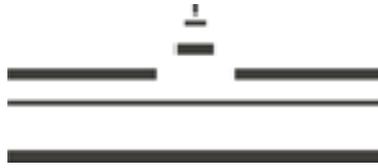


Bianca Schröer

**Molekularbiologisch-genetische Charakterisierung
des RhoA-Promotors bezüglich kardiovaskulärer
Erkrankungen**

– 2010 –

Biologie



**Molekularbiologisch-genetische Charakterisierung des
RhoA-Promotors bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Bianca Schröer
aus Bochum

– 2010 –

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Christian Klämbt
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Dirk Prüfer
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Christian Klämbt
Tag der mündlichen Prüfung:	03.12.2010
Tag der Promotion:	_____

Meinen Eltern

Abkürzungen	1
Abstract	6
1. Einleitung	9
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen	9
1.1.1 Atherosklerose	9
1.1.2 Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen	11
1.1.3 Multifaktorieller Charakter kardiovaskulärer Erkrankungen	12
1.1.4 Erforschung genetischer Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen	12
1.2 Kontrolle der Genexpression	15
1.2.1 Assemblierung der basalen Transkriptionsmaschinerie	16
1.2.1.1 Core-Promotor	16
1.2.1.2 TATA-Box	17
1.2.1.3 Aufbau des Prä-Initiationskomplexes	17
1.2.2 Anlagerung der TF an den proximalen Promotor und Rekrutierung von Co-Aktivatoren	18
1.2.2.1 Proximaler Promotor	19
1.2.2.2 Enhancer, Silencer und Insulatoren	19
1.2.3 Epigenetische Mechanismen	20
1.2.3.1 Histonmodifikationen	20
1.2.3.2 DNA-Methylierung	20
1.2.4 Alternative Promotoren	21
1.2.4.1 Bidirektionale Promotoren	21
1.3 RhoA und TCTA: ein divergentes Genpaar	22
1.3.1 Kleine GTPasen	22
1.3.1.1 Rho GTPasen	22
1.3.1.2 Aufbau und posttranslationale Modifikation von Rho GTPasen	24
1.3.2 RhoA – Gen und Protein	24
1.3.2.1 RhoA und TCTA	25
1.3.3 RhoA und Atherosklerose	26
1.4 Ziel der Arbeit	29
2. Material	31
2.1 Chemikalien	31

2.2 Kits	32
2.3 Seren und Medien	32
2.4 DNA-Marker	33
2.5 Enzyme	33
2.6 Plasmide und Vektoren	34
2.7 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)- Stämme	34
2.8 Eukaryotische Zelllinien	34
2.9 Geräte	35
3. Methoden	37
3.1 Molekularbiologische Methoden	37
3.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren	37
3.1.1.1 Isolierung genomischer DNA	37
3.1.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA	37
3.1.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA	37
3.1.2 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	38
3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	38
3.1.3.1 RT-PCR (reverse transcriptase PCR)	40
3.1.3.2 5'-RACE (rapid-amplification of 5'-cDNA ends)	40
3.1.4 DNA/RNA-modifizierende Reaktionen	41
3.1.4.1 Restriktionsendonukleasen	41
3.1.4.2 Dephosphorylierung von DNA	41
3.1.4.3 Ligation	42
3.1.4.4 Biotinylierung der 3'-Enden einzelsträngiger Oligonukleotide und deren anschließendes Annealing	42
3.1.5 Agarose Gelelektrophorese	43
3.1.6 „Site-directed“ Mutagenese	43
3.1.7 Vektorkonstruktion	43
3.1.7.1 Gateway-Vektor-Konversion	44
3.1.7.2 Konstruktion der Reportergenvektoren	45
3.1.7.3 Konstruktion des bidirektionalen Vektors	45
3.1.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	46
3.1.8.1 Gelextraktion	46
3.1.8.2 Aufreinigung von PCR-Fragmenten	46
3.1.8.3 DNA-Fällung	46

3.1.8.4 Exo Sap-it Aufreinigung	47
3.1.9 Sequenzierung	47
3.1.10 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).....	47
3.1.11 Bisulfit-Konvertierung	48
3.2 Protein-biochemische Methoden	50
3.2.1 Isolierung von Kernproteinen	50
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	50
3.3 Zellbiologische und mikrobiologische Methoden.....	51
3.3.1 Prokaryotische Zellen	51
3.3.1.1 Kulturbedingungen	51
3.3.1.2 Gefrierkulturen	51
3.3.1.3 Herstellung kompetenter Zellen.....	51
3.3.1.4 Transformation	52
3.3.2 Eukaryotische Zellen	52
3.3.2.1 Kulturbedingungen	52
3.3.2.2 Lagerung	52
3.3.2.3 Transiente Transfektion	53
3.3.2.4 Zellernte und Auswertung der Transfektion	53
3.4 Studienpopulationen	54
3.5 <i>In silico</i> Untersuchungen	54
3.6 Statistische Methoden	54
4. Ergebnisse	55
4.1 Genomische Konstellation des <i>RhoA</i>-Genlokus.....	55
4.2 Endogene <i>RhoA</i> und <i>TCTA</i> Expression.....	56
4.3 Identifizierung von Transkriptionsstartstellen des <i>RhoA</i>- und <i>TCTA</i>-Gens.....	57
4.4 Identifizierung genetischer Varianten im <i>RhoA</i>- und <i>TCTA</i>- Promotor	59
4.5 Reporteranalysen	61
4.5.1 <i>RhoA</i> - und <i>TCTA</i> -Promotordeletionskonstrukte.....	62
4.5.2 Mutation der TATA-Box2	67
4.5.3 Deletion der TATA-Boxen	68
4.5.4 Veränderung des TATA-Box Spacings.....	72

4.5.5 Tausch der TATA-Box flankierenden Bereiche	75
4.6 EMSA-Analysen	78
4.7 Methylierungsstatus	80
5. Diskussion	82
5.1 <i>RhoA</i> und <i>TCTA</i> bilden eine divergentes Genpaar.....	82
5.2 <i>RhoA</i> und <i>TCTA</i> besitzen multiple Transkriptions- startstellen	84
5.3 <i>RhoA</i> und <i>TCTA</i> sind positiv coreguliert	85
5.4 Einfluss genetischer Varianten auf transkriptionelle Ereignisse	87
5.5 Die TATA-Box Variante -112T>C beeinflusst die transkrip- tionelle Aktivität von <i>RhoA</i> und <i>TCTA</i>	89
5.6 Beide TATA-Boxen in unveränderter Distanz zueinander sind erforderlich für eine ausreichende <i>RhoA</i> Transkription.....	91
5.7 Die TATA-Box flankierenden Bereiche nehmen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von <i>RhoA</i>	93
5.8 EMSA-Untersuchungen zeigen ein differentielles Bindungs- muster für das -112T- und -112C- Allel	94
5.9 <i>RhoA</i> und <i>TCTA</i> sind mit inflammatorischen Erkrankungen assoziiert	95
5.10 Besitzt <i>TCTA</i> eine Proteinfunktion?	96
5.11 Schlussfolgerung	98
6. Ausblick	100
7. Referenzen	102
8. Anhang	111
Danksagung	117
Lebenslauf	118
Publikationen und Kongressbeiträge	119

Abkürzungen

A

AS	Aminosäure
<i>att</i> -site	„Attachment-site“

B

BCA	„Bicinchoninic acid“
bp	Basenpaar
BRE	„TFIIB recognition element“

C

CaCl ₂	Calciumchlorid
CAGE	„Cap analysis of gene expression“
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	„Complementary DNA“
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoCl ₂	Cobalt (II)-chlorid
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen

D

ddUTP	Didesoxyuraciltriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleic acid“
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPE	„Downstream promoter element“
DTT	1,4-Dithiothreitol

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
EMSA	„Electrophoretic mobility shift assay“
ExoI	Exonuklease I

F

FACS	„Fluorescence activated cell sorting“
fmol	Femtomol

G

g	g-Beschleunigung
GABPA	„GA-binding protein alpha chain“
GAP	„GTPase-activating protein“
GDP	„Guanosindiphosphat“
GEF	„Guanin-nucleotide exchange factor“
GDI	„GDP dissociation inhibitor“
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guaninnukleotid-bindendes Protein

H

H	Haplotyp
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	„High pressure liquid chromatography“
hrp27	„Human ribosomal protein 27“

I

ICAM-1	„Intercellular adhesion molecule-1“
Inr-Element	Initiator-Element

K

kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
KHE	Koronare Herzerkrankung
KOAc	Kaliumacetat
KOH	Kaliumhydroxid

L

LB	„Lysogeny broth“
LDL	Low density lipoprotein

M

M	Molare Masse
MCS	„Multiple cloning site“
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
miRNA	microRNA
mM	Millimolar
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid
MolProMD	Münster Molecular Functional Profiling for Mechanism Detection
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MRTF	„Myocardin-related transcription factor“

N

NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ MoO ₄	Natriummolybdat
NF-κB	„Nuclear factor "κ-light-chain-enhancer“ of activated B-cells“
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	Nicht signifikant

O

OD	Optische Dichte
oxLDL	Oxidiertes LDL

P

PCR	„Polymerase chain reaction“
PBS	„Phosphate buffered saline“
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PMA	Phorbo-12-myristat-13-acetat
pmol	Picomol

R

5'-RACE	„Rapid-amplification of 5'-cDNA ends“
RANKL	„Receptor activator of NF-κB ligand“
RbCl	Rubidiumchlorid
rfc	„Reading frame cassette“
RLU	„Relative light units“
RNA	„Ribonucleic acid“
rpm	„Rounds per minute“
RT-PCR	„Reverse transcriptase PCR“

S

SAP	„Shrimp alkaline phosphatase“
SCLC	„Small cell lung cancer“
sec	Sekunde
siRNA	Small interfering RNA
snoRNA	Small nucleolar RNAs
SNP	„Single nucleotide polymorphism“
SRF	„Serum response factor“
SV40	Simian-Virus 40

T

TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAF	TBP-assoziierter Faktor
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TCTA	„T-cell leukemia translocation-associated“

TdT	Terminale Desoxynukleotid Transferase
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindestelle
T _m	Schmelztemperatur
TSS	Transkriptionsstartstelle

U

U	„Unit“
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett

V

V	Volt
VCAM-1	„Vascular cell adhesion molecule-1“

W

WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp

Abstract

Atherosclerotic cardiovascular disease (CVD) remains the leading cause of deaths worldwide. Besides environmental factors, genetic predispositions strongly determine CVD risk. The small GTPase RhoA plays an important role in various cellular functions that are involved in atherogenesis, such as vascular smooth muscle cell differentiation, cell adhesion and motility and therefore constitutes a candidate for CVD.

The genes *RhoA* and *TCTA* (T-cell leukemia translocation-associated gene) are located on chromosome 3p21 in a divergent orientation, separated by a stretch of 112 bp promoter region. Within this study, it could be shown that both genes were expressed simultaneously in the vascular endothelial cell line EA.hy926 both with (8-Br-cAMP [0,5 mM], PMA [10^{-8} M]) and without stimulation. Both *RhoA* and *TCTA* contain more than one transcription start site (TSS) resulting in different lengths of the transcripts' 5'-UTR. All TSS were utilized equally, with the exception of *RhoA*- and *TCTA*-TSS1, which is used less frequently. Sequencing of 1600 bp of the *RhoA* and *TCTA* 5'-flanking regions in 60 patients of the MolProMD study led to the identification of two variants (-923G>A [rs6779524]; -1338T>C [rs6784820]) in the 5'-flanking region of *RhoA* and three variants (-1112C>T [rs4855877]; -1216G>A [rs73088137]; -619G>A [novel]) in the 5'-flanking region of *TCTA*. One additional common nucleotide substitution (-112T>C [rs940045]) in the 112 bp promoter region separating *RhoA* and *TCTA* modifies one of the two TATA boxes located in this region, so that the TATA box consensus sequence is scrambled. By generating a series of *RhoA* and *TCTA* 5'-promoter deletion constructs bearing the -112T and -112 C allele, it could be shown that the 112 bp promoter region is bidirectionally active and that the genetic variant in this region is functional in both directions as it significantly reduced the transcriptional activity of the promoter constructs. TATA box mutations and deletions in the promoter portions, an altered TATA box spacing and altered TATA box flanking regions showed that transcriptional activity especially of *RhoA* depends on a distinctive nucleotide composition in the bidirectional promoter region. Furthermore, EMSA experiments revealed a differential binding pattern of nuclear proteins for probes harboring the T allele and C allele. In addition, the CpG islands of the *RhoA* and *TCTA* 5'-flanking region were methylated differentially. Thus,

the molecular analysis of the promoter region separating *RhoA* and *TCTA* revealed a bidirectional promoter system, in which the core assembly site of the basal transcription apparatus is altered by a common functional SNP.

Atherosklerotisch bedingte, kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) sind weltweit die führende Todesursache. Ihre Manifestierung und Progression wird, neben Umweltfaktoren, stark durch genetische Komponenten beeinflusst. Die kleine GTPase RhoA stellt aufgrund ihrer Beteiligung an zellulären, atherosklerotische Ereignisse begünstigenden Prozessen (u. a. Differenzierung vasculärer glatter Muskelzellen, Zellmigration und -adhäsion) ein Kandidatengen für CVD dar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch 112 bp Promotorregion getrennten, auf Chromosom 3p21 in einer divergenten Orientierung lokalisierten Gene *RhoA* und *TCTA* (T-cell leukemia translocation-associated gene) in der vaskulären endothelialen Zelllinie EA.hy926 Zellen unter nicht-stimulatorischen sowie stimulatorischen Bedingungen (8-Br-cAMP- [0,5 mM] und PMA-[10-8M]) synchron/parallel transkribiert werden. Beide Gene besitzen mehr als eine Transkriptionsstartstelle (TSS), die auf die Länge der 5'-UTR Einfluss nehmen und, mit Ausnahme der im geringeren Maße verwendeten ersten TSS, gleichmäßig genutzt wurden. Durch Amplifikation und Resequenzierung von 1600 bp der 5'-flankierenden Region des *RhoA*- und *TCTA*-Gens bei 60 Patienten der MolProMD-Studie konnten zwei bereits bekannte SNPs (-923G>A [rs6779524]; -1338T>C [rs6784820]) in der 5'-regulatorischen Region des *RhoA*-Gens und zwei bekannte (-1112C>T [rs4855877]; -1216G>A [rs73088137]) sowie ein bisher nicht beschriebener SNP (-619G>A) in der 5'-regulatorischen Region des *TCTA*-Gens lokalisiert werden. In der von beiden Genen eingerahmten Promotorregion konnte zudem eine T zu C Substitution an Position -112 bezogen auf die *RhoA*-TSS1 bzw. -1 bezogen auf die *TCTA*-TSS1 [rs940045] bestätigt werden. Diese verändert eine der zwei in dieser Region lokalisierten TATA-Boxen, so dass die TATA-Box Consensussequenz zerstört wird. Durch serielle 5'-Deletionsassays mit trunkierten *RhoA*- und *TCTA*-Promotorkonstrukten konnte gezeigt werden, dass die 112 bp große Region zwischen dem *RhoA*- und dem *TCTA*-Gen bidirektional aktiv und der SNP [rs940045] in dieser Region bidirektional funktionell ist, indem er die transkriptionelle

Aktivität der Promotordeletionskonstrukte signifikant reduzierte. Desweiteren konnte durch i) Mutation und ii) Deletion der TATA-Box Motive, iii) Veränderung des TATA-Box Spacings sowie iv) Veränderung der TATA-Box flankierenden Regionen gezeigt werden, dass insbesondere für die transkriptionelle Aktivierung des *RhoA*-Gens der gemeinsam genutzte Promotorbereich zwischen *RhoA* und *TCTA* in unveränderter Sequenz vorliegen muss. Zudem zeigten das -112T- bzw. -112C-Allel in EMSA-Untersuchungen ein unterschiedliches Bindungsmuster nukleärer Proteine, sowie die CpG-Inseln in der *RhoA* und *TCTA* 5'-flankierenden Region in genomischer DNA einen differentiellen Methylierungsstatus. Folglich stellt die hier molekularbiologisch untersuchte Region zwischen den Genen *RhoA* und *TCTA* ein basengenau reguliertes bidirektionales Promotorsystem dar, dessen Assemblierungsstelle für die basale Transkriptionsmaschinerie durch einen bidirektional funktionellen SNP beeinflusst wird.

1. Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Unter dem Oberbegriff der kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) werden Entitäten wie koronare Herzkrankheiten (KHK), der Myokardinfarkt und zerebrovaskuläre Erkrankungen (z.B. Schlaganfall) zusammengefasst, deren Ursache häufig auf atherosklerotische Veränderungen der Arterienwände zurückzuführen ist (Brand-Herrmann, 2008).

CVD sind weltweit die Todesursache Nummer 1 (Kotseva et al., 2009). Vorläufige Daten zeigen, dass 34,2% der weltweiten Todesfälle im Jahr 2006 auf die Folgen von CVD zurückzuführen sind. Dabei nimmt die Tendenz der Erkrankungs- und Todesfälle durch CVD weiter zu. So ist im Zeitraum von 1995 bis 2005 die Todesrate um 26,4% gestiegen (Llyod-Jones et al., 2009). Schätzungen gehen davon aus, dass im Jahre 2030 fast 23,6 Millionen Menschen weltweit an CVD sterben werden (WHO fact sheet, N°317). Dies führt zu immensen direkten und indirekten Kosten im Gesundheitswesen sowie in der Wirtschaft. Für das Jahr 2009 werden diese allein für die USA auf 475,3 Millionen Dollar geschätzt (Llyod-Jones et al., 2009).

