf ist notwendig, da zuerst vom Pathologen die Diagnose „Mammakarzinom“ im Rahmen einer sogenannten Schnellschnittuntersuchung gestellt werden muß. Da sich der Austausch von GTP zu GDP innerhalb weniger Minuten vollziehen kann und die Vorgänge im Mikromilieu eines Tumors nach Unterbrechung der Blutzufuhr sich unserer Beurteilung entziehen, kann unter Umständen nach Ablauf von 30 min kein aktives Rac1 mehr nachgewiesen werden. Hannke-Lohmann et al. (Hannke-Lohmann et al., 2000) zeigten jedoch an Plazentagewebe, daß der Nachweis von aktivem GTP-Rac1 gelingt, wenn das Gewebe sofort nach Entnahme aus dem Körper schockgefroren wird. Ein denkbarer Lösungsansatz wäre die Durchführung einer Stanzbiopsie aus dem Zentrum des Tumors, die unmittelbar am OP-Tisch nach Entfernung des Befundes aus der Brust der Patientin durchgeführt werden könnte. Das sofortige "Schockgefrieren" des Stanzzylinders könnte die Aufrechterhaltung der Rac1-Aktivität positiv beeinflussen. Hieraus würde sich auch keine Beeinträchtigung der Beurteilbarkeit des Tumors durch den Pathologen ergeben.

Rac1 wird im proliferierenden Mammagewebe und im Mammakarzinom überexprimiert

Im Rahmen der durchgeführten Western- und Northern-Blots zeigte sich, daß sowohl Rac1-Protein als auch Rac1-RNA im malignen im Gegensatz zum benignem Mammagewebe überexprimiert werden. In vivo konnte jedoch im Kollektiv der Mammakarzinome keine

aktivierende Mutation in der kodierenden Sequenz von Rac1 als Erklärung hierfür nachgewiesen werden. Im Southern Blot zeigte sich desweiteren kein Anhalt für eine Amplifikation des Rac1-Genes. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Rac1-Expression im Mammagewebe entweder auf Transkriptionsebene oder durch eine erhöhte RNA-Stabilität reguliert wird. Im Rahmen von Zellkulturrexperimenten hinsichtlich der Rac1-Regulation konzentrierte man sich bisher fast ausschließlich auf den Mechanismus der Steuerung durch GDP/GTP-Austausch. Diese Untersuchungen können jedoch nicht eine gesteigerte Proteinexpression erklären. So ist zum Beispiel bis heute nichts über die 5'-Regulationsregion von Rac1 bekannt.

Interessanterweise unterschied sich das Rac1-Expressionsmuster außerdem nicht bei Patientinnen mit und ohne Metastasierung. Die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit, in der das Auftreten einer Metastasierung erfaßt wurde, betrug 60 Monate. Die Gruppen der Patientinnen mit und ohne Metastasierung umfaßten jedoch jeweils nur 10 Personen, so daß eine repräsentative Aussage nicht möglich ist. Zur Beurteilung der Aussagekraft von Rac1 als Prognosefaktor müßten die Untersuchungen an einem größeren Patientinnenkollektiv wiederholt und die Ergebnisse hieraus mit wissenschaftlich belegten, aussagekräftigen Prognosefaktoren wie z.B. dem Nodalstatus verglichen werden.

Immunhistochemisch zeigte sich eine hohe Rac1-Expression nicht nur im Mammakarzinom, sondern auch im nicht-invasiven duktalem Carcinoma in situ (DCIS) (Abb. 19B, S. 85). Auch in der Papillomatose, einer benignen hyperplastischen Proliferation epithelialer Brustdrüsenzellen und in der höhergradigen Mastopathie war die Rac1-Anfärbbarkeit gesteigert. Es handelt sich hierbei um Gewebe, die eine starke Proliferationsrate aufweisen, jedoch nicht um maligne entartetes Gewebe. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Burstein et al. (Burstein et al., 1998), der zeigen konnte, daß eine Überexpression von Rac1 in NIH3T3-Kulturen eine starke Zellproliferation induziert. Burstein zeigte weiter, daß Rac1 selektiv den proliferativen Effekt bestimmter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren vermittelt (Burstein et al., 1998) und einen anderen Signaltransduktionsweg benutzt als Thyrosinkinase- und JNK-gekoppelte Rezeptoren. Rac1 vermittelt also über einen relativ eigenständigen Signalweg die Zellproliferation. Rac1 bewirkt außerdem eine sog. Zellzyklusprogression (Osion et al., 1995). Zellen, die sich im Ruhestadium der G₀-Phase befinden, gehen in die aktive G₁-Phase über. Dies ist wiederum eine Voraussetzung für die Zellproliferation. Zusammengefasst spielt Rac1 eine wichtige Rolle bei der Proliferation.

Da man bereits im DCIS eine hohe Rac1-Expression findet, liegt der Schluß nahe, daß Rac1 bereits sehr früh im zeitlichen Ablauf der malignen Transformation eine Rolle spielt. Jedoch auch bei den viel später stattfindenden Vorgängen der Metastasierung könnte Rac1 von Bedeutung sein. Hier war auch in den zu den Primärtumoren gehörenden Lymphknotenmetastasen eine starke Rac1 Expression zu finden.

Eine Besonderheit hinsichtlich des zellulären Verteilungsmusters von Rac1 ließ sich bei den immunhistochemischen Färbungen der Mammakarzinome feststellen. Es zeigte sich bei ca. der Hälfte der untersuchten Mammakarzinome eine eindeutig vermehrte Anfärbbarkeit der Plasmamembran mit dem Rac1-Antikörper. Dies beweist eine vermehrte Konzentration von Rac1 an dieser Lokalisation. Aus der Zellkultur wissen wir, daß eine Translokation an die Plasmamembran bei Rac und Ha-Ras eine Aktivierung bedeutet (Fleming et al., 1996; Hall, 1998, Diekmann et al., 1994). Die Anfärbbarkeit der Plasmamembran war eng korreliert mit dem Auftreten von Rezidiven des Primärtumors. Diese Beobachtung stellt somit einen Hinweis für ein gesteigertes Metastasierungspotential des Primärtumors dar und ist somit ausschlaggebend für die Prognose der Tumorerkrankung.

Die bereits früh im Rahmen der malignen Transformation auftretende Überexpression von Rac1 ist wahrscheinlich nicht alleine für die Transformation des Mammagewebes verantwortlich. Dagegen spricht auch die Überexpression von Rac1 in benignem Mammagewebe. Beim Mammakarzinom gibt es wahrscheinlich keine klassische Entwicklungssequenz der Zellen wie bei den Kolonkarzinomen, bei denen sich Karzinome fast ausschließlich über ein Adenomstadium entwickeln (Kinzler et al., 1996). Nicht aus jeder fibrozystischen Mastopathie oder Papillomatose der Mamma entwickelt sich ein Karzinom. Es muß also noch weitere Faktoren geben, die zur malignen Transformation einer Zelle und zum invasiven Potential eines Tumors führen. Nach der Hypothese einer Multi-hit-Theorie könnte Rac1 mit einem anderen Onkogen, z.B. Ha-Ras synergistisch zusammenwirken und sich gegenseitig in der Wirkung verstärken. *In vitro* konnte bereits mit konstitutiv aktiven und dominant-negativen Mutanten von Rac, Ras und Rho gezeigt werden, daß die transformierende Wirkung von Ha-Ras durch Rac1 verstärkt wird (Qiu et al., 1995) und daß wiederum Rho für die transformierende Wirkung von Ras benötigt wird (Qiu et al., 1995). Diese Zusammenhänge zeigen die engen Verflechtungen der GTPasen untereinander und deren zahlreiche Interaktionen. In diesem Zusammenhang werden weitere Interaktions-Hypothesen diskutiert und bilden die Grundlage zukünftiger Studien.