1.1.1 Atherosklerose

Atherosklerose ist nach Definition der WHO eine Erkrankung der Arterien, die progressiv aufgrund der Akkumulation von Lipiden, Makrophagen, vaskulären glatten Muskelzellen sowie Bindegewebe und Kalziumablagerungen zu einer inflammatorischen Veränderung der Tunica Intima und der Tunica Media führt (Ross, 1999). Durch die Bildung eines sogenannten atherosklerotischen Plaques kommt es in der Folge zu einer Verengung der Arterien (Aorta, koronare Gefäße, Carotiden etc.). Dies kann in einer chronischen Minderdurchblutung der durch sie versorgten Organe resultieren, bzw. bei Ruptur eines Plaques und Kontakt des lipidhaltigen Kerns mit dem Blutstrom zur Anlagerung von Thrombozyten und in der Folge zum akuten Verschluss arterieller Gefäße führen (akutes Koronarsyndrom). Die meisten Myokardinfarkte und Schlaganfälle sind auf solche atherosklerotische Ereignisse zurückzuführen (WHO fact sheet, N°317).

Zwei Hypothesen, die „response-to-injury“-Hypothese sowie die „lipoprotein-induced-atherosclerosis“-Hypothese, bieten einen Erklärungsansatz zur Initialisierung atherosklerotischer Plaques. Während die von Ross geprägte und allgemein anerkannte „response-to-injury“-Hypothese eine Verletzung der Endothelzellschicht durch z.B. mechanische Verletzung, Schädigung durch bakterielle Toxine, Angriffe durch Viren oder Antigen-Antikörper-Reaktionen am Beginn der Plaque-Bildung sieht, postuliert Goldstein in der „lipoprotein-induced-atherosclerosis“-Hypothese oxidativ modifiziertes LDL als Ursache für die Initiierung der Plaque-Bildung, sieht die Verletzung des Endothels hingegen lediglich als Teilschritt (Goldstein und Brown, 1977; Ross, 1979).

Die Bildung atherosklerotischer Plaques ist jedoch, unabhängig von den oben beschriebenen Hypothesen zur Initialisierung, auf die Einwanderung von LDL aus

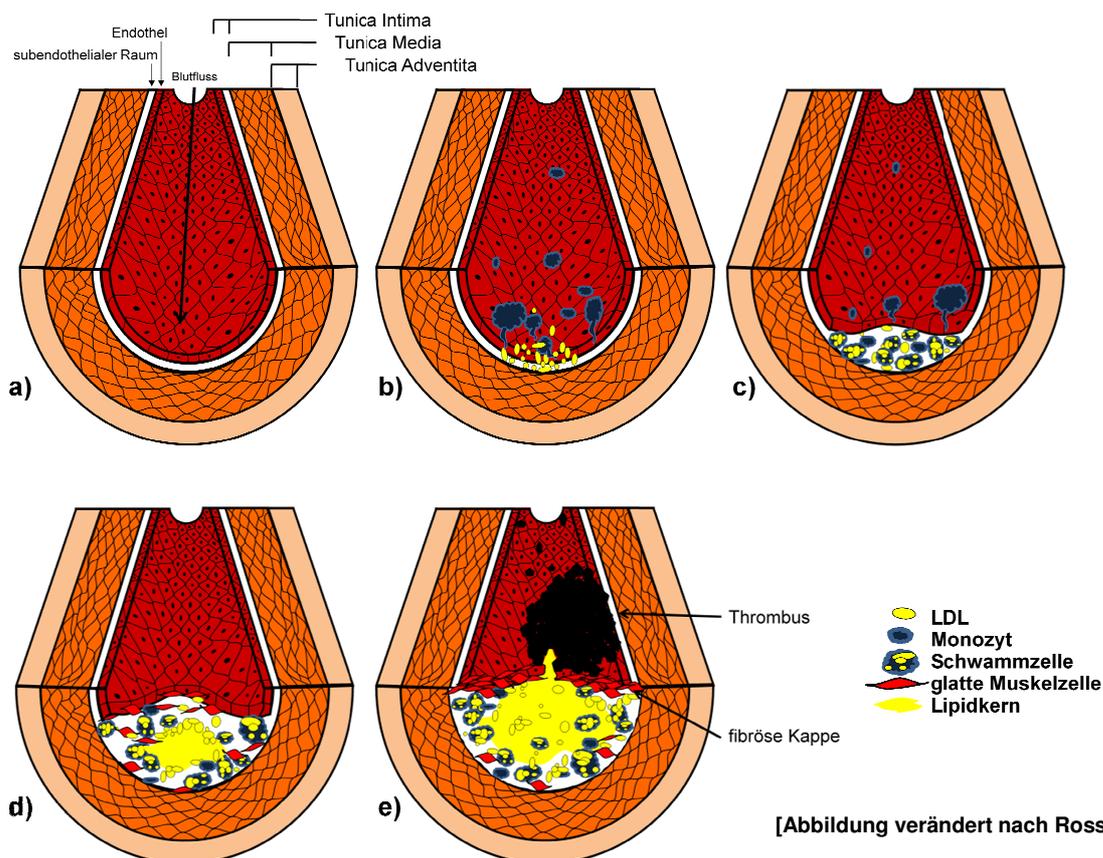


Abb. 1.1.1: Schematische Darstellung der Atherogenese. a) Gesunde Arterienwand. b) Verursacht durch eine Dysfunktion des Endothels kommt es zur Einwanderung von LDL und Monozyten aus dem Blutstrom in den subendothelialen Raum. c) Die Monozyten differenzieren zu Makrophagen aus und sterben nach ungehemmter Aufnahme von oxLDL ab. Der Fettstreifen entsteht. d) Durch Einwanderung von glatten Muskelzellen kommt es zur Bildung des Atherosoms mit einem klar abgegrenzten Lipidkern und einer aus glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix bestehenden äußeren Kappe. e) Nach Ruptur der fibrösen Kappe kommt es zur Bildung eines Thrombus und zum Verschluss des Gefäßes mit den Folgen eines Infarktereignisses.

dem Blutstrom in die Tunica Intima und seine anschließende oxidative Veränderung zurückzuführen (Abbildung 1.1.1). Dies resultiert in einer Expression von Adhäsionsmolekülen durch die Endothelzellen der Gefäße, einer dadurch verursachten Anhaftung von Monozyten an die Endothelzellschicht, deren anschließende Diapese in die Tunica Intima sowie ihre Differenzierung zu Makrophagen. Die differenzierten Makrophagen wiederum nehmen ungehemmt oxLDL auf, sterben ab und tragen so zur Formung des charakteristischen Fettstreifens („fatty streak“) als erste sichtbare morphologische Veränderung bei. Im weiteren Verlauf kommt es zur Einwanderung glatter Muskelzellen aus der Tunica Media in die Tunica Intima und in der Folge zur Bildung des Atheroms mit einem klar abgegrenzten Lipidkern und einer aus glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix bestehenden äußeren Kappe (Kher und Marsh, 2004; Falk, 2006). Im Laufe von Jahren bis Jahrzehnten wird das Atherom fortlaufend fibrotisch durchsetzt. Unter bestimmten Bedingungen („shear-stress“) kann es durch die Dysbalance weicher und harter Wandveränderungen zur Ruptur des Atheroms und damit zum Infarkt ereignis kommen.

1.1.2 Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen

Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung von der CVD zählen, neben der genetischen Komponente, dem Alter und dem Geschlecht, Bluthochdruck, Dyslipidämie, Adipositas, Diabetes mellitus und ein ungesunder Lebensstil (Bewegungsmangel, ungesunde Ernährung, Tabakkonsum) (WHO fact sheet, N°317).

Die genetische Prädisposition für die Entwicklung von CVD konnte durch mehrere große, epidemiologische Studien eindeutig belegt werden. Eine Untersuchung an 21.000 schwedischen Zwillingen zeigte, dass das Risiko an KHK zu sterben bei monozygoten im Vergleich zu dizygoten Zwillingen um das 4-8-fache erhöht ist, wenn einer der Zwillinge bereits vor dem 55. Lebensjahr an dieser Erkrankung verstorben ist (Marenberg et al., 1994). Zudem stellt die CVD eines Eltern- bzw. eines Geschwisterteils einen unabhängigen Prädiktor für die Entwicklung von CVD dar. So ist das Risiko, an CVD zu erkranken um das 2-fache erhöht, wenn bereits ein Eltern- bzw. Geschwisterteil erkrankt ist (Lloyd-Jones et al., 2004; Murabito et al., 2005).

1.1.3 Multifaktorieller Charakter kardiovaskulärer Erkrankungen

Die CVD zählt zu den multifaktoriellen, polygenetischen Erkrankungen, an denen mehrere Gene und Genloci mit komplexen Vererbungsmustern beteiligt sind. Nur in sehr seltenen Fällen liegen solche Mutationen zugrunde, die ihrem Träger ein hohes kardiovaskuläres Risiko verleihen und nach Mendelschen Gesetzen, mit einer einfachen Genotyp-Phänotyp-Beziehung, in Familien segregieren. In der Regel sind häufige („common“) Polymorphismen mit nur schwachem Einfluss auf individueller Ebene, jedoch aufgrund ihrer Häufigkeit großem Einfluss auf Populationsebene ursächlich für die genetische Prädisposition zur Entwicklung von CVD (Herrmann und Paul, 2001; Cambien und Tiret, 2007).

Mit über 11 Millionen (minore Allelfrequenz >1%) sind „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) die häufigsten Sequenzvarianten im humanen Genom (Buckland, 2006). Die meisten SNPs sind in bisher als nicht funktionell angesehenen Genomregionen lokalisiert und werden daher als neutrale Marker bezeichnet. Polymorphismen in kodierenden oder regulatorischen Regionen hingegen können die Proteinsequenz bzw. das Genexpressionslevel beeinflussen und sich somit in phänotypischen Effekten manifestieren (Cambien und Tiret, 2007).

Aufgrund der großen Zahl an SNPs im humanen Genom sind multiple Kombinationen möglich. Dabei kann das simultane Auftreten von Risikoallelen mit spezifischen Interaktionen in Form von Addition und/oder Multiplikation zu einer individuellen Risiko-Allel-Akkumulation führen, die, zusammen mit begünstigenden Umweltfaktoren (Übergewicht, Tabakkonsum, Alter, Geschlecht, etc.) und weiteren modifizierenden Genen, die Prävalenz und Ausprägung von CVD beeinflussen (Herrmann und Paul, 2002; Cambien und Tiret, 2007). Dies macht die Erforschung der genetischen Grundlage CVD zu einer immerwährenden Herausforderung.

1.1.4 Erforschung genetischer Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen

Für die Untersuchung der genetischen Grundlage komplexer, polygenetischer Erkrankungen wie CVD werden grob vereinfacht zwei verschiedene Ansätze verfolgt: (1) Assoziationsstudien und (2) Kopplungsstudien. Beide Untersuchungen wiederum können in Form des (a) Kandidatengenansatzes und (b) genomweiten Ansatzes durchgeführt werden (Brand-Herrmann, 2008).

Sowohl Assoziationsstudien als auch Kopplungsstudien nutzen genetische Marker, die in mindestens zwei Allelen in der zu untersuchenden Population auftreten. Die am häufigsten genutzten genetischen Marker sind SNPs. Sie erfüllen die erforderlichen Eigenschaften (I) der gleichmäßigen Verteilung über das Genom, um eine Aussagekraft über den genetischen Einfluss aller chromosomalen Bereiche treffen zu können und (II) der möglichst hohen Heterozygotierate und damit Aussagekraft. Da das Genom in Segmente, sogenannte Haplotypblöcke gegliedert ist, die in der Regel als Einheit vererbt werden, können mit Hilfe von Tag-SNPs Aussagen über alle im selben Haplotypblock vererbten SNPs getroffen werden (Abbildung 1.1.4) (Cichon et al., 2002; Hirschhorn und Daly, 2005).

Bei Assoziationsstudien wird durch Typisierung möglichst gleichmäßig über das Genom bzw. in den zu untersuchenden Kandidatengenregionen verteilter genetischer Marker überprüft, welcher dieser genetischen Marker überdurchschnittlich häufig bei z.B. Erkrankten auftritt bzw. fehlt und so mit der Erkrankung assoziiert ist (Fall-Kontroll-Studie). Dieser Ansatz erfordert für eine signifikante Aussagekraft jedoch sehr hohe Probenzahlen (mindestens $n=1000$ pro Gruppe) und ist noch immer sehr kostenintensiv (Hirschhorn und Daly, 2005; Arnett et al., 2007).

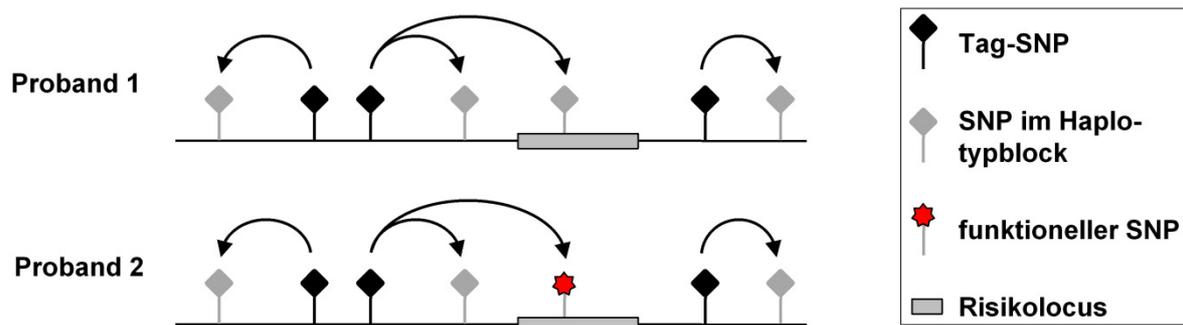


Abb. 1.1.4: Schematische Darstellung genetischer Marker. Die am häufigsten genutzten genetischen Marker sind SNPs, da sie die Eigenschaften (I) der gleichmäßigen Verteilung über das Genom sowie (II) der möglichst hohen Heterozygotierate erfüllen. Dargestellt ist der putative Ausschnitt einer genomischen Region von Proband 1 und 2 sowie die in diesem Bereich auftretenden Tag-SNPs. Durch sie können Aussagen über alle im selben Haplotypblock vererbten SNPs und somit u. a. funktionellen SNPs getroffen werden. [Abbildung verändert nach Cambien und Turet, 2007].

Kopplungsstudien nutzen genetische Marker sowie phänotypische Daten und Stammbaumdaten von Familien mit gesunden und erkrankten Mitgliedern, um zu überprüfen, welcher der über das Genom bzw. in den zu untersuchenden Kandidatengenregionen verteilten Marker häufiger als es der Zufall erwarten ließe gemeinsam mit der Erkrankung vererbt wird und somit gekoppelt vorliegt. Dabei wird sich auf die Annahme gestützt, dass das krankheitsbeeinflussende Gen in räumlicher Nähe zum genetischen Marker liegen muss (Ziegler, 2002; Hirschhorn und Daly, 2005; Arnett et al., 2007).

Kopplungsstudien wurden insbesondere erfolgreich bei der Erforschung der genetischen Grundlage sowohl mono- als auch oligogenetischer Erkrankungen genutzt, zeigten jedoch eine geringere Aussagekraft bei komplexen, polygenetischen Erkrankungen. Zudem wird eine große Anzahl von Familien sowie deren genetische Daten und Stammbaumdaten benötigt (Ziegler, 2002; Hirschhorn und Daly, 2005; Arnett et al., 2007).

Assoziations- und Kopplungsstudien können sowohl in einem genomweiten Ansatz als auch in einem Kandidatengenansatz erfolgen. Während genomweite Analysen einen hypothesenfreien Ansatz darstellen, der es ermöglicht, bisher nicht mit der Erkrankung assoziierte Risikoloci zu identifizieren, basiert der Kandidatengenansatz auf Kenntnissen über die biologische Beteiligung eines Genprodukts am pathologischen Phänotyp oder den Ergebnissen vorheriger Kopplungs-, Assoziations- oder Genexpressionsstudien (Brand-Herrmann, 2008).

Ist ein Risikolocus identifiziert, folgen in der Regel sehr aufwändige funktionelle Untersuchungen (Vischer et al., 2007; Dördelmann et al., 2008; Hagedorn et al., 2009). Durch Resequenzierung der identifizierten Region bei Patienten- und Kontroll-DNA werden Varianten überprüft, die bei einer der Gruppen überrepräsentativ häufig auftreten. Diese werden auf ihren funktionellen Einfluss auf z.B. Transkriptionseffizienz, Transkriptstabilität oder Proteinfaltung und -aktivität analysiert (Brand-Herrmann, 2008).

1.2 Kontrolle der Genexpression

Die Regulation der Expression eukaryotischer Gene erfolgt auf fünf Kontrollebenen (Abbildung 1.2). Die Auflockerung der Chromatinstruktur (1) ermöglicht die Anlagerung aktivierender und reprimierender Transkriptionsfaktoren (TF) an die regulatorischen Regionen (2) sowie die Assemblierung der basalen Transkriptionsmaschinerie am Core-Promotor (3) des zu transkribierenden Gens. Durch die Rekrutierung von Co-Aktivatorproteinen bzw. –proteinkomplexen durch die DNA-bindenden Faktoren (4) erfolgt eine Interaktion zwischen proximalen TF und der basalen Transkriptionsmaschinerie. Dies resultiert in einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität. Als übergeordnete Kontrollebene wirken epigenetische Mechanismen (5).