Ausblick

Mit den hier vorgestellten Ergebnissen als Grundlage gilt es nun, die Einflüsse von Rac1 auf die Zelle weiter zu untersuchen. Neben den bereits bekannten Effekten, wie der Wirkung auf das Zytoskelett und den JNK-Signaltransduktionsweg, dürfte die Regulation und Interaktion mit anderen tumorassoziierten Faktoren von Interesse sein. Letztendlich ist auch die Frage der Regulation von Rac1 nicht geklärt. Bisher wurde postuliert, daß Rac1 nur über den Austausch von GDP zu GTP reguliert wird. Unsere Ergebnisse der Überexpression von Rac1 im Mammakarzinom deuten auf eine Regulation auf Transkriptionsebene hin. In über 90 % der Fälle ist eine Steuerung auf Transkriptionsebene für eine Überexpression eines Proteins verantwortlich. Um die transkriptionelle Regulation näher zu charakterisieren ist nun das Klonieren des Rac1-Promotors einer der nächsten Schritte.

Hinsichtlich der neuen Rac-Isoform Rac1b muss noch eine komplette tumorbiologische Charakterisierung anhand von Zellkulturexperimenten mit stabilen Transfektionen durchgeführt werden. Hier muß untersucht werden, welche Rolle Rac1b bei Proliferation, Invasion und Metastasierung maligner Tumoren spielt bzw. ob Rac1b überhaupt eine Rolle bei Krebserkrankungen spielt.

Zusammenfassung

Signaltransduktionswege vermitteln Informationen von der Zellaußenwand in das Zellinnere und sind an der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen beteiligt. Ein Signaltransduktionsweg, der bei Krebserkrankungen oft gestört ist, ist der MAPKinase-Signaltransduktionsweg. Nach Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase an der Zellaußenwand werden kleine G-Proteine aus der Ras-Familie aktiviert, die an der Regulierung vieler Gene beteiligt sind. Eine zentrale Rolle spielt hierbei das kleine G-Protein Rac1, das unter anderem eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts bewirkt und als Schlüssel-Regulator der Zellmotilität und Zelladhäsion gilt. Zellkulturexperimente zeigten, daß konstitutiv-aktives Rac1 zur malignen Transformation *in vitro* führt, während keine Daten zur Rolle von Rac1 *in vivo* vorlagen. Da der MAPKinase-Signaltransduktionsweg beim Mammakarzinom konstitutiv aktiviert ist und eine Überexpression von Rac1 zu einer malignen Transformation von Zellen *in vitro* führen kann, stellte sich die Frage, ob Rac1 beim Mammakarzinom mutiert oder überexprimiert ist.

Die Mutationsanalyse von Rac1 erfolgte nach RNA-Extraktion, reverser Transkription, PCR mit Rac1 spezifischen Primern und Subklonierung in 7 benignen und 10 malignen Mammageweben, sowie in 8 Mammakarzinomzelllinien. Die Sequenzanalyse von Rac1 wurde in jedem Gewebe mindestens sechs Mal durchgeführt und zeigte lediglich 18 Polymorphismen, die über die gesamte kodierende Sequenz von Rac1 verteilt waren. Keine Mutation kam mehr als zwei Mal vor, insbesondere wurde keine der häufig für die *in-vitro*-Versuche zur Transformation verwendeten konstitutiv-aktiven-Punktmutationen nachgewiesen.

Im Rahmen der Mutationsanalyse konnte im Mammagewebe eine neue Rac1-Isoform (Rac1b) entdeckt werden, die ein 19 Aminosäuren langes Insert in der Nähe der Switch II-Region beinhaltet, und Rac1b genannt wurde (GenBank Nummer AF136373). Die biochemische Charakterisierung zeigte, daß das Insert für den GDP/GTP-Austausch von Bedeutung ist und Rac1b bei gleicher intrinsischer GTP-Hydrolyserate eine höhere intrinsische GTPase-Aktivität als Rac1wt besitzt. Es handelt sich also bei Rac1b um eine funktionsfähige GTPase.