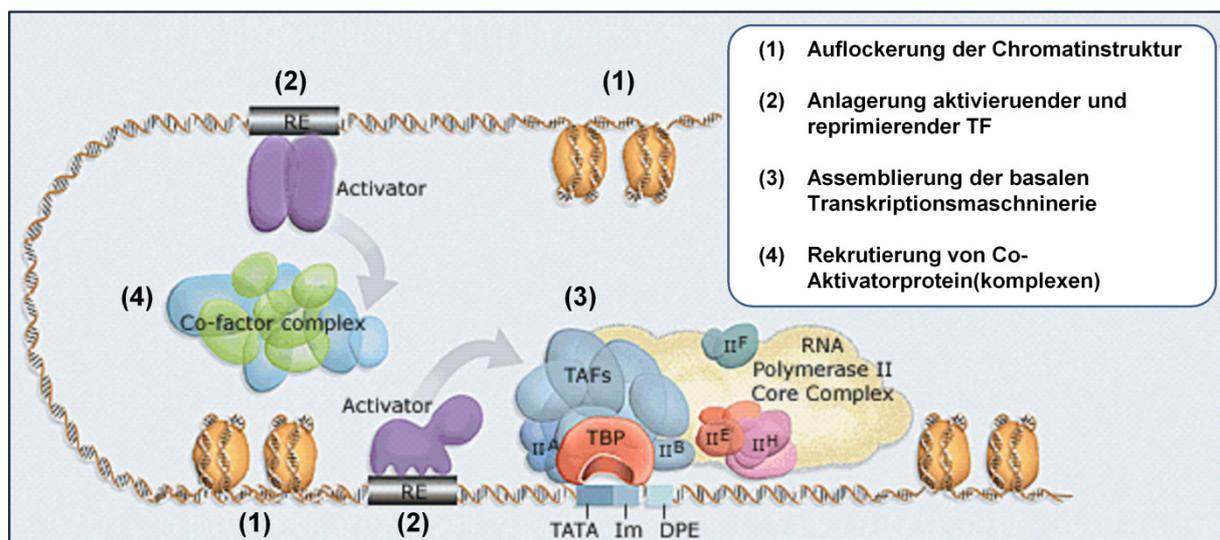


Abb. 1.2 Kontrollebenen der eukaryotischen Genexpression. Durch Auflockerung der Chromatinstruktur (1) werden zum einen regulatorische Regionen zugänglich für aktivierende und reprimierende TF (2), zum kann nun die Assemblierung der basalen Transkriptionsmaschinerie am Core-Promotor (3) erfolgen. Die volle transkriptionelle Aktivität wird jedoch erst durch die Rekrutierung von Co-Faktor(komplexen) und der daraus resultierenden Interaktion proximaler Promotorbereiche mit der basalen Transkriptionsmaschinerie (4) erreicht. [Abbildung verändert nach R. Tjian, Homepage des Howard Hughes Medical Institute].

1.2.1 Assemblierung der basalen Transkriptionsmaschinerie

Für die Initiation der Transkription ist die Bildung eines Prä-Initiationskomplexes im Bereich der Transkriptionsstartstelle (TSS) erforderlich. Er ist aufgebaut aus den generellen Transkriptionsfaktoren TFIIB, -D, -E, -F und -H sowie der RNA-Polymerase II und ermöglicht letzterer die Anlagerung an den Core-Promotor.

1.2.1.1 Core-Promotor

Als Core-Promotor wird die Region etwa 40 Nukleotide stromaufwärts sowie stromabwärts der TSS bezeichnet (Kadonaga, 2002). Sie dient als Assemblierungsstelle der basalen Transkriptionsmaschinerie und definiert den Startpunkt und die Richtung der Transkription. Untereinheiten der basalen Transkriptionsmaschinerie, insbesondere solche des generellen Transkriptionsfaktors TFIID, interagieren mit *cis*-regulatorischen Sequenzmotiven dieser Region, den Core-Promotor-Elementen. Zu ihnen gehören u.a. TATA-Boxen, Initiator-Elemente (Inr-Elemente), „downstream promoter elements“ (DPEs) und „TFIIB recognition elements“ (BREs). Im Unterschied zu *cis*-regulatorischen Elementen des proximalen Promotors haben einige Core-Promotor-Elemente, wie das DPE, eine genau festgelegte Position im Bezug zur TSS, und eine Abweichung dieser Position um nur ein Nukleotid resultiert in einer starken Veränderung der Transkriptionsaktivität (Smale und Kadonaga, 2003; Maston et al., 2006; Sandelin et al., 2007).

Der Core-Promotor stellt eine dynamische Komponente der Transkriptionsregulation dar. Folglich unterscheiden sich Gene in der Art und Kombination ihrer Core-Promotor-Elemente. TATA-Boxen sind beispielsweise nur in ca. 10-20%, Inr-Elemente nur in etwa der Hälfte der humanen proteinkodierenden Gene vertreten. Zudem besitzen einige Core-Promotoren keine bekannten Elemente (Juven-Gershon et al., 2008).

1.2.1.2 TATA-Box

Durch Goldberg 1979 beschrieben, ist die TATA-Box das erste identifizierte Core-Promotor-Element. Sie besitzt die Konsensus-Sequenz 5'-TATAAA-3', jedoch können auch zahlreiche andere A/T-reiche Regionen als TATA-Box fungieren. Nach dem gängigen Konzept leitet die TATA-Box sequenzspezifisch die generellen TF an die bevorzugte Stelle der Transkriptionsinitiation. Lokalisiert ist sie bei Säugern in der Regel an Position -30 bp bis -25 bp bezogen auf die TSS. Die Veränderung ihrer Position kann zur Verschiebung der TSS führen. Für eine präzise Transkriptionsinitiation ist neben der TATA-Box zudem ein Inr-Element erforderlich. Gebunden wird die TATA-Box durch das „TATA-Box bindende Protein“ (TBP) des TFIID (Butler und Kadonaga, 2002; Smale und Kadonaga, 2003; Sandelin et al., 2007).

TATA-Boxen nehmen nur geringen Einfluss auf die Richtung der Transkription. Diese wird hauptsächlich durch die relative Position von Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) des proximalen Promotors, der TATA-Box und anderen Core-Promotor-Elementen bestimmt (Smale und Kadonaga, 2003).

Core-Promotoren können zwei differentiell genutzte TATA-Boxen besitzen. Häufig weist eine der TATA-Boxen eine kanonische, die andere eine nicht kanonische Sequenz auf. Die differentielle Nutzung erfolgt in der Regel durch spezifische Enhancer, die unterschiedliche „TBP-assoziierte Faktoren“ (TAFs) des TFIID rekrutieren (Butler und Kadonaga, 2002).

1.2.1.3 Aufbau des Prä-Initiationskomplexes

In vitro wird der Aufbau des Prä-Initiationskomplexes eingeleitet durch den Faktor TFIID, ein aus dem TBP und verschiedenen TAFs bestehender Komplex (Abbildung 1.2.1.3). Dieser erkennt und bindet Core-Promotor-Elemente wie die TATA-Box. Die Bindung von TFIID wird durch die Anlagerung von TFIIB stabilisiert. Geleitet durch den Faktor TFIIF tritt die RNA-Polymerase II dem Komplex bei, gefolgt durch den Faktor TFIIE, der die Bindung von TFIIH unterstützt. TFIIH besitzt eine Helikase- sowie Kinase-Funktion. Die Helikase-Funktion öffnet die doppelsträngige DNA im Bereich der TSS, die Kinase-Funktion phosphoryliert die carboxyterminale Domäne

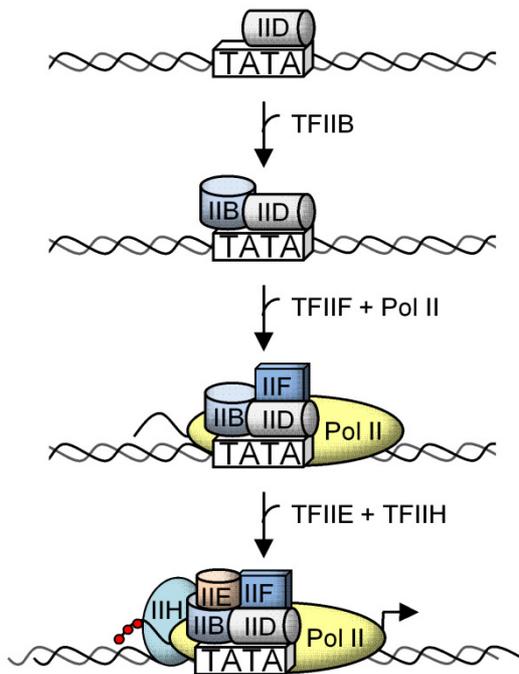


Abb. 1.2.1.3: Assemblierung der basalen Transkriptionsmaschinerie *in vitro*. Der generelle Transkriptionsfaktor TFIID erkennt und bindet, stabilisiert durch den Faktor TFIIB, das TATA-Box Motiv. Geleitet durch den Faktor TFIIF tritt die RNA-Polymerase II dem Komplex bei. Es folgt der Faktor TFIIE, der die Anlagerung von TFIIH unterstützt. TFIIH besitzt sowohl eine DNA-Helikase-Funktion, die die doppelstängige DNA im Bereich der TSS öffnet, als auch eine Kinase-Funktion, die den carboxyterminalen Schwanz der RNA-Polymerase II phosphoryliert. Dies ermöglicht die Freisetzung der RNA-Polymerase II aus dem Prä-Initiationskomplex sowie den Start der Transkription.

der RNA-Polymerase II und ermöglicht ihr so die Freisetzung aus dem Prä-Initiationskomplex sowie den Start der Transkription (Orphanides et al., 1996; Kornberg, 2007).

In vivo liegt die RNA-Polymerase II beladen mit den generellen Transkriptionsfaktoren TFIIB, -E, -F und -H vor und interagiert als Holoenzym mit dem am Core-Promotor angelagertem Faktor TFIID (Orphanides et al., 1996).

1.2.2 Anlagerung der TF an den proximalen Promotor und Rekrutierung von Co-Aktivatoren

Der Komplex aus RNA-Polymerase II und den generellen TF ermöglicht lediglich eine basale Transkription. Erst durch die Interaktion von Aktivatoren und Co-Aktivatoren des proximalen Promotors sowie von Enhancern mit der basalen Transkriptionsmaschinerie erfolgt eine Steigerung und Regulation der Transkription.

1.2.2.1 Proximaler Promotor

Als proximaler Promotor wird die Region direkt stromaufwärts des Core-Promotors bezeichnet. Sie erstreckt sich in etwa von Position -40 bp bis -250 bp bezogen auf die TSS (Kadonaga, 2002). Im Bereich des proximalen Promotors befinden sich Cluster von TFBS, die durch sowohl aktivierende als auch reprimierende sequenzspezifische TF erkannt und gebunden werden und so zu funktionellen Bindestellen werden. Die DNA-bindenden TF sowie durch sie rekrutierte Co-Faktoren nehmen durch die Interaktion mit dem Prä-Initiationskomplex bzw. durch Veränderung der Chromatinstruktur Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität. Dabei können DNA-bindende TF mit zahlreichen anderen TF und Co-Faktoren wechselwirken. Die zu einem gegebenen Zeitpunkt verfügbaren Kombinationen an TF, deren Interaktion untereinander, mit Co-Faktoren sowie der basalen Transkriptionsmaschinerie bestimmen, in welcher Frequenz und somit Stärke die Transkription initiiert wird (Kadonaga, 2004; Maston et al., 2006).

1.2.2.2 Enhancer, Silencer und Insulatoren

Enhancer sind entfernungs- und orientierungsunabhängige, eigenständige Module, die in der Regel Cluster von TFBS für Aktivatorproteine enthalten. Sie liegen mitunter einige 100 kb von der TSS entfernt, können jedoch auch in Introns lokalisiert sein. Enhancer können mehrere Gene beeinflussen, ein Gen kann jedoch auch durch mehrere Enhancer reguliert werden. Sie kontrollieren häufig transkriptionelle Ereignisse im räumlichen und zeitlichen Zusammenhang. Silencer ähneln in ihren Eigenschaften Enhancern, wirken jedoch reprimierend auf transkriptionelle Ereignisse. Insulatoren hingegen stellen Grenzmodule dar, die chromosomale Regionen in Abschnitte voneinander unabhängiger Transkriptionsaktivität gliedern. Indem sie Enhancer-Promotor-Kommunikationen blockieren bzw. die Ausbreitung reprimierender Chromatinformen verhindern, schützen sie Gene vor der Beeinflussung durch die Transkriptionsaktivität benachbarter Gene. Insulatoren üben ihre Funktion in Abhängigkeit ihrer Funktion, jedoch unabhängig von ihrer Orientierung aus (Maston et al., 2006).

1.2.3 Epigenetische Mechanismen

Unter dem Begriff der Epigenetik werden vererbare Veränderungen zusammengefasst, die nicht allein auf die DNA-Sequenz zurückzuführen sind. Zu den bedeutendsten epigenetischen Prozessen zählen Histonmodifikationen und DNA-Methylierungen. Da Histonmodifikationen und DNA-Methylierungen sich gegenseitig bedingen, hat eine Zelle zu einem gegebenen Entwicklungszeitpunkt ein unverwechselbares Histon- und DNA-Methylierungsprofil. Dieses unterliegt jedoch während der Entwicklung und Differenzierung einer ständigen Veränderung (Ikegami et al., 2009; Whitehead et al., 2009; Kim et al., 2009).

1.2.3.1 Histonmodifikationen

Die genomische DNA eukaryotischer Zellen liegt zu einem Großteil als transkriptionsinaktives Chromatin vor. In diesem Zustand windet sich ein DNA-Bereich von 147 bp um die jeweils in zweifacher Kopie vorliegenden Histone H2A, H2B, H3 und H4 und bildet zusammen mit dem diesen Komplex aufliegenden Histon H1 die Chromatinuntereinheit des Nukleosoms. Nukleosomen stellen generelle Repressoren transkriptioneller Ereignisse dar (Kim et al., 2009).

Die Acetylierung von Lysinresten im N-terminalen Bereich der Histone führt zu einer Konformationsänderung des Histonkomplexes und in der Folge zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur, so dass die DNA für regulatorische Proteine zugänglich wird. Es sind zahlreiche TF und Co-Faktoren bekannt, die eine Histonacetyltransferase- bzw. eine Histondeacetylaseaktivität aufweisen (Orphanides und Reinberg, 2002; Ikegami et al., 2009).

1.2.3.2 DNA-Methylierung

DNA-Methylierungen sind die einzigen bekannten chemischen Veränderungen genomischer DNA von Säugetieren. Durch DNA-Methyltransferasen werden Methylreste auf das C5-Atom der Cytosinbase eines CpG-Dinukleotids übertragen. Methylierte DNA-Regionen sind transkriptionell inaktiv (Kim et al., 2009; Ikegami et al., 2009).

In humanen Zellen liegen 70-80% der CpG-Dinukleotide methyliert vor. Ausnahmen bilden CpG-Inseln: genomische Regionen von mind. 200 bp Länge, einem CG-Anteil von mind. 50% sowie einem „beobachteten/erwarteten“ CG-Verhältnis von mehr als 60%. CpG-Inseln überlappen mit 50-60% der Promotorregionen humaner Gene. Ein Teil der CpG-Inseln ist gewebs- und entwicklungsspezifisch methyliert (Kim et al., 2009).

1.2.4 Alternative Promotoren

Die gewebs- und differenzierungsspezifische Genexpressionskontrolle wird in etwa 30-50% der humanen Gene durch alternative Promotoren moduliert. Sie sind in der Regel im Tandem angeordnet oder in Introns lokalisiert. Indem alternative Promotoren die Bildung verschiedener mRNA-Isoformen sowie eine gewebs- und/oder entwicklungsspezifische Transkription ermöglichen, tragen sie zur Komplexität des humanen Genoms bei (Davuluri et al., 2008).

Die Nutzung der verschiedenen alternativen Promotoren eines Gens wird vermutlich durch eine unterschiedliche Core-Promotorstruktur, unterschiedliche regulatorische Elemente im proximalen Promotorbereich bzw. durch die Chromatinstruktur, durch differentielle DNA-Methylierung und Histonmodifikation vermittelt (Ayoubi und Van De Ven, 1996; Sandelin et al., 2007; Davuluri et al., 2008).

1.2.4.1 Bidirektionale Promotoren

Bidirektionale Promotoren stellen eine Sonderform alternativer Promotoren dar. Sie regulieren Genpaare, die durch die gegenüberliegenden Stränge der DNA kodiert werden und somit eine divergente Orientierung aufweisen.

Etwa 11% der humanen Gene weisen eine divergente Orientierung mit ≤ 1 kb zwischen ihren TSS auf. Die Expression des weitaus größten Anteils (etwa 90%) dieser Genpaare ist positiv reguliert, nur selten schließt die Expression des einen Gens die des anderen Gens aus. Trinklein et al. konnten zeigen, dass die Richtung, in der die Transkription von bidirektionalen Promotoren erfolgt, zu einem bestimmten Grad zelltypspezifisch reguliert wird (Trinklein et al., 2004).