Im malignen Mammagewebe fand sich auf RNA-Ebene im Northern-Blot und auf Proteinebene im Western-Blot eine signifikant höhere Expression von Rac1 verglichen zum benignen Mammagewebe. Die höhere Expression von Rac1-Protein beim Mammakarzinom wurde immunhistochemisch mit zwei verschiedenen Antikörpern bestätigt. Während benignes

Brustdrüsengewebe eine schwache Anfärbbarkeit zeigte, war eine starke Rac1-Expression beim duktalem Carcinoma *in situ*, beim primären Mammakarzinom und in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch nachweisbar. An einem grösseren Patientinnenkollektiv konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von Rac1 an der Plasmamembran ein schlechter prognostischer Faktor ist. Membrangebundenes Rac1 ist aktiviert.

Neben der Entdeckung einer neuen Isoform von Rac1 (Rac1b) hat diese Arbeit dazu beigetragen, die Rolle von Rac1 beim Mammakarzinom besser zu verstehen. Es konnte ferner gezeigt werden, daß *in-vitro*-Erkenntnisse aus Zellkulturexperimenten nicht uneingeschränkt auf *die in-vivo*-Situation übertragbar sind, da keine der in Zellkulturexperimenten verwendeten Rac1-Mutanten im Mammakarzinom nachweisbar war.

Literaturverzeichnis

Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG and Segal AW Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 1991; 353:668-670.

Anand-Apte B, Zetter BR, Viswanathan A, Qiu RG, Chen J, Ruggieri R, et al. Platelet-derived growth factor and fibronectin-stimulated migration are differentially regulated by the rac and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:30688-30692.

Bacher A, Griehl K, Mackamul S, Mitreiter R, Muckter H, Ben-Shaul Y. Protease inhibitors suppress the formation of tight junctions in gastrointestinal cell lines. *Experimental Cell Res.* 1992; 200:97-104.

Beaudet AL, Tsui L-C. A suggested nomenclature for designating mutations. *Human Mut.* 1993; 2:245-248.

Benard V, Bohl BP, Bokoch GM. Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:13198-13204.

Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 1993; 100:243-55

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 7:1513-1522

Bos JL. Ras oncogenes in human cancer. *Cancer Res.* 1989; 49:4682-4689

Bouck N, Stellmach V and Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv. Cancer Res.* 1996; 69:135-174

Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 1998; 58:1408-1416.

Brunet A, Pouyssegur J. Identification of MAP kinase domains by redirecting stress signals into growth factor responses. *Science* 1996; 272:1652-1655

Burstein ES, Hesterberg D, Gutkind S, Brann MR, Currier EA, Messier TL. The ras-related GTPase rac1 regulates a proliferative pathway selectively utilized by G-protein coupled receptors. *Oncogene* 1998; 17:1617-1623.

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of ras signaling. *Oncogene* 1998; 17:1395-1413.

Chomczynski P, and Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162:156

Chomczynski P. A Reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 1995; 15:532-534

Chuang TH, Xuemin X, Quilliam LA, Bokoch GM. GDS stabilizes nucleotide-bound and -free forms of the rac1 GTP-binding protein and stimulates GTP/GDP exchange through a substituted enzyme mechanism. *Biochem. J.* 1994; 303:761-767.

Coso O, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N. The small GTP-binding proteins rac1 and cdc 42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 1995; 81:1137-1146.

Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 1999; 24:68-72.

Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996; 379:557-560.

Della Rocca GJ, van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:19125-32.