1.3 *RhoA* und *TCTA*: ein divergentes Genpaar

1.3.1 Kleine GTPasen

Die Ras-Superfamilie der kleinen Guaninnukleotid-bindenden Proteine (kleine GTPasen) besitzt über 100 Mitglieder, die in eukaryotischen Zellen eine wichtige Funktion als Signaltransduktionsmoleküle übernehmen. Aufgrund ihrer Funktion und strukturellen Ähnlichkeiten werden sie in die fünf Unterfamilien (1) Ras, (2) Rho/Rac/Cdc42, (3) Arf/Sar1, (4) Rab und (5) Ran unterteilt. Da kleine GTPasen aus nur einer Untereinheit bestehen, unterscheiden sie sich von den aus drei Untereinheiten aufgebauten heterotrimeren G-Proteinen. Dabei weist die α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine die höchste Homologie zu den kleinen GTPasen auf (Brown et al., 2006).

1.3.1.1 Rho GTPasen

Die Mitglieder der Unterfamilie der Rho GTPasen sind charakterisiert durch den Besitz der sogenannten Rho-Insertionsdomäne, einer aus 13 Aminosäuren aufgebauten α -Helix. Insgesamt sind 25 humane Rho GTPasen bekannt, die durch 22 Gene kodiert werden. Sie beeinflussen das Aktinzytoskelett der Zelle und nehmen so Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation, -adhäsion und -polarität, sind jedoch auch beteiligt an der Kontraktion glatter Muskelzellen, der Aktivität von Ionenkanälen, der Permeabilität des Endothels sowie der Regulation von Transkriptionsfaktoren (Hakoshima et al., 2003; Wennerberg und Der, 2004; Brown et al., 2006).

Rho GTPasen sind zeitlich und räumlich streng kontrollierte molekulare Schalter. Indem sie zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Konformationszustand wechseln, leiten sie Signale von der Zellmembran in die Zelle weiter und stellen so den regulierenden und zeitgebenden Faktor zahlreicher Signaltransduktionswege dar. Der Wechsel zwischen der GDP- und GTP-gebundenen Konformation wird kontrolliert und reguliert durch drei Gruppen von Proteinen (Abbildung 1.3.1.1).

„Guanin-nucleotide exchange factors“ (GEFs) fördern den Austausch von GDP zu GTP und überführen Rho-Proteine in einen aktiven, membranständigen Zustand.

„GTPase-activating proteins“ (GAPs) hingegen fördern die intrinsische GTPase-Funktion der Rho-Proteine, tragen so zur Hydrolyse des GTP und in der Folge zur Inaktivierung der kleinen GTPasen bei. Die dritte Gruppe regulatorischer Proteine, die „GDP dissociation inhibitors“ (GDIs) verhindern durch ihre Bindung an die Rho-Proteine die Dissoziation des GDP bzw. die Hydrolyse des GTP und halten die GTPasen so in einer inaktiven cytosolischen Form. Ein Großteil der Rho GTPasen liegt durch GDIs gebunden im Cytosol der Zelle vor (Wennerberg und Der, 2004; Brown et al., 2006).

In ihrer aktiven Form können Rho GTPasen mit Effektorproteinen, insbesondere ROCKI und ROCKII interagieren, diese aktivieren und so zu einer Zellantwort beitragen.

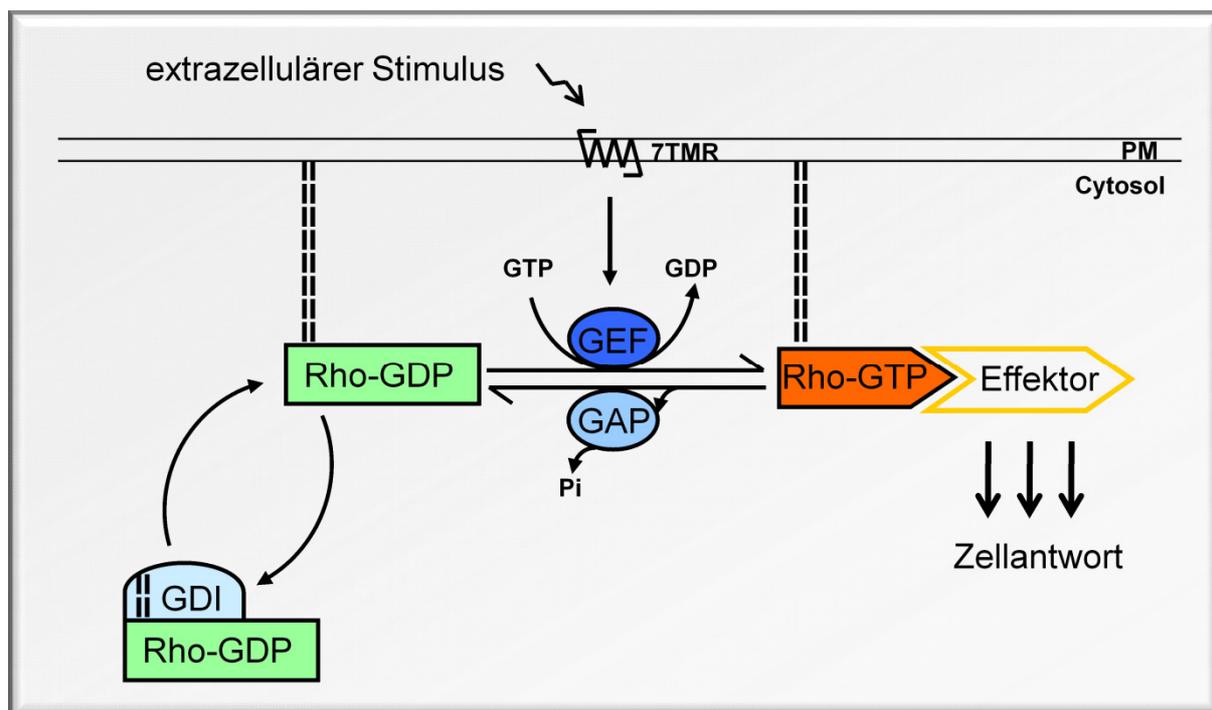


Abb. 1.3.1.1: Regulation der Rho GTPasen. Die kleinen GTPasen der Rho Unterfamilie wechseln zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Konformationszustand. In der aktiven GTP-gebundenen Form interagieren sie mit Effektorproteinen und tragen so zu einer Zellantwort bei. Reguliert wird der Wechsel zwischen der aktiven und inaktiven Konformation durch drei Gruppen regulatorischer Proteinen: (1) GEFs fördern den Austausch von GDP zu GTP und überführen Rho-Proteine in einen aktiven Zustand, (2) GAPs fördern die intrinsische GTPase-Funktion der Rho-Proteine und tragen so zur Inaktivierung der kleinen GTPasen bei, (3) GDIs binden an Rho-Proteine und halten diese so in einer inaktiven cytosolischen Konformation. 7TMR: 7 Transmembrandomänenrezeptor. [Abbildung verändert nach Etienne-Manneville und Hall, 2002].

1.3.1.2 Aufbau und posttranslationale Modifikation von Rho GTPasen

Die einzelnen Rho-Proteine ähneln sich stark in ihrem Aufbau und ihrer Struktur. Sie besitzen in der Regel eine GTPase-Domäne und eine kurze N-terminale Erweiterung. An ihrem C-Terminus enden sie mit dem Sequenzmotiv CAAX, wobei das C einen Cysteinrest, A eine aliphatische und X eine beliebige Aminosäure (AS) darstellt. Das CAAX-Tetrapeptid wird posttranslational in einem dreistufigen Prozess modifiziert. Hierbei wird zunächst der Cysteinrest durch die kovalente Bindung von Farnesyl bzw. Geranylgeranyl isoprenyliert, anschließend das AAX-Peptid durch eine Endoprotease entfernt und letztlich eine Methylgruppe an den nun freien Cysteinrest angehängen. Die C-terminale Modifikation durch die kovalente Bindung eines hydrophoben Isoprenrestes ist essentiell für die Funktion der kleinen GTPasen, da über sie die Assoziation an Membranen erfolgt. Ein Cluster polybasischer AS, welches die Assoziation mit Säuren Membran-assoziiierter Lipide erleichtert sowie ein bis zwei konservierte Cysteinreste, die durch Palmitat modifiziert werden können, stellen weitere Sequenzmotive dar, die jedoch nicht allen Rho GTPasen gemeinsam sind. (Wennerberg und Der, 2004; Roberts et al., 2008).

Die einzelnen Rho-Proteine unterscheiden sich, trotz ihrer sehr ähnlichen Struktur, insbesondere in den letzten 15 AS, die vermutlich für ihre unterschiedliche Funktion und Lokalisation verantwortlich sind (Wennerberg und Der, 2004).

1.3.2 RhoA – Gen und Protein

Das humane *RhoA*-Gen wurde zum ersten Mal 1985 durch Madaule und Axel beschrieben (Madaule und Axel, 1985). 1990 lokalisierten Cannizzaro et al. *RhoA* durch *in situ*-Hybridisierung auf Chromosom 3p21 (Cannizzaro et al., 1990). Aufgebaut ist das Gen aus 5 Exons und 4 Introns, die sich über einen Bereich von ca. 54 kb erstrecken. Das erste Exon kodiert lediglich für die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) und ist vom zweiten Exon durch das größte, etwa 36 kb überspannende Intron getrennt. Der gesamte Genbereich einschließlich der 5'-regulatorischen Region ist evolutionär stark konserviert. Das *RhoA*-Gen kodiert für ein ubiquitär exprimiertes Protein von 193 AS. Transkript- und Proteinlevel in humanen Zellen sind stabil, so dass eine strikte Kontrolle der RhoA-Expression angenommen werden muss (Ridley, 1997; Wennerberg und Der, 2004).

Das RhoA-Protein ist in seiner aktiven Form an die Plasmamembran der Zelle gebunden. Der größte Anteil der RhoA-Proteine, etwa 90-95%, liegt in inaktiver, GDI-gebundener Form im Cytoplasma vor (Ellerbroek et al., 2003).

Wie nahezu alle Rho GTPasen durchläuft das RhoA-Protein eine posttranslationale Modifikation durch Geranylgeranylierung des viertletzten Cysteins, enzymatische Abspaltung des AAX-Motivs sowie Methylierung des isoprenylierten Cysteins. Backlund zeigte, dass eine fehlende Methylierung die Stabilität des RhoA-Proteins beeinträchtigt und seine Halbwertszeit von 31 h auf 12 h reduziert (Backlund, 1997).

Das RhoA-Protein kann zudem durch die Proteinkinase A (PKA) sowie die Proteinkinase G (PKG) reversibel am Serin188 phosphoryliert werden. Dies fördert die Bindung an GDIs sowie die Extraktion aktiven RhoAs durch GDIs von der Plasmamembran der Zelle. Auf diese Weise führt die Phosphorylierung zur Inaktivierung von RhoA, schützt es jedoch gleichzeitig vor dem Abbau durch das Proteasom. Die Phosphorylierung des RhoA-Proteins stellt so vermutlich eine weitere Regulationsebene dar (Forget et al., 2002; Ellerbroek et al., 2003; Rolli-Derkinderen et al., 2005).

RhoA-Proteine besitzen zudem ein Cluster polybasischer AS, das ähnlich dem Geranylgeranyl-Rest einer verbesserten Assoziation mit der Plasmamembran dient.

1.3.2.1 RhoA und TCTA

Das auf dem (-)-Strang des Chromosoms 3p21 lokalisierte *RhoA*-Gen liegt in sehr enger Nachbarschaft zu dem auf dem (+)-Strang desselben Chromosoms lokalisierten *TCTA*-Gen (T-cell leukemia translocation-associated gene). Folglich weisen beide Gene, wie etwa 11% aller humanen Gene (Trinklein et al., 2004), eine divergente Orientierung auf. Die divergente Anordnung von *RhoA* und *TCTA* wurde jedoch bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Das *TCTA*-Gen ist aufgebaut aus 3 Exons und 2 Introns und kodiert für ein potentiell Protein von 103 AS. Die Proteinsequenz besitzt einen an hydrophoben AS reichen Abschnitt, der für Membranproteine charakteristisch ist (Aplan et al., 1995).

Ebenso wie RhoA-mRNA wird TCTA-mRNA ubiquitär exprimiert. Die höchsten TCTA-mRNA-Level sind dabei in adulten Nieren zu beobachten. In einigen

Subklonen einer „small cell lung cancer“ (SCLC)-Zelllinie scheint TCTA nur in einer Kopie im Genom vorzuliegen (Aplan et al., 1995).

1.3.3 RhoA und Atherosklerose

Die kleine GTPase RhoA ist aufgrund ihrer Funktion als molekularer Schalter und Regulator des Aktinzytoskeletts an vielen Prozessen eukaryotischer Zellen beteiligt. Insbesondere durch ihren Einfluss auf vaskuläre glatte Muskelzellen und Endothelzellen trägt sie zur Entwicklung und Progression von Atherosklerose bei.

Die Dysfunktion des arteriellen Endothels stellt den ersten Schritt der Bildung einer atherosklerotischen Läsion dar. Die erhöhte Permeabilität ermöglicht das Eindringen von Blutbestandteilen wie LDL und die darauf folgende Adhäsion und Migration von Monozyten in den subendothelialen Raum. Wójciak-Stothard et al. zeigten *in vitro*, dass die vaskuläre Permeabilität nach Stimulation mit Histamin und Thrombin durch den RhoA-abhängigen Abbau von „tight junctions“ und interzellulären Adhäsionsmolekülen erhöht wird (Wójciak-Stothard et al., 2001). Dieser Prozess wird durch eine RhoA/ROCK-vermittelte Migration von Endothelzellen verstärkt (Loirand et al., 2006). Zudem führt die Aktivierung von RhoA zu einer für die Adäsion von Monozyten an Endothelzellen notwendigen Reorganisation von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin sowie zur NF- κ B-abhängigen Hochregulation der ICAM-1 Expression (Wójciak-Stothard et al., 1999; Bolick et al., 2005). Die Adhäsion von Monozyten wiederum führt zu einer verstärkten Aktivierung von RhoA und in der Folge zu einer Hochregulation der „Tissue Factor“-Expression (Ishibashi et al., 2003). „Tissue Factor“ ist ein Initiator der Blutgerinnung und trägt damit nach der Ruptur eines Plaques zur Thrombusbildung bei.

Der Einfluss des RhoA/ROCK-Signalwegs auf die Kontraktion vaskulärer glatter Muskelzellen wurde Ende der 1990er Jahre beschrieben. Die durch RhoA aktivierte Rho-Kinase ROCK phosphoryliert und inhibiert zum einen die Myosin-Phosphatase, zum anderen den „Myosin-Light-Chain“ (MLC), in dessen Folge es zur Zellkontraktion kommt (Noda et al., 1995; Kazushi et al., 1996; Kureishi et al., 1997). Dies führt zur Erhöhung des vaskulären Widerstands und kann zur Entwicklung von Hypertonie beitragen. Seko et al. konnten zeigen, dass Stimuli wie Angiotensin II und Endothelin-1 durch die Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalwegs zur Phosphorylierung der Myosin-Phosphatase in vaskulären glatten Muskelzellen führt

(Seko et al., 2003). Hypertensive Ratten weisen zudem eine erhöhte Aktivität von RhoA in vaskulären glatten Muskelzellen auf, und eine Behandlung mit Y-27632, einem Inhibitor des RhoA-Effektors ROCK, konnte die Hypertonie korrigieren (Uehata et al., 1997; Moriki et al., 2004). Es wird jedoch diskutiert, ob die erhöhte RhoA-Aktivität Ursache oder Folge der Hypertonie ist. Numaguchi et al. zeigten, dass mechanische Dehnung zu einer Translokation von RhoA aus dem Cytosol an die Plasmamembran führt (Numaguchi et al., 1999). Dem widersprechen Ergebnisse von Seasholtz et al., die darauf hindeuten, dass kultivierte vaskuläre glatte Muskelzellen hypertensiver Ratten ebenfalls eine erhöhte RhoA-Aktivität aufweisen (Seasholtz et al., 2001). Ein anderer Ansatz wurde von Ito et al. gewählt. Sie untersuchten die Aktivität des RhoA/ROCK-Signalwegs im Nucleus Tractus solitarii des Stammhirns hypertensiver und normotensiver Ratten, und zeigten, dass er bei beiden Tiermodellen den Blutdruck über das sympathische Nervensystem reguliert. Hierbei führt eine Inhibierung von ROCK durch Y-27632 in hypertensiven Ratten zu einer stärkeren Senkung des Blutdrucks im Vergleich zu normotensiven Ratten (Ito et al., 2003).

Neben dem Einfluss auf Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen ist der RhoA/ROCK-Signalweg an der Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren beteiligt. So kontrolliert er u.a. die subzelluläre Lokalisation von NF- κ B, „serum response factor“ (SRF) und „myocardin-related transcription factor“ (MRTF)-A und -B, die zur Expression von Cytokinen und Adhäsionsmolekülen bzw. Differenzierung von glatten Muskelzellen beitragen (Liu et al., 2003; Cui et al., 2006; Hinson et al., 2006). Ein Einfluss des RhoA/ROCK-Signalwegs auf die Entstehung von Atherosklerose konnte zudem indirekt durch den positiven, extrahepatischen Effekt von Statinen gezeigt werden. Statine inhibieren die HMG-CoA-Reduktase und somit u. a. die Bildung von Geranylgeranylpyrophosphat, einen für die Membranassoziation von RhoA notwendigen Isoprenrest. Dies führt zu einer Steigerung der endothelialen NO-Synthese, einer Abnahme der Proliferation und Kontraktion vaskulärer glatter Muskelzellen sowie einer verringerten Cytokinbildung (Laufs und Liao, 2000; Laufs und Adam, 2008). Zudem konnten Nohria et al. zeigen, dass die zur Medikation verwendeten Statinmengen den RhoA/ROCK-Signalweg inhibieren können (Nohria et al., 2009).

In jüngerer Zeit wurde in einer genomweiten Assoziationsstudie der RhoA-Locus auf Chromosom 3p21 mit der durchschnittlichen Blutplättchengröße assoziiert (Meisinger

et al., 2009). Zudem zeigten Jarinova et al., dass eine genetische Variante in einer regulatorischen Region der zuvor als Risikolocus für kardiovaskuläre Erkrankungen identifizierten 9p21.3 Region die Expression einer ncRNA Variante beeinflusst. Diese scheint regulatorisch auf die Expression des GEFs Kairin einzuwirken (Jarinova et al., 2009). Ob Kairin jedoch mit RhoA interagiert, ist ungeklärt.

1.4 Ziel der Arbeit

Die kleine GTPase RhoA nimmt über seine Effektorproteine Einfluss auf zahlreiche Signalwege, die zur Entstehung und Progression atherosklerotischer Prozesse beitragen können. Folglich stellt *RhoA* ein Kandidatengen für kardiovaskuläre Erkrankungen dar. In der Vergangenheit konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass genetische Varianten die transkriptionelle Kontrolle kardiovaskulärer Kandidatengene beeinflussen und somit möglicherweise zur Prädisposition von Herz-Kreislaufkrankungen beitragen (Dördelmann et al., 2008; Hagedorn et al., 2009; Telgmann et al., 2009; Schmidt-Petersen et al., 2009).

Obwohl RhoA auf Proteinebene sehr gut beschrieben ist, ist die Literaturlage zur Genstruktur sowie zur transkriptionellen Kontrolle dieser kleinen GTPase begrenzt. So wurde die divergente Anordnung des *RhoA*- und *TCTA*-Gens bisher nicht aufgegriffen. Da eine solche Genorganisation durch die Nutzung des kodierenden Bereichs als regulatorische Region des jeweils anderen Gens eine alternierende Expression beider Genpaare erwarten lässt, soll zunächst überprüft werden, ob eine synchrone/parallele Expression von *RhoA* und *TCTA* erfolgt. Des Weiteren sollen durch Transfektionsassays mit Promotordeletionskonstrukten transkriptionell aktive Bereiche der 5'-flankierenden Regionen sowohl des *RhoA*- als auch des *TCTA*-Gens identifiziert werden. Dies eröffnet zudem die Möglichkeit der Analyse sowohl des bidirektionalen Charakters der von beiden Genen eingerahmten Promotorregion, als auch die Eingrenzung *cis*-regulatorischer Bereiche. In einem weiteren Schritt soll die 5'-flankierende Region sowohl des *RhoA*- als auch des *TCTA*-Gens auf das Vorhandensein von CpG-Inseln untersucht werden. Da CpG-Inseln wichtige Regionen für epigenetische Ereignisse darstellen, die wiederum Einfluss auf die Kontrolle der Genregulation nehmen, sollen mögliche CpG-Inseln in der 5'-flankierenden Region von *RhoA* und *TCTA* auf ihren Methylierungsstatus untersucht werden.

Bisher sind keine Untersuchungen zum Einfluss genetischer Varianten auf die transkriptionelle Kontrolle von divergent orientierten Genen beschrieben. Daher sollen die 5'-flankierenden Regionen des *RhoA*- und *TCTA*-Gens von Patienten der MolProMD-Studie durch Amplifikation und Resequenzierung auf SNPs analysiert werden. Mögliche genetische Varianten in der gemeinsam genutzten, von beiden Genen eingerahmten Promotorregion sollen anschließend durch Reporterassays

auf ihren Einfluss untersucht werden, den sie auf die transkriptionelle Kontrolle beider Gene haben. Eine mögliche, durch genetische Varianten verursachte Änderung von TFBS soll sowohl durch *in silico* Vorhersagen mit Hilfe des netzbasierten Programms AliBaba2.1 sowie der diesem Programm zugrunde liegenden Datenbank TRANSFAC7.0, als auch durch DNA-Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe von „Electrophoretic Mobility Shift Assay“- (EMSA) Analysen untersucht werden.

2. Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid-Bisacrylamid Fertiglösung 30% [37,5:1] (Merck, Hamburg); Agar [Bacto™] (BD Bioscience, Heidelberg); LE Agarose (Biozym Scientific, Oldendorf); Ampicillin Natriumsalz (Sigma-Aldrich, Steinheim); APS [Ammoniumpersulfat] (Sigma-Aldrich, Steinheim); Betain (Sigma-Aldrich, Steinheim); Borsäure (Merck, Hamburg); 8-Brom-cAMP (BioLog, Bremen); Chloroform/Trichlormethan (Roth, Karlsruhe); Cobalt (II)-chlorid (Roche, Basel, Schweiz); DMSO [Dimethylsulfoxid] (Merck, Hamburg); DTT [1,4-Dithiothreitol] (Roth, Karlsruhe); EDTA Dinatriumsalz [Ethyldiamintetraessigsäure] (BDH Biochemical, Doha, Katar); EGTA [Ethyldioxy-bis-(ethylnitrilo)-tetraessigsäure] (Sigma-Aldrich, Steinheim); Eisessig (Roth, Karlsruhe); Ethanol (Merck, Hamburg); Ethidiumbromid [1% Lösung in Wasser] (Merck, Hamburg); Ficoll 400 (BDH Biochemical, Doha, Katar); L-Glutamin (Sigma-Aldrich, Steinheim); Glycerin (Roth, Karlsruhe); Hefeextrakt [Bacto™] (BD Bioscience, Heidelberg); HEPES [2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure] (Roth, Karlsruhe); Isoamylalkohol (Roth, Karlsruhe); Isopropanol [2-Propanol] (Merck, Hamburg); Kaliumacetat (AppliChem, Darmstadt); Kaliumchlorid (Roth, Karlsruhe); Luciferase Assay Substrat (Promega, Mannheim); Lysis-Puffer (Promega, Mannheim); Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Roth, Karlsruhe); Magnesiumsulfat Heptahydrat (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz), MOPS [3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure] (Sigma-Aldrich, Steinheim); Nanofektin (PAA, Cölbe); Natriumacetat (Merck, Hamburg); Natriumchlorid (Merck, Hamburg); Natriummolybdat (Sigma-Aldrich, Steinheim); dNTPs [dATP, dCTP, dGTP, dTTP] (Fermentas, St. Leon-Rot); PBS [Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline] (Sigma-Aldrich, Steinheim); Penicillin-Streptomycin-Solution (Sigma-Aldrich, Steinheim); Phorbo-12-myristat-13-acetat (PMA; Sigma-Aldrich, Steinheim); poly dA•dT (USB Corporation Cleveland, Ohio USA); poly dI•dC (USB Corporation Cleveland); Primer (IBA, Göttingen; Invitrogen, Karlsruhe); PVDF-Membran [Immobilon-P Transfer Membran] (Milipore, Schwalbach/Ts); Rubidiumchlorid (Alfa Aesar, Karlsruhe), Spectinomycin Dihydrochlorid Pentahydrat (Sigma-Aldrich, Steinheim); Spermidin (Roth, Karlsruhe); TEMED [N,N,N',N',-Tetrametylendiamin] (Roth, Karlsruhe); TRIS [Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan] (Merck, Hamburg); Triton-X 100 (Roth, Karlsruhe); Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe); Trypton [Bacto™] (BD Bioscience,

Heidelberg); Biotin-16-ddUTP (Roche, Basel, Schweiz); Wasser [für die Chromatographie] (Merck, Hamburg); Whatman®Paper 3MM Chr (Biometra, Göttingen).

2.2 Kits

BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, US); Chemiluminescent Nucleic Acid Detection (Thermo Scientific, Bonn); EpiTec® Bisulfite (Qiagen, Hilden); FirstChoice® RLM-RACE (Ambion, Darmstadt), First Strand cDNA Syntheses (Fermentas, St. Leon-Rot); Gateway® Vector Conversion System (Invitrogen, Karlsruhe); High Pure PCR Product Purification (Roche, Basel, Schweiz); LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific, Bonn); NucleoSpin® Plasmid Quick Pure (Macherey-Nagel, Düren); NucleoSpin® RNAII (Macherey-Nagel, Düren); pCR®8/GW/TOPO®TA Cloning® (Invitrogen, Karlsruhe); Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Bonn); PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification (Invitrogen, Karlsruhe); QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Hilden); QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden); QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden); QuickChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, Böblingen); QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, Böblingen); QuikChangeII Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, Böblingen).

2.3 Seren und Medien

Dulbecco`s modified eagle`s medium (DMEM)

Sigma Aldrich, Steinheim

Foetal bovine serum Gold

PAA, Pasching

2.4 DNA-Marker

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (ready-to-use)	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (ready-to-use)	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (ready-to-use)	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ Low Range DNA Ladder (ready-to-use)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.5 Enzyme

Enzym	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Polymerasen	GoTaq	Promega, Mannheim
	High Fidelity PCR Enzyme Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Ligase	T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt am Main
Nuklease	Exonuclease I (<i>E. coli</i>)	Fermentas, St. Leon-Rot
Phosphatase	Antarctic Phosphatase	NEB, Frankfurt am Main
	Shrimp alkaline phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	BamHI	NEB, Frankfurt am Main
	DpnI	Agilent Technologies
	FseI	NEB, Frankfurt am Main
	HindIII	NEB, Frankfurt am Main
	NheI	NEB, Frankfurt am Main
	SacI	NEB, Frankfurt am Main
	XbaI	NEB, Frankfurt am Main
Terminale Desoxy-Nukleotid Transferase	TdT	Roche, Basel, Schweiz

2.6 Plasmide und Vektoren

Bezeichnung	Referenz
pCR [®] 8/GW/TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pDsRed2-N1	Clontech, Heidelberg
pEGFP-N1	Clontech, Heidelberg
pGL3 basic	Promega, Mannheim
pGL3 control	Promega, Mannheim

2.7 *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
ccdbSurvival TM T1	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F ⁻ Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG fhuA::IS2</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Dh5α	F ⁻ Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻, m_k⁺</i>) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96</i> <i>relA1 λ-</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Mach1 TM -T1 ^R	F ⁻ Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 hsdR</i> (<i>r_k⁻, m_k⁺</i>) Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i> (confers resistance to phage T1)	Invitrogen, Karlsruhe

2.8 Eukaryotisch Zelllinien

Linie	Ursprung	Referenz
EA.hy926	Fusionszelllinie aus Venen- Endothelzellen der Nabelschnur mit der permanenten humanen Zelllinie A549	Edgell et al., 1990

2.9 Geräte

Gerät	Model	Referenz
Abzüge	Variolab Mobilien W90	Waldner Laboreinrichtung, Wangen
Autoklav	FVS-2	Fedegari, Albuzzano, Italien
	System VX-75	System, Wettenberg
Bakterienschüttler	Incubator Shaker Series 25	New Brunswick Scientific Co Inc, New Jersey, USA
Brutschrank (Bakterien)	B 6120	Heraeus, Hanau
Cell Counter	Casy [®] Model TT	Innovatis, Bielefeld
CO ₂ -Inkubator	MCO-18AIC	Sanyo, München
Elektrophoresekammern (Acrylamid)	Mini PROTEAN [®] Cell	BioRad, München
Elektrophoresekammern (Agarosegele)	StarPhoresis	Starlab, Ahrensburg
Entwickler	Optimax	Protec, Oberstenfeld
Heizblock	Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
	KTMR-133	HLC BioTech, Bovenden
	Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling
Luminometer	Sirius Single Tube	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
pH-Meter	pH-Meter766 Calimatic	Knick, Berlin
Schüttler	GFL 3006	GFL, Burgwedel

Gerät	Model	Referenz
Sequenzierer	7500 ABIprism	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sterilbank (bakteriell)	Bio-Hazard Safety Cabinet ClassII	Clean Air Systems, Chennai, Indien
Stromgeber	2301 Macrodrive1	Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Österreich
	PowerPac Basic™	BioRad, München
Sterilbank (eukaryotisch)	HS 12	Heraeus, Hanau
PCR-Geräte	PTC-225, DNA Enginge Tetrad® 2	MJ Research, Waltham, USA
Photometer	NanoPhotometer™	Implem, München
Tankblotkammer	Mini Trans-Blot® Cell	BioRad, München
UV-Tisch	Alphamager™	Alpha Innotech Corp, San Leandro, USA
Waage	Sartorius excellence,	Sartorius, Göttingen
	Sartorius 2002 MP1	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Haake D8	Thermo Scientific, Bonn
	GFL 1083	GFL, Burgwedel
Vortexer	VV3	VWR, Darmstadt
Zentrifugen	Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Wesseling
	Centrifuge 5417 R	Eppedndorf, Wesseling
	Mikro 200	Hettich, Bäch, Schweiz
	Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
	Himac CT 15 RE	Hitachi Koki Co., Ltd., Tokyo, Japan

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.1.1 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe des „QIAamp DNA Blood Mini“-Kits (Qiagen) aus Leukozyten von EDTA-behandeltem Vollblut gewonnen. Hierzu wurden die Leukozyten in Gegenwart von Proteinase K und RNase A lysiert, die DNA des Lysats an die Silica-Membran einer Säule gebunden, mehrfach gewaschen und anschließend eluiert. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei 6-8 °C, die Langzeitlagerung bei -80 °C.

3.1.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin[®] RNA II“ Kits (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Circa 5×10^6 Zellen wurden 2 x mit kaltem PBS gewaschen, geerntet und mit einem RNase-inaktivierenden, chaotropen Puffer lysiert. Es folgte die Reinigung des Lysats durch einen Filter, die Bindung von Nukleinsäuren an die Silica-Membran eines Säulchens sowie der DNA-Verdau durch rDNase. Die Silica-Membran der Säulchen wurde anschließend mehrfach gewaschen und die Gesamt-RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die Lagerung der Gesamt-RNA erfolgte bei -80 °C.

3.1.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen basiert auf der Alkali-Lysis Methode von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979). Die Aufarbeitung kleiner Mengen Plasmid-DNAs (Mini-Präp; 2 ml Kultur) erfolgte mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep“- (Qiagen) bzw. des „NucleoSpin[®] Plasmid QuickPure“-Kits (Macherey-Nagel), die Aufarbeitung großer Mengen Plasmid-DNAs (Maxi-Präp; 100 ml Kultur) mit Hilfe des „PureLink[™] HiPure Plasmid DNA Purification“-Kits (Invitrogen).

Bakterienkulturen wurden durch Zentrifugation geerntet, in RNase-haltigen Puffer aufgenommen und die Zellen mittels Lysis-Puffer aufgeschlossen. Im Folgenden wurde das Lysat mit Neutralisationspuffer neutralisiert und Zellreste, Proteine und genomische DNA abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA des gereinigten Lysats wurde im

Falle der Mini-Präp an die Silica-Membran einer Säule gebunden, mehrfach gewaschen und anschließend eluiert. Das Lysat der Maxi-Präp wurde zunächst einem Endotoxin-Reinigungsschritt unterzogen. Hierzu wurde es 30 min bei 6-8 °C mit $\frac{1}{10}$ Volumen „Endotoxin-Removal“-Puffer A inkubiert, die Plasmid-DNA dann an eine Anionen-Austausch-Säule gebunden und vor dem eigentlichen Waschschrift mit einem Volumen „Endotoxin-Removal“-Puffer B gereinigt. Anschließend erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit Elutionspuffer sowie die Entsalzung und Aufkonzentrierung der Plasmid-DNA mittels Alkoholfällung.

Endotoxin Removal Puffer A

50 mM MOPS, pH 7.0
750 mM Natriumchlorid
10% (w/v) Triton X-100
10% (v/v) Isopropanol

Endotoxin Removal Puffer B

100 mM Natriumacetat, pH 5.0
750 mM Natriumchlorid
1% (w/v) Triton X-100

3.1.2 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mit dem „NanoPhotometerTM“ (Implen) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Das Verhältnis der Extinktion E_{260}/E_{280} gibt Auskunft über die Reinheit der DNA- bzw. RNA-Lösung, wobei ein Wert $>1,8$ eine reine DNA-Lösung, ein Wert von >2 eine reine RNA-Lösung darstellt. Werte $<1,8$ bzw. <2 deuten auf Proteinverunreinigungen hin.

3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Anreicherung spezifischer DNA-Fragmente aus einem Pool von Nukleinsäuren. Durch Nutzung thermostabiler DNA-Polymerasen, die an eine einzelsträngige DNA gebundene spezifische Primer (sense und antisense) verlängern, kommt es in einem dreistufigen Prozess aus Denaturierung, Annealing und Elongation zu einer exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNA-Abschnittes. Die PCR wurde mit Hilfe des „PTC-225“ bzw. des „DNA Engine Tetrad[®] 2 (MJ Research) durchgeführt.