Derijard B, Raugeaud J, Barrett T, Wu I-H, Han J, Ulevitch J, et al. Independent human MAP kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 1995; 267:682-685

Dewhirst MW, Klitzman B, Braun RD, Brizel DM, Haroon ZA, Secomb TW. Review of methods used to study oxygen transport at the microcirculatory level. *Int. J. Cancer* 2000; 90:237-55

Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW, Hall A. Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 1994; 265:531-533

Didsbury J, Weber R, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. Rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:16378-16382.

Fajac A, Benard J, Lhomme C, Rey A, Duvillard P, Rochard F, Bernaudin JF, Riou G. cerbB-2 gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: Evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis. *Int. J. Cancer* 1995; 64:146-156

Fedi P, Tronick SR and Aaronson SA. Growth Factors. In "Cancer Medicine", Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW and Weichselbaum RR, eds. 1997 (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), 41-64

Fidler IJ. Mitchell PS, Hrsg. Introduction to the biology of cancer. 1990; Serientitel: Cancer: A technical monograph, National Health Laboratories, La Jolla, USA

Fleming IN, Elliott CM, Exton JH. Differential translocation of Rho family GTPases by lysophosphatidic acid, endothelin-1, and platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:33067-33073.

Folkman J. Clinical Applications of research on Angiogenesis. *N Engl. J. Med.* 1995; 333:1757-1763.

Folkman J. Tumor angiogenesis. In *Cancer Medicine*, Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW and Weichselbaum RR, eds. 1997 (Baltimore, MD: Williams and Wilkins); 181-204

Futo B, Pechniuk N, Slattery M, Walsh T. PCR bias toward the wild-type k-ras and p53 sequences: Implications for PCR detection of mutations and cancer diagnosis. *BioTechniques* 1998; 25:684-691.

Garcia R, Jove R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J. Biomed. Sci.* 1998; 5:79-85.

Gullick WJ. The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erbB-2 protein in breast cancer. *Int J Cancer Suppl* 1990; 5:55-60

Gum R, Lengyel E, Juarez J, Chen JH, Sato H, Seiki M, Boyd D. Stimulation of 92-kDA gelatinase B promoter activity by *ras* is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/*ets* and AP-1 sequences. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:10672-10680.

Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 1995; 267:389-393

Gutkind S. Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 1998; 17:1331-1343

Hahnfeldt P, Panigrahy D, Folkman J, Hlatky L. Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer Res.* 1999; 59:4770-4775

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279:509-513.

Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86:353-364

Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100:57-70

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994; 265:808-811

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. *Obstet. Gynecol.* 2000; 96:582-587.

Hellman M, de Vita, Rosenberg MP. *Principles and Practice of Oncology.* 1997; 5 ed., 1-2, New York: Lippincott.

Hoskins WJ, Perez CA, Young RC. *Principles and Practice of Gynecology,* 2000; 3 ed., New York: Lippincott.

Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell* 1997; 88:333-346.

Jordan P, Brazao R, Boavida MG, Gespach C und Chastre E. Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* 1999; 18:6835-39

Karin M, Smeal T. Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *Trends Biochem. Sci.* 1992; 17:418-422.

Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV. Cdc42 and rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 1997; 390:632-636.

Khosravi-Far R, Campbell S, Rossman KL, Der CJ. Increasing complexity of ras signal transduction: Involvement of rho family proteins. *Adv. Cancer Res.* 1998; 72:57-197.

Khosravi-Far R, Solski PA, Clark JG, Kinch MS, Der CJ. Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for ras transformation. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15:6443-6453.

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87:159-170.

Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, and Bokoch GM Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 1991; 254, 1512-1515

Knaus UG, Wang Y, Reilly AM, Warnock D, Jackson JH. Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* 1998; 34: 21512-8.