Standard PCR-Ansatz

5 ng	Template-DNA
10 pmol	sense Primer
10 pmol	antisense Primer
10 mM	dNTP-Mix
1 M	Betain
1 X	Taq-Polymerasepuffer
0,625 U	Taq-Polymerase
ad 25 µl Nuklease-freies H ₂ O	

Standard PCR-Programm

Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	} 25-30 x
Annealing*	58 °C	45 sec	
Elongation [‡]	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	10 min	
Lagerung	15 °C	∞	

* Die Annealing Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur T_m der Primer.

‡ Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der eingesetzten DNA-Polymerase.

Spezielle PCR-Programme:

Bei schwer zu amplifizierenden DNA-Fragmenten hohen GC-Indexes wurden modifizierte PCR-Programme gewählt.

a) Gradienten-PCR

Die Gradienten-PCR dient der Identifizierung der optimalen Annealing-Temperatur der eingesetzten Primer. Hierzu wird die Annealing-Temperatur über die verschiedenen Wells des PCR-Geräts in einem vorgegebenen Temperaturrahmen graduell verändert (Temperaturgradient). Auf diese Weise können während eines PCR-Laufs mehrere Annealing-Temperaturen getestet werden.

b) Nested-PCR

Bei der Nested-PCR werden zwei PCR-Läufe hintereinander durchgeführt, wobei das Amplifikat des ersten PCR-Ansatzes als Template für den zweiten PCR-Lauf dient. Bei diesem wird nach Reinigen des Amplikons von Matrize und Primern ein zweites Primerpaar genutzt, das innerhalb des zuvor amplifizierten Bereichs bindet. Auf diese Weise kann die Spezifität einer PCR erhöht werden, bzw. schwache Amplifikate können verstärkt werden.

c) Touch-Down-PCR

Bei der Touch-Down-PCR wird die Annealing-Temperatur zunächst 5-10 °C über der zu erwartenden Temperatur gewählt und während jedes dritten Zyklus jeweils um 2 °C verringert bis die zu erwartende Annealing-Temperatur erreicht ist. Hierauf erfolgen standardmäßig 25 unveränderte Zyklen. Auf diese Weise wird die Spezifität der PCR-Reaktion erhöht.

3.1.3.1 RT-PCR (reverse transcriptase PCR)

Die Synthese von cDNA erfolgte mit Hilfe des "First Strand cDNA Synthesis"-Kits (Fermentas). Ein µg Gesamt-RNA wurden mit Oligo(dT) Primern für 5 min bei 70 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von Reaktionspuffer, „Ribolock™ Ribonuclease Inhibitor“ und dNTP-Mix sowie die Inkubation des Ansatzes für 5 min bei 37 °C. Nach Zugabe von „M-MuLV reverse transcriptase“ und einer Inkubation für 60 min bei 37 °C erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70 °C. Die cDNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.1.3.2 5'-RACE (rapid-amplification of 5'-cDNA ends)

Die 5'-RACE ist ein Verfahren zur Amplifikation von cDNA-Enden und dient der Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten. Sie erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des „FirstChoice® RLM-RACE“ Kits (Ambion). Gesamt-RNA wurde zunächst zur Entfernung freier 5'-Phosphatreste mit alkalischer Phosphatase behandelt. Intakte Vollängen-RNA, die an ihrem 5'-Ende ein Cap-Struktur besitzt, ist vor der enzymatischen Reaktion der Phosphatase geschützt. Diese Cap-Struktur wurde anschließend durch eine Pyrophosphatase entfernt und an die nun freien 5'-Monophosphatreste ein RNA-Adapter ligiert. Nach der cDNA-Synthese mittels Zufallsprimern erfolgte eine Nested-PCR mit Adapter-spezifischen sense-Primern und Gen-spezifischen antisense-Primern. Das Amplifikat wurde anschließend zur genauen Bestimmung des 5'-Endes der entsprechenden RNA sequenziert.

Abweichungen von den Herstellerangaben:

- es wurden 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt
- nach der Behandlung mit alkalischer Phosphatase (Calf intestine phosphatase, CIP) wurde die RNA in 5,5 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen (Schritt A4)
- der Phyrophosphatase-Ansatz (Schritt A5) bestand aus:
 - 4 µl CIP-behandelte RNA
 - 1 µl 10 x TAP buffer
 - 2 µl Tobacco Acid Pyrophosphatase
 - 3 µl Nuklease-freies Wasser

3.1.4 DNA/RNA-modifizierende Reaktionen

3.1.4.1 Restriktionsendonukleasen

Für die Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden für jedes Enzym die vom Hersteller angegebenen optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen gewählt. Ein Standard-Restriktionsansatz von 10 µl enthielt 2,5 U Restriktionsendonuklease, 1 x Restriktionsendonuklease-Puffer sowie 200 ng DNA und wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Die enzymatische Reaktion erfolgte i. d. R. für 1 h bei 37 °C und wurde durch Inkubation für 10 min bei 70 °C gestoppt.

3.1.4.2 Dephosphorylierung von DNA

Die Entfernung der 5'-Phosphatreste einer zuvor mit Restriktionsendonukleasen behandelten Vektor-DNA diente der Verhinderung von Religationsereignissen. Hierzu wurde die zu dephosphorylierende DNA zusammen mit 1 U „Antarctic Phosphatase“ (New England Biolabs), 1 x „Antarctic Phosphatase“-Puffer (New England Biolabs), sowie H₂O in einem Endvolumen von 30 µl für 1 h bei 37 °C inkubiert und die enzymatische Reaktion anschließend für 15 min bei 65 °C gestoppt.

3.1.4.3 Ligation

Mit Hilfe einer Ligation können zwei Nukleinsäure-Fragmente an ihren Enden kovalent verbunden werden. Hierbei handelt es sich häufig um zuvor mit den selben Restriktionsendonukleasen behandelte DNA-Fragmente, i. d. R. Vektor-DNA und in diese einzuklonierende „Insert“-DNA. Die zuvor dephosphorylierte Vektor-DNA und das Insert wurden in einem äquimolaren Verhältnis von 1:3 (Vektor:Insert) in Gegenwart von 1 x T4-DNA-Ligasepuffer (New England Biolabs), 4U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) und der entsprechenden Menge H₂O in einem Endvolumen von 40 µl über Nacht bei 14 °C inkubiert.

3.1.4.4 Biotinylierung der 3'-Enden einzelsträngiger Oligonukleotide und deren anschließendes Annealing

Die für die EMSA-Experimente genutzten 31 bp langen, zweifach durch „high pressure liquid chromatography“ (HPLC) gereinigten Oligonukleotide wurden durch die Firma IBA (Göttingen) mit einer Kopplungseffizienz von mindestens 98,5% synthetisiert. Die Biotinylierung von je 5 pmol jedes Oligonukleotids erfolgte mit Hilfe von 60U Terminaler Desoxynukleotid Transferase (TdT; Roche) und Inkubation für 30 min bei 37 °C in Gegenwart von 2 mM CoCl₂ (Roche), 500 pmol Biotin-16-ddUTP (Roche), 1 x TdT-Reaktionspuffer (Roche) sowie H₂O in einem Endvolumen von 50 µl. Die Verwendung von didesoxyUTP stellt ein gleichmäßiges monomeres Endlabeling sicher. Durch Inkubation für 10 min bei 70 °C wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Die Reinigung der biotinylierten Oligonukleotide erfolgte durch Zugabe von 50 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und anschließender Zentrifugation. Nach Abnahme der Oligonukleotid-enthaltenden wässrigen Phase wurden 40 pmol zueinander komplementärer Oligonukleotide in Gegenwart von 100 mM NaCl und 1,5 M Betain durch Inkubation für 5 min bei 95 °C und langsames Abkühlen des Ansatzes über Nacht auf Raumtemperatur annealt. Für das Annealen nicht-biotinylierter Oligonukleotide wurden 400 pmol Oligonukleotide unter den selben Reaktionsbedingungen eingesetzt.

3.1.5 Agarose Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden durch ein mit 0,01% Ethidiumbromid versetztes, 1 x TAE-Agarosegels aufgetrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern (StarPhoresis, Starlab). Als Laufpuffer diente 1 x TAE, als DNA-Marker wurden abhängig von den aufzutrennenden Fragmentgrößen verschiedene „GeneRuler™ DNA-Ladder“ (Fermentas) genutzt. Zur Auftrennung kleiner Fragmente dienten bis zu 3%-ige Agarosegele. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe des „Alphamager™“ (Alpha Innotech Corporation) durch UV-Licht sichtbar gemacht.

1 x TAE-Puffer

40 mM Tris

1 mM EDTA

5,71% Essigsäure

3.1.6 „Site-directed“ Mutagenese

Gerichtete Mutagenesen zur Punktmutation, Deletion und Insertion von Basen wurden *in vitro* mit „QuikChange Site-Directed Mutagenesis“-Kits (Agilent Technologies) durchgeführt. Hierzu wurden Primer mit der gewünschten Mutation sowie die zu modifizierende Plasmid-DNA in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Durch die Verlängerung der Primer erfolgte die gerichtete Einführung der Mutationen in die Plasmid-DNA. Nicht mutierte parentale DNA wurde anschließend durch das methylierungsabhängige Restriktionsenzym *DpnI* verdaut und die mutierten Plasmide in *E. coli*-Zellen transformiert.

3.1.7 Vektorkonstruktion

Die Konstruktion der Reportergenplasmide erfolgte mit Hilfe der Gateway-Technologie (Invitrogen). Diese beruht auf dem Rekombinationssystem des Phagen λ und seines Wirtes *E. coli*. Nach der Infektion von *E. coli* durch den Phagen λ kommt es zu einer enzymatischen Rekombination (BP-Reaktion) zwischen kurzen DNA-Abschnitten des Wirts- (*attB*-Sites) und des Phagengenoms (*attP*-Sites), in dessen Folge das Genom des Phagen in das Bakteriengenom integriert wird.

Durch die Rekombination entstehen hybride, als *attL*- und *attR*-Sites bezeichnete Sequenzabschnitte. Die BP-Reaktion ist umkehrbar, so dass das Phagengenom das Bakteriengenom wieder verlassen kann (LR-Reaktion).

Die Gateway-Technologie nutzt die *att*-Sites zur Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Zielvektor. Dabei trägt der Zielvektor eine durch *attR*-Sites eingefasste Chloramphenicol-Resistenz-Kassette sowie das *ccdB*-Gen, dessen Genprodukt für gewöhnliche *E. coli*-Stämme letal ist. Das in den Vektor einzuklonierende DNA-Fragment wird mit *attL*-Sites flankiert. In einer *in vitro* Reaktion erfolgt die enzymatische Rekombination zwischen den *att*-Sites. Dies hat den Austausch der von *att*-Sites flankierten DNA-Abschnitte zur Folge. Der Zielvektor trägt nun das gewünschte Insert, das jetzt von *attB*-Sites flankiert wird, die Chloramphenicol-Resistenzkassette sowie das *ccdB*-Gen werden aus dem Zielvektor entfernt und sind von *attP*-Sites eingefasst. Nach der Transformation des Rekombinationsansatzes in *E. coli* können nur solche Zellen eine Kolonie auf entsprechenden Selektionsplatten bilden, die einen Vektor mit dem gewünschten Insert tragen. Zellen, die den Ausgangsvektor mit dem *ccdB*-Gen aufgenommen haben, ist ein Wachstum auf Grund der Letalität des Genprodukts nicht möglich.

3.1.7.1 Gateway-Vektor-Konversion

Reporter-genvektoren wurden nach Herstellerangaben mit Hilfe des „Gateway[®] Vector Conversion System“ (Invitrogen) Gateway-kompatibel gemacht. Hierzu wurden die Vektoren zunächst mit einer Restriktionsendonuklease, die eine Erkennungssequenz in der „Multiple Cloning Site“ (MCS) besitzt, linearisiert. Es wurde eine Restriktionsendonuklease gewählt, die glatte Schnittstellen („blunt ends“) erzeugt. Die Vektor-DNA wurde anschließend dephosphoryliert und mit der gewünschten „reading-frame-cassette“ (rfc) ligiert. Die rfc trägt das von *attR*-sites flankierte *ccdB*-Gen sowie die Chloramphenicol-Resistenzkassette, sodass die Transformation des Ligationsansatzes in „*ccdB*SurvivalTMT1^R“-Zellen (Invitrogen) erfolgte. Durch diagnostischen Restriktionsverdau und Sequenzierung wurde die Orientierung der inklonierten rfc überprüft. Drei unterschiedliche rfc (rfcA –C) ermöglichen die Herstellung von Vektoren in den drei Leserahmen.

3.1.7.2 Konstruktion der Reporter-genektoren

Die *RhoA*- und *TCTA*-Promotordelektionskonstrukte wurden durch PCR von genomischer DNA amplifiziert. Die Position der genutzten Primer ist in Abbildung 3.1.7.2 schematisch dargestellt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde durch die Zwischenklonierung in den Vektor pCR[®]8/GW/TOPO mit *attL*-Sites flankiert und anschließend durch eine LR-Reaktion in den Gateway-kompatiblen Vektor pGL3 basic (Promega) umkloniert. Genetische Varianten wurden mittels Mutagenese (siehe 3.1.6) in die Konstrukte eingeführt.

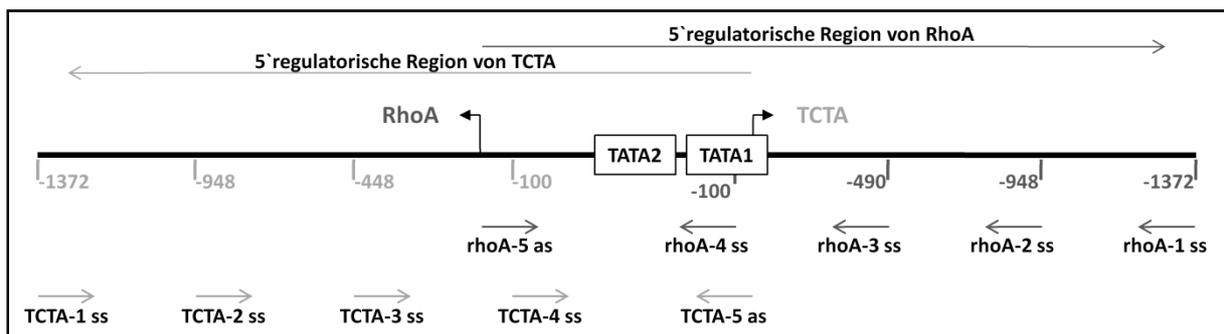


Abb. 3.1.7.2: Schematische Darstellung der Lage der Primer für die Herstellung der Promotordelektionskonstrukte.

3.1.7.3 Konstruktion des bidirektionalen Vektors

Das *DsRed*-Gen wurde aus dem Vektor pDsRed2-N1 (Clontech), das *EGFP*-Gen aus dem Vektor pEGFP-N1 (Clontech) amplifiziert und in den Shuttlevektor pCR[®]8/GW/TOPO kloniert. Die Primer wurden so gewählt, dass am 5'- bzw. 3'-Ende des *DsRed*-Fragments eine *NheI*- bzw. *SacI*-Schnittstelle generiert wurde, am 5'- bzw. 3'-Ende des *EGFP*-Fragments eine *XbaI*- bzw. *HindIII*- Schnittstelle.

Der Gateway-kompatible Vektor pGL3 basic (Promega) wurde mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *SacI* hydrolysiert (siehe 3.1.4.1), durch Gelextraktion (siehe 3.1.8.1) aufgereinigt, dephosphoryliert (siehe 3.1.4.2) und mit dem zuvor *NheI/SacI*-geschnittenen *DsRed*-Fragment ligiert (siehe 3.1.4.3). Der so gebildete Vektor wurde mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *HindIII* inkubiert. Dies führte zum Verlust des Luziferasereportergens. Nach Dephosphorylierung und Gelelution des geschnittenen Vektors wurde dieser mit dem zuvor *XbaI/HindIII* hydrolysierten *EGFP*-Fragment ligiert.

Für die Konstruktion der Negativkontrolle erfolgte die oben beschriebene Klonierung mit dem nicht-Gateway-kompatiblen Vektor pGL3basic. Für die Konstruktion der Positivkontrolle wurde der SV40-Enhancer des pGL3 control (Promega) durch

Restriktion mit *Bam*HI und *Fse*I isoliert, durch Gelelektion aufgereinigt und mit dem zuvor *Bam*HI/*Fse*I-hydrolysierten Vektor pGL3 basic ligiert. Anschließend erfolgte die o. g. Klonierung sowie die Konvertierung in einen Gateway kompatiblen Vektor. Nach Amplifikation des SV-40 Promotors aus dem Vektor pGL3 control und der Zwischenklonierung des PCR-Fragments in pCR8®/GW/TOPO wurde dieser in beiden Orientierung mittels LR-Reaktion in den Positivkontrollvektor einkloniert.

3.1.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

3.1.8.1 Gelextraktion

Die Gelextraktion von DNA-Fragmenten wurde entsprechend der Anweisungen des Herstellers mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction“-Kits (Qiagen) durchgeführt. Die gewünschte DNA-Bande wurde zunächst mit einem Skalpell an einem UV-Tisch ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe des Puffers QG und Schmelzen des Gelstücks durch Inkubation bei 50 °C wurde die DNA an die Silica-Membran einer Säule gebunden und anschließend mehrfach gewaschen. Kleinere Mengen DNA (< 100 ng) wurden mit 30 µl, größere Mengen DNA (≥ 100 ng) mit 50 µl zuvor auf 70 °C erhitzten Puffer AE eluiert.