Knudson AG Jr. Mutagenesis and embryonal carcinogenesis. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1979; 51:19-24

Krizman D, Chuaqui RF, Meltzer PS, Trent JM, Duray PH, Linehan WM, Liotta L and Emmert-Buck MR. Construction of a representative cDNA library from prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res.* 1996, 56:5380-83

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAPkinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 1998; 74:49-53

Lin R, Bagrodia S, Cerione R and Manor D. A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation. *Curr. Biol.* 1997; 7:794-97

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275

Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of Ras. *Annu. Rev. Biochem.* 1993; 62:851-891

Luttrell DK, Lee A, Lansing TJ, Crosby RM, Jung KD, Willard D, et al. Involvement of pp60-c-src with two major signaling pathways in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1994; 91:83-87.

Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta L. *The molecular basis of cancer.* 1995; 1 ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, 134-155

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 1:263-273.

Nobes CD and Hall A. Rho, Rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995, 81:53-62.

Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G₁. *Science* 1995; 269:1270-1272.

Parada L, Tabin C, Shih C, Weinberg RA. The human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of the harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 1982; 297:474-478.

Quinn MT, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ, Bokoch GM. Translocation of rac correlates with NADPH oxidase activation: Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:20983-20987.

Qiu R-G, Chen J, Kirn D, McCormick F, Symons M. An essential role for rac in ras transformation. *Nature* 1995; 374:457-459

Qiu R-G, Chen J, McCormick F, Symons M. A role for rho in ras transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92:11781-11785.

Remmele W, Stegner HE. Immunohistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptoren (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe, Vorschlag zur einheitlichen Bewertung des Untersuchungsbefundes. *Frauenarzt* 1987; 2:41-43.

Ridley AJ, Membrane ruffling and signal transduction. *BioEssays* 1994 16: 321-327.

Ridley AJ, Patterson HF, Johnston CL, Diekmann D and Hall A. The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor induced membrane ruffling. *Cell* 1992; 70, 401-410.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, Cold Spring Harbor, New York, 2:155-166

Sauer H (Red.). *Tumormanual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Tumorzentrum München der Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität, Tumorzentrum München, 1998, 7. Auflage, 1-10.

Schlimok G, Riethmüller G. Detection, characterization and tumorigenicity of disseminated tumor cells in human bone marrow. *Sem. Cancer Biol.* 1990; 1:207-215.

Schnelzer A, Prectel 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. *Oncogene* 2000; 19:3013-20

Schürmann A, Brauers A, Maßmann S, Becker W, Joost H-G. Cloning of a novel family of mammalian GTP-binding proteins (RagA, RagB^s, RagB^l) with remote similarity to the ras-related GTPases. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:28982-28988.

Sivaraman VS, Wang H-Y, Nuovo GJ, Malbon CC. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* 1997; 99:1478-1483.

Smith CL, Hager GL. Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:27493-27496.

Spandidos DA. Oncogene activation in malignant transformation: A study of H-ras in human breast cancer. *Anticancer Res.* 1987; 7:991-996.

Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* 1996; 347:1377-1381

Strohmeier D. Pathophysiology of tumor angiogenesis and its relevance in renal cell cancer. *Anticancer Res.* 1999; 19:1557-61

Thompson EW, Paik S, Brunner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, et al. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.* 1992; 150:534-544.

Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993; 9:138-141.

Vojtek AB, Der CJ. Increasing complexity of the ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:19925-19928.

Wagener C, *Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren.* Thieme Verlag, Stuttgart; New York, 1999, 2. Auflage, 46-48, 80-82.

Xu X, Wang Y, Barry DC, Chanock SJ and Bokoch GM. Guanine nucleotide binding properties of Rac2 mutant proteins and analysis of the responsiveness to guanine nucleotide dissociation stimulator. *Biochemistry* 1997; 36:626-32

Zhang L, Zhou W, Velculescu V, Vogelstein B, Kinzler KW. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997; 276:1268-1271.