3.1.8.2 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des „High Pure PCR Product Purification“-Kits (Roche). Hierzu wurde der PCR-Ansatz zunächst mit einem chaotropen Puffer versetzt, die DNA an die Glasfasermatrix eines Säulchens gebunden und durch mehrere Waschschrte von Primern, Nukleotiden und Salzen gereinigt. Das PCR-Produkt konnte anschließend von dem Säulchen eluiert werden.

3.1.8.3 DNA-Fällung

Die Fällung mit Hilfe von NaCl diente der Reinigung und Aufkonzentrierung kleiner DNA-Mengen. Hierzu wurde der DNA-Ansatz mit 1/10 Volumen einer 2 M NaCl-Lösung sowie 2 Volumen eiskalten 100% Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Der Ansatz wurde anschließend bei maximaler Geschwindigkeit für 20 min bei 0 °C zentrifugiert und 2 x mit 70%-igem eiskalten Ethanol gewaschen. In

Abhängigkeit der zu erwartenden DNA-Konzentration wurde das Luft-getrocknete Pellet in 15-30 µl Nuklease-freiem H₂O aufgenommen.

3.1.8.4 ExoSap-it Aufreinigung

Die ExoSap-it Behandlung von PCR-Produkten dient der schnellen Aufreinigung von PCR-Produkten durch Abbau von Primern und Nukleotiden. In Gegenwart von 0,05 U alkalischer Phosphatase (SAP; shrimp alkaline phosphatase; Fermentas) und 1 U Exonuklease I (ExoI, *E. coli*; Fermentas) wurden 25 µl PCR-Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert und die enzymatische Reaktion durch 15 minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert.

3.1.9 Sequenzierung

Zur Identifizierung genetischer Varianten und zur Kontrolle von Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte eine Sequenzierung mit Hilfe des ABI3730 Fluoreszenz-Sequenzierers (Applied Biosystems). Sequenzieransätze wurden nach Herstellerangaben mit dem „BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing“-Kit (Applied Biosystems) erstellt.

Standard Sequenzier-Ansatz

150 ng Plasmid-DNA bzw.

50 ng PCR-Produkt

0,5 µl BigDye 3.1

2 µl 5 x SeqMix

1,6 µM Primer

ad 10 µl H₂O

3.1.10 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der EMSA ist ein *in vitro* Verfahren zur Detektion von DNA-Proteininteraktionen. Er beruht auf der Tatsache, dass ein DNA-Protein-Komplex in einer nicht-denaturierenden Gelmatrix langsamer im angelegten Spannungsfeld wandert als freie DNA-Fragmente. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Größe und der Ladung der aufzutrennenden Komponenten.

Die EMSA-Experimente erfolgten, in leicht veränderter Form, nach Herstellerangaben mit dem „LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit“ (Pierce). Hierzu wurden 5 µg Kernproteinextrakt, 1 x Bandshift-Puffer, 0,01 U poly dI•dC/dA•dT sowie 250 mM Betain für 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 40 fmol biotinylierter DNA-Sonde und eine weitere Inkubation für 30 min bei RT. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit 200-fachem Überschuss an unmarkierter DNA-Sonde (Kompetitor) sowie ein Ansatz ohne Kernproteinextrakt, jedoch mit der entsprechenden Menge Lysispuffer B aus der Kernpräparation.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Ansätze erfolgte unter Verwendung nativer, 6%-iger Polyacrylamid-Gele in Vertikalapparaturen (BioRad) bei einer Spannung von 100 V in 0,5 x TBE Laufpuffer. Freie DNA und DNA-Proteinkomplexe wurden anschließend für eine Stunde bei 100 V im Tank-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran geblotted und mit Hilfe des „Chemiluminescent Nucleic Acid Detection“-Kit (Thermo Scientific) sichtbar gemacht. Abweichend von den Herstellerangaben wurde für das Blocken der Membran „Blocking Reagent“ (Roche) genutzt.

4 x Bandshift-Puffer

20 mM MgCl₂

240 mM KCl

40 mM HEPES/KOH pH 7,9

5 mM Spermidin

16% (w/v) Ficoll

5 x TBE

450 mM Tris

450 mM Borsäure

10 mM EDTA

3.1.11 Bisulfit-Konvertierung

CpG-Dinukleotide und CpG-Inseln in regulatorischen Regionen von Genen liegen häufig methyliert vor. Sie können die transkriptionelle Regulation dieser Gene beeinflussen und stellen daher eine epigenetische Kontrollebene dar.

Der Methylierungsstatus von CpG-Inseln wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe des „EpiTect[®]Bisulfite“-Kits (Qiagen) nachgewiesen. Genomische DNA wurde mit einem Bisulfit-haltigen Puffer behandelt, so dass nicht methylierte Cytosinreste in Cytosinsulphonat- und anschließend zu Uracilsulphonatreste desaminiert wurden (Abbildung 3.1.11). Es folgte die Bindung der DNA an die Membran eines Säulchens, die Entfernung von Pufferresten durch einen Waschschrift sowie die Desulfonierung des Uracilsulphonats zu Uracil. Nach weiteren Waschschriften wurde die DNA eluiert und für eine PCR mit methylierungsspezifischen Primern eingesetzt.

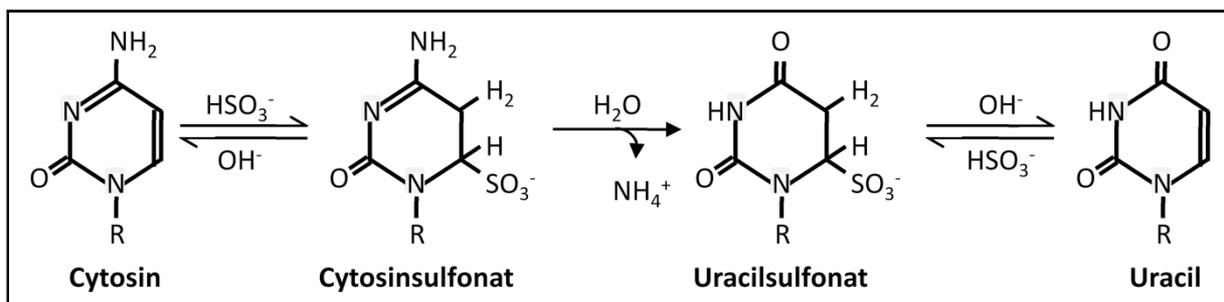


Abb. 3.1.11: Darstellung der chemischen Reaktion der Konvertierung von Cytosin zu Uracil.

3.2 Protein-biochemische Methoden

3.2.1 Isolierung von Kernproteinen

Die Extraktion von Kernproteinen beruht auf der Methode von Schreiber (Schreiber et al., 1986). Circa 1×10^7 Zellen wurden 2 x mit kaltem PBS gewaschen und mit einem hypotrophen, Detergenz-haltigen Puffer lysiert. Das Lysat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und die noch intakten Zellkerne durch Zentrifugation für 5 min bei 15.000 g und 4 °C sedimentiert. Durch 30 minütige Inkubation (unter wiederholtem vortexen) der Zellkerne auf Eis in einem hypertrophen Puffer, erfolgte die osmotische Extraktion der nuklearen Proteine aus dem Zellkern. Die Kernhülle mit der in ihr verbleibenden genomischen DNA wurde durch 30 minütige Zentrifugation bei 15.000 g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und für weitere 10 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Lysispuffer A (hypotrophy)

10 mM HEPES, pH 7,9
 10 mM KCl
 0,1 mM EDTA, pH 8,0
 0,1 mM EGTA, pH 8,0
 2 mM DTT
 1 mM Na_2MoO_4
 Protease Inhibitor

Lysispuffer B (hypertroph)

10 mM HEPES, pH 7,9
 10 mM KCl
 0,1 mM EDTA, pH 8,0
 0,1 mM EGTA, pH 8,0
 2 mM DTT
 1 mM Na_2MoO_4
 0,4 M NaCl
 10% Glycerin
 Protease Inhibitor

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Nachweis der Proteinkonzentration beruht auf der Reaktion von Bicinchoninsäure (BCA; bicinchoninic acid) mit einwertigen Kupferionen zu einer Komplexverbindung mit violetter Farbe. In alkalischer Lösung reduzieren Proteine zweiwertige Kupferione quantitativ zu einwertigen Kupferionen, so dass der violette Farbumschlag im BCA-Test bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden kann. Der Proteinnachweis erfolgte nach Herstellerangaben mit

dem „Pierce®BCA Protein Assay“-Kit (Thermo Scientific). Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe (bovin serum albumin, Rinderserumalbumin) mit bekannter Proteinkonzentration.

3.3 Zellbiologische und mikrobiologische Methoden

3.3.1 Prokaryotische Zellen

3.3.1.1 Kulturbedingungen

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen erfolgte bei 37 °C in LB-Schüttelkulturen (250 rpm) oder auf LB-Festmedium. Zur Selektion wurde dem Medium Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (30 µg/ml) bzw. Spectinomycin (100 µg/ml) zugefügt.

3.3.1.2 Gefrierkulturen

Für die Langzeitlagerung wurden eine 5 ml über Nacht Kultur abgefugt, das Zellpellet in LB-Medium in Gegenwart von 40% Glycerin aufgenommen, Aliquots in Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.3.1.3 Herstellung kompetenter Zellen

LB-Medium mit 20 mM MgSO₄ wurde mit einer *E. coli* über Nacht Kultur angeimpft und bis zu einer OD₅₉₀ = 0,4-0,6 bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator angezogen. Die Kultur wurde anschließend bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, das Pellet in $\frac{1}{2,5}$ Volumen eiskaltem TFBI-Puffer aufgenommen und der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm und 4 °C. Das Pellet wurde in $\frac{1}{25}$ Originalvolumen TFBII aufgenommen, für 15-60 min auf Eis inkubiert, anschließend in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und in Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung kompetenter Zellen erfolgte bei -80 °C.

TFBI

30 mM KOAc
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
50 mM MnCl₂
15% Glycerin

TFBII

10 mM MOPS
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15% Glycerin

3.3.1.4 Transformation

Ein bis vier µl zu transformierende Plasmid-DNA wurde zu einem noch gefrorenem Aliquot kompetenter Zellen gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 30 sec bei 42 °C, eine Inkubation für 1 min auf Eis, die Zugabe von 250 µl LB-Medium (37 °C) sowie eine Inkubation für 45 min bei 37 °C. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert.

3.3.2 Eukaryotische Zellen**3.3.2.1 Kulturbedingungen**

EA.hy926-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FCS; PAA), 1000U/ml Penicillin (Sigma-Aldrich), 1 mg/ml Streptavidin (Sigma-Aldrich) und 2 mM/ml L-Glutamin (Sigma-Aldrich) im CO₂-Inkubator kultiviert. Wo erforderlich erfolgte eine Stimulation mit 10⁻⁸ PMA bzw. 0,5 mM cAMP für 24 h. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 2 min trypsinisiert und für die weitere Kultivierung in gewünschter Dichte ausgesät.

3.3.2.2 Lagerung

Für die Langzeitlagerung wurden die EA.hy926-Zellen trypsinisiert, in Medium aufgenommen und durch Zentrifugation pelletiert. Es folgte das Lösen des Zellpellets in Medium mit 10% DMSO und 20% fetalem Kälberserum, die Aliquotierung in Cryogefäße sowie das langsame Einfrieren bei -80 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

In Stickstoff gelagerte Zellen wurden durch schnelles Auftauen bei 37 °C und Aufnahme in Medium wieder in Kultur überführt. Am nächsten Tag folgte ein Mediumwechsel zur Entfernung des DMSO.

3.3.2.3 Transiente Transfektion

Die Transfektion von EA.hy926 erfolgte mit Hilfe von Nanofektin (PAA). Pro Well einer 24-Well-Platte wurden 6×10^6 Zellen in 500 μ l Medium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag folgte 2 h vor der Transfektion ein Mediumwechsel. Für die Transfektion wurde 1 μ g des zu transfizierenden Plasmids, sowie 3,2 μ l Nanofektin mit je 50 μ l „Delution-Reagent“ (PAA) gemischt, die Ansätze anschließend vereint und für 20 min bei RT inkubiert. Durch tröpfchenweise Zugabe von 100 μ l Transfektionsansatz in jedes Well unter Schütteln der Kulturplatte und einer Inkubation für 4 h im Brutschrank erfolgte die Transfektion. Es folgte ein weiterer Mediumwechsel sowie die Inkubation der Zellen für 24 h im Brutschrank.

Für die Transfektion der Deletionskonstrukte wurden äquimolare Mengen der einzelnen Plasmide eingesetzt. Zum DNA-Mengenausgleich diente der Vektor pOGH. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pGL3 basic (Promega), als Positivkontrolle der Vektor pGL3 control (Promega) transfiziert.

3.3.2.4 Zellernte und Auswertung der Transfektion

Die transfizierten Zellen wurden nach Absaugen des Mediums durch Inkubation für 20 min bei RT in Gegenwart von 100 μ l/Well 1 x Lysispuffer (Promega) aufgeschlossen. Je 20 μ l des Lysats wurden anschließend mit 75 μ l „Luciferase Assay Substrate“ (Promega) gemischt und die enzymatische Reaktion des Luziferasegens im Luminometer (Sirius, Berthold Detection System) gemessen.

3.4 Studienpopulationen

Für die Identifizierung genetischer Varianten wurde genomische DNA von Patienten der MolProMD Studie (Münster Molecular Functional Profiling for Mechanism Detection, Dördelmann et al., 2008) untersucht. Die MolProMD-Studie dient der Erfassung molekularer Mechanismen kardiovaskulärer Erkrankungen.

3.5 *In silico* Untersuchungen

Die Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindestellen erfolgte mit Hilfe des Programms AliBaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>). Es bedient sich der in der TRANSFAC7.0 Datenbank gesammelten realen Sequenzen für Transkriptionsfaktorbindestellen (Grabe, 2002). Wo angegeben, wurde auf die TRANSFAC12 Datenbank zurückgegriffen (persönliche Mitteilung Niels Grabe).

Für Homologievergleiche zur Überprüfung evolutionär konservierter Regionen wurde der „ECR-Browser“ (<http://ecrbrowser.dcode.org>) genutzt (Ovcharenko et al., 2004). Genomische Sequenzen sowie Intron- und Exonbereiche wurden mit Hilfe des UCSC Genome Browsers (<http://genome.ucsc.edu>), putative siRNA- und miRNA-Gene mit Hilfe von FANTOM (<http://fantom.gsc.riken.jp/4/gev/gbrowse/hg18>) ermittelt.

3.6 Statistische Methoden

Die graphische Darstellung und die Ermittlung von Standardabweichungen der Transfektionen erfolgten mit Hilfe des Programms „Graph Pad Prism 5.0“. Für die Berechnung von Signifikanzen wurde ein ungepaarter, Zweistichproben-T-Test genutzt. Hierbei legten wir fest: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ und ns $p > 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Genomische Konstellation des *RhoA*-Genlocus

Die genomische Konstellation des *RhoA*-Genlocus wurde mit Hilfe des „UCSC genome browsers“ (<http://genome.ucsc.edu/>) analysiert. Das *RhoA*-Gen wird durch den (-)-Strang des Chromosoms 3p21 kodiert (NT_022517.18). Aufgebaut ist das Gen aus 5 Exons und 4 Introns, die sich über einen Bereich von ca. 54 kb erstrecken. Das erste Exon enthält ausschließlich 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) und ist vom zweiten Exon durch das größte, etwa 36 kb überspannende erste Intron getrennt. In direkter Nachbarschaft zum *RhoA*-Gen liegt das durch den (+)-Strang des Chromosoms 3p21 kodierte *TCTA*-Gen (T-cell leukemia translocation-associated gene; NT_022517.18). Es besitzt 3 Exons und 2 Introns und erstreckt sich über einen Bereich von ca. 2,9 kb (Abbildung 4.1).