Internet-Referenz:

NCBI-Datenbank für Nukleotid-Polymorphismen:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>

Handle "Lengyel/Schnelzer"

Abkürzungsverzeichnis (alphabetisch)

A	Adenin
A _n	Absorption bei Wellenlänge n
Abb	Abbildung
AP-1	Aktivator Protein-1
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bidest.	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
CTP	Cytidintriphosphat
d	2'-Desoxy(ribo)-
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Nährmedium für Zellen)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor
Erk	extracellular signal regulated kinase
EST	expressed Sequence Tag
EZM	extrazelluläre Matrix
Fa.	Firma
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
G	Guanin
GAP	Rho GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factors (Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren)
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N2 Hydroxyethylpiperazin-2'ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
JAK	Janus kinase
Jnk	c-Jun N-terminal kinase
kB	Kilobasen
LB	Luria Broth
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (mitogen aktivierte Proteinkinase)
MBP	myelinisch-basisches Protein
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MW	Molekulargewicht
NTPs	Nukleotidtriphosphate
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBD	PAK1-Bindungsdomäne
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung

PCR	Polymerasekettenreaktion
PR	Progesteronrezeptor.
PTK	Protein Tyrosin Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
STAT	signal transducers and activators of transcription
T	Thymin
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Triton	Triton X-100, Octylphenolpolyethylenglykol
TTP	Thymidintriphosphat
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
wt	wildtyp
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

Einheiten

b	Base(n)
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
D	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
mM	Millimolar
min	Minuten
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunden
U	Unit (Einheit)
V	Volt
Xg	Relative Zentrifugalkraft

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Glu	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

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. em. Dr. med. Henner Graeff und Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Manfred Schmitt, die mir die Möglichkeit gegeben haben, in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (TUM) zu arbeiten und meine wissenschaftliche Dissertation unterstützt haben.

In gleicher Weise möchte ich mich bedanken bei Herrn PD Dr. med. E. Lengyel für die Überlassung des Themas der Dissertation und die intensive Betreuung während des gesamten Projektes. Er hat es nicht nur verstanden, mich in molekularbiologischer Grundlagenforschung auszubilden und mein wissenschaftliches Interesse zu fördern, sondern er hat auch stets eine Brücke geschlagen zur klinischen Anwendung und hat mir Einblicke in die gynäkologische Onkologie gegeben. Herr PD Dr. med. E. Lengyel war mir auch in menschlicher Hinsicht stets ein Vorbild.

Frau PD Dr. med. N. Harbeck hat ebenfalls zu meiner wissenschaftlichen Ausbildung beigetragen und hat meine Arbeit stets unterstützt. Ich danke ihr insbesondere für die Bereitstellung der Präparate und Daten der Gewebebank für Mammakarzinome der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München und für die Übernahme der Betreuung der Dissertation.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe bedanken. Frau Kerstin Dehne (MTA) hat zahlreiche Experimente durchgeführt und mich jederzeit unterstützt. Frau Dr. rer. nat. Sabine Ried (Biologin) hat mir molekularbiologische Techniken vermittelt und stand mir mit Rat und Tat zur Seite. Herr Dr. rer. nat. B. Mühlenweg (Chemiker) hat mich in die Technik der PCR eingeführt. Dank gilt außerdem Frau C. Jäger (MTA) für ihre Unterstützung und Frau Dr. med. A. Hannke-Lohmann (Ärztin) für die Hilfe bei den Kinase-Assays.

Herr Dr. med. D. Prechtel (Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München) hat die immunhistochemischen Färbungen durchgeführt.

Der Boehringer Ingelheim Fonds hat mir im Rahmen eines Kurzzeitstipendiums einen zweimonatigen Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. U. Knaus (Department of Immunology, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA) ermöglicht. Unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. U. Knaus und Frau Dr. L. Sanders erlernte ich dort unter anderem die Rac1- und Pak-Aktivitätsassays.

Diese Arbeit wäre ohne die großzügige Unterstützung durch die Kommission für Klinische Forschung der TUM (KKF 8756156) nicht möglich gewesen.

Schließlich danke ich meiner Mutter Veronika Schnelzer, die mir meine Ausbildung überhaupt erst ermöglicht hat.