Getrennt sind die beiden divergent orientierten Gene durch einen gemeinsamen Promotorbereich von 112 bp. In diesem Bereich sind zwei TATA-Boxen lokalisiert, eine in Orientierung zum *RhoA*-Gen, die andere in Orientierung zum *TCTA*-Gen (Abbildung 4.1). Mit dem Vorhandensein dieser Core-Promotorelemente wird der Bereich zwischen beiden Genen vermutlich als Assemblierungsstelle der basalen Transkriptionsmaschinerie genutzt und dient somit beiden Genen als gemeinsamer Core-Promotor. Die divergente Organisation von *RhoA* und *TCTA* impliziert, dass Bereiche des *TCTA*-Gens als regulatorische Region des *RhoA*-Gens genutzt werden

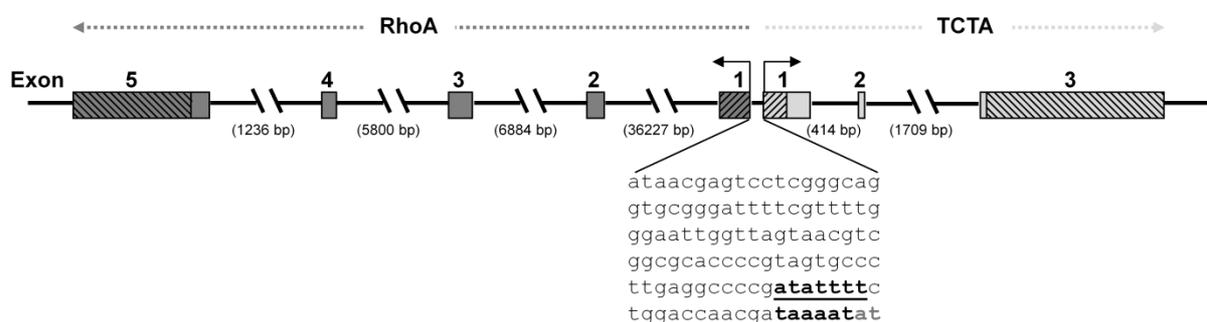


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des *RhoA/TCTA*-Genlocus. Das durch den (-)- Strang des Chromosoms 3p21 kodierte *RhoA*-Gen (dunkelgrau) ist durch eine 112 bp lange Promotorregion von dem durch den (+)-Strang kodierten *TCTA*-Gen (hellgrau) getrennt. Die 112 bp Promotorregion enthält zwei TATA-Boxen (fett gedruckt und unterstrichen). Kästchen kennzeichnen Exons, (unterbrochene) Linien Introns. Schraffierte Kästchen stellen 5'- bzw. 3'-UTR dar. Abgewinkelte Pfeile markieren die *RhoA*- bzw. *TCTA*-Transkriptionsstartstelle.

und umgekehrt. Somit würden während der Transkription des einen Gens die regulatorischen Faktoren des jeweils anderen Gens verdrängt, so dass RhoA und TCTA vermutlich alternierend exprimiert werden.

4.2 Endogene RhoA und TCTA Expression

Zur Überprüfung der parallelen/synchronen Nutzung des divergenten Genpaares und zur Identifizierung eines geeigneten Zellsystems für Promotoranalysen wurde die endogene Expression von RhoA und TCTA in der Endothelzelllinie EA.hy926 überprüft. Zu diesem Zweck erfolgte eine semiquantitative PCR mit cDNA unstimulierter (w/o) sowie 8-Br-cAMP- [0,5 mM] und PMA- [10^{-8} M] stimulierter EA.hy926 Zellen sowie Primerpaaren in Exon1 und 5 des *RhoA*- bzw. Exon 1 und 3 des *TCTA*-Gens. Exon-übergreifende Primer gegen das unter allen stimulatorischen Bedingungen gleichermaßen transkribierte „humane ribosomale Protein 27“ (*hrp27*) dienten zur Überprüfung der Integrität der eingesetzten cDNA. Obwohl *RhoA* und *TCTA* vermutlich eine gemeinsame Core-Promotorregion nutzen, wurden beide Gene unter allen getesteten Bedingungen gleichmäßig exprimiert (Abbildung 4.2).

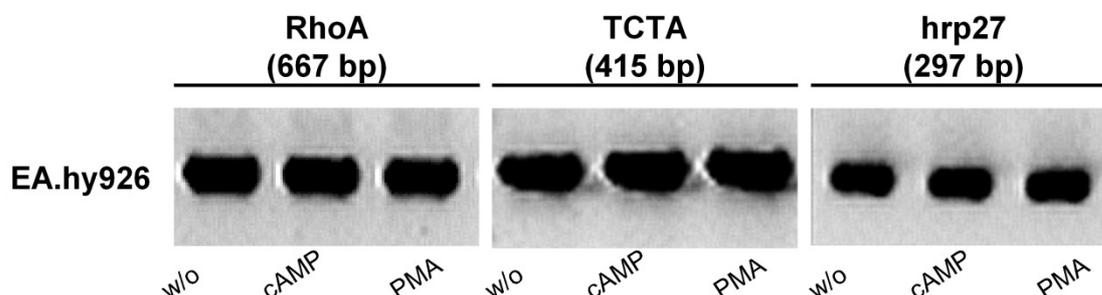


Abb. 4.2: Endogene Expression von RhoA- und TCTA-mRNA in EA.hy926 Zellen. cDNA unstimulierter (w/o) sowie 8-Br-cAMP- [0,5 mM] und PMA- [10^{-8} M] stimulierter EA.hy926 Zellen wurde in einer semiquantitativen PCR mit exonübergreifenden Primern zum Nachweis von RhoA- und TCTA-Transkript eingesetzt. Das Haushaltsgen „human ribosomal protein 27“ (*hrp27*) diente als Kontrolle. RhoA- und TCTA-mRNA wurden unter allen getesteten Bedingungen quantitativ gleichmäßig exprimiert.

4.3 Identifizierung von Transkriptionsstartstellen des *RhoA*- und *TCTA*-Gens

Da die Nutzung von Transkriptionsstartstellen (TSS) zelltyp- und entwicklungsspezifisch erfolgt, wurde zur Bestätigung der im „UCSC genome browser“ (www.genome.ucsc.edu) aufgeführten *RhoA*- und *TCTA*-TSS 5'-RACE-Analysen mit RNA unstimulierter EA.hy926 Zellen durchgeführt. Für beide Gene des divergent orientierten Paares konnten die im „UCSC genome browser“ angegebenen TSS (TSS1) validiert werden (Abbildung 4.3.a). Ihr folgen 274 bp (*RhoA*) bzw. 221 bp (*TCTA*) 5'-UTR. Sowohl für *RhoA* als auch für *TCTA* konnten weitere drei TSS innerhalb der 5'-UTR identifiziert werden. Diese liegen 171 bp (TSS2), 153 bp (TSS3) sowie 115 bp (TSS4) vom ATG-Startcodon des *RhoA*-Gens bzw. 85 bp (TSS2), 68 bp (TSS3) sowie 4 bp (TSS4) vom ATG-Startcodon des *TCTA*-Gens entfernt.

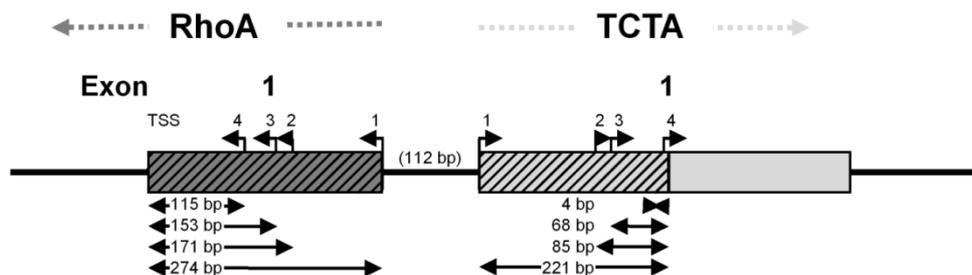


Abb. 4.3.a: Schematische Darstellung der *RhoA*- und *TCTA*-Transkriptionsstartstellen. Die *RhoA*- und *TCTA*-Transkriptionsstartstellen wurden durch 5'-RACE ermittelt. Dargestellt sind die *RhoA* 5'-UTR (dunkelgraues schraffiertes Kästchen), die *TCTA* 5'-UTR (hellgraues schraffiertes Kästchen) und kodierender Exonbereich (hellgrau). Die jeweils vier identifizierten Transkriptionsstartstellen sind durch rechtswinklige (*TCTA*) bzw. linkswinklige (*RhoA*) Pfeile gekennzeichnet.

Zur Bestätigung der durch 5'-RACE identifizierten TSS erfolgte eine diakritische PCR (Abbildung 4.3.b). Hierzu wurden direkt an den jeweiligen TSS beginnende sense Primer sowie in Exon 5 des *RhoA*-Gens bzw. Exon 3 des *TCTA*-Gens gelegene antisense Primer verwendet. Aufgrund des geringen Abstandes zwischen den TSS2 und 3 des *RhoA*-Gens erfolgte die Nutzung nur eines sense Primers. Alle durch die 5'-RACE identifizierten TSS konnten durch die diakritische PCR bestätigt werden. Die TSS1 des *RhoA*- und *TCTA*-Gens wurde in EA.hy926 Zellen jedoch in deutlich geringerem Maße genutzt. Da sie jedoch die am weitesten 5'-lokalisierten TSS darstellen, dienten sie als Referenz für die Positionsangaben der SNPs sowie der Herstellung der Promotorkonstrukte.

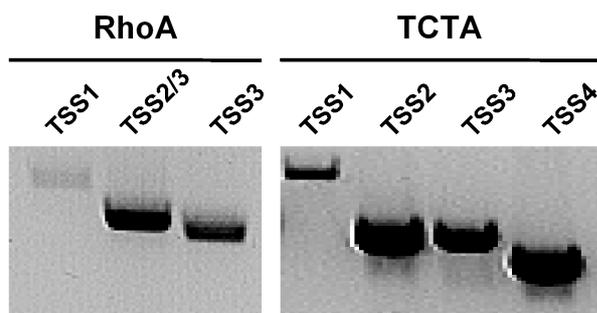


Abb. 4.3.b: Diakritische PCR zur Bestätigung der *RhoA*- und *TCTA*-Transkriptionsstartstellen. Alle durch 5'-RACE identifizierten *RhoA*- und *TCTA*-Transkriptionsstartstellen wurden genutzt, die *RhoA*- und *TCTA*-Transkriptionsstartstelle 1 jedoch in deutlich geringerem Maße.

4.4 Identifizierung genetischer Varianten im *RhoA*- und *TCTA*-Promotor

Zur Identifizierung genetischer Varianten wurden jeweils 1600 bp der 5'-flankierenden Region des *RhoA*- und *TCTA*-Gens sowie 274 bp (*RhoA*) bzw. 220 bp (*TCTA*) der 5'-UTR bei 60 Patienten der MolProMD-Studie (genomische DNA) durch Amplifizierung und Resequenzierung jeweils 8 überlappender Fragmente untersucht. Im 5'-flankierenden Bereich des *RhoA*-Gens konnten zwei bereits bekannte SNPs (-923G>A [rs6779524] und -1338T>C [rs6784820]), in der 5'-flankierenden Region des *TCTA*-Gens zwei bekannte (-1112C>T [rs4855877] und -1216G>A [rs73088137]) sowie ein bisher nicht beschriebener SNP (-619G>A) lokalisiert werden (Abbildung 4.4.a).

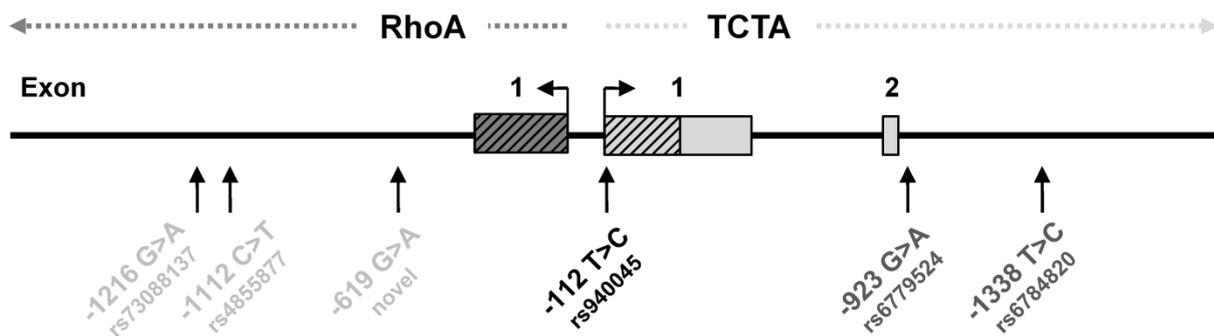


Abb. 4.4.a: Schematische Darstellung der Position identifizierter genetischer Varianten. Mittels PCR und Resequenzierung wurden 1600 bp der *RhoA* und *TCTA* 5'-flankierenden Region auf genetische Varianten untersucht. Die *RhoA* 5'-UTR (dunkelgrau schraffiertes Kästchen), die *TCTA* 5'-UTR (hellgrau schraffiertes Kästchen), kodierendes Exon (hellgrauer Kästchen) sowie Transkriptionsstartstellen (rechtswinkliger und linkswinkliger Pfeil) sind gekennzeichnet. Die Lage der identifizierten SNPs ist durch Pfeile markiert. (rs-Nummern entnommen der NCBI-Datenbank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>])

Der 112 bp große Promotorbereich zwischen dem divergent angeordneten Genpaar enthält eine T zu C Substitution an Position -112 bezogen auf die *RhoA*-TSS1, bzw. -1 bezogen auf die *TCTA*-TSS1 [rs940045]. Da dieser SNP in der zum *RhoA*-Gen orientierten TATA-Box lokalisiert ist und somit eines der Core-Promotorelemente verändert, wurde er durch *in silico* Analysen mit Hilfe des Netz-basierten Programms

AliBaba2.1 genauer geprüft (Abbildung 4.4.b). Die Analyse bestätigte eine durch den SNP hervorgerufene Veränderung der Transkriptionsfaktorbindestelle (TFBS). Während für das häufigere T-Allel eine TFBS für den generellen Transkriptionsfaktor TFIID und seine Untereinheit „TATA-Box bindendes Protein“ (TBP) vorhergesagt wurde, entfiel diese für das C-Allel. Hingegen wurde in Gegenwart des C-Allels eine putative TFBS für einen Faktor der C/EBP-Familie generiert, eine durch den Besitz einer für die Dimerisierung und DNA-Bindung notwendigen hoch konservierten „basic-leucine zipper“ Domäne charakterisierten Gruppe von TF.

```

gaggccccgatatttctggaccaacgataaaatcatgagggcctcagtg
      ===TBP===
      ===TFIID===
                                ===TFIID===
                                ===TBP===
                                ===C/EBPα===

```

Abb. 4.4.b: *In silico* Analyse der Assemblierungsstelle der basalen Transkriptionsmaschinerie. Die Analysen wurden mit Hilfe des Programms AliBaba 2.1 durchgeführt. Durch den SNP -112T>C [rs940045] entfällt eine zweite Bindungsstelle für den generellen Transkriptionsfaktor TFIID und seine Untereinheit TBP (rot). Das seltenere Allel (blau) generiert eine C/EBP-Bindungsstelle.

4.5 Reporteranalysen

Für Reporteranalysen wurde das pGL3-System der Firma Promega (Mannheim) mit den Vektoren pGL3-basic und pGL3-control verwendet (Abbildung 4.5). Der promotorlose Vektor pGL3-basic besitzt ein Luziferase-Reportergen sowie eine diesem Gen vorgeschaltete „Multiple Cloning Site“ (MCS). Eingefasst ist die Kasette aus Reportergen und MCS durch zwei poly(A)-Sites, die starke Stopp-Signale für transkriptionelle Ereignisse darstellen. Durch das Einbringen einer zu untersuchenden, regulatorischen Sequenz in die MCS des Vektors pGL3-basic und die dadurch erfolgende Expression des leicht nachweisbaren Reportergens ist eine quantitative Analyse von transkriptionell aktiven Regionen möglich. Der Vektor pGL3-control trägt in der MCS einen SV40-Promotor sowie außerhalb der durch poly(A)-Signale eingefassten Kasette aus SV40-Promotor und Luziferase-Reportergen einen SV40-Enhancer. Dies führt zu einer starken konstitutiven Expression des Luziferasegenprodukts, so dass der Vektor pGL3-control die Kontrolle der Transfektionseffizienz ermöglicht.



Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Reportervektoren. Der Vektor pGL3-basic besitzt ein Luziferasereportergen sowie eine dem Reportergen vorgeschaltete „Multiple Cloning Site“ (MCS). Eingefasst ist die Kasette aus Reportergen und MCS durch zwei poly(A)-Signale. Der Vektor pGL3-control trägt in der MCS einen SV40-Promotor sowie außerhalb der durch poly(A)-Signale eingefassten Kasette einen SV40-Enhancer. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Ralph Telgmann; leicht verändert.

4.5.1 RhoA- und TCTA-Promotordeletionskonstrukte

Zur Identifizierung transkriptionell aktiver Bereiche der *RhoA* und *TCTA* 5'-flankierenden Region wurden serielle Deletionskonstrukte hergestellt (Abbildung 4.5.1.a). Sie begannen jeweils an Position -1 bezogen auf die TSS1 des entsprechenden Gens und schlossen somit die 5'-UTR aus. Das längste Konstrukt (p-1372/-1H2) reichte 1372 bp in die 5'-flankierende Region von *RhoA* bzw. *TCTA* und trug die Wildtyp-Sequenz (T⁻¹³³⁸G⁻⁹²³T⁻¹¹² bezogen auf *RhoA* bzw. G⁻¹²¹⁶C⁻¹¹¹² G⁻⁶¹⁹A⁻¹ bezogen auf *TCTA*). Alle weiteren Konstrukte stellten 5'-Trunkierungen dieses Volllängenkonstrukts dar (p-948/-1H2 [G⁻⁹²³T⁻¹¹² für *RhoA* bzw. G⁻⁶¹⁹A⁻¹ für *TCTA*], p-490/-1H2 [T⁻¹¹² *RhoA* spezifisches Konstrukt], p-448/-1H2 [A⁻¹ *TCTA* spezifisches Konstrukt] und p-100/-1 [A⁻¹ für *TCTA*]). Die Konstrukte wurden zudem mit dem C-Allel (Chr. 3p21, Position 49.449.638) an Position -112 bezogen auf die *RhoA*-TSS1 bzw. -1 bezogen auf die *TCTA*-TSS1 hergestellt und im Gegensatz zur Wildtypsequenz (Haplotyp H2) als Haplotyp H1 bezeichnet.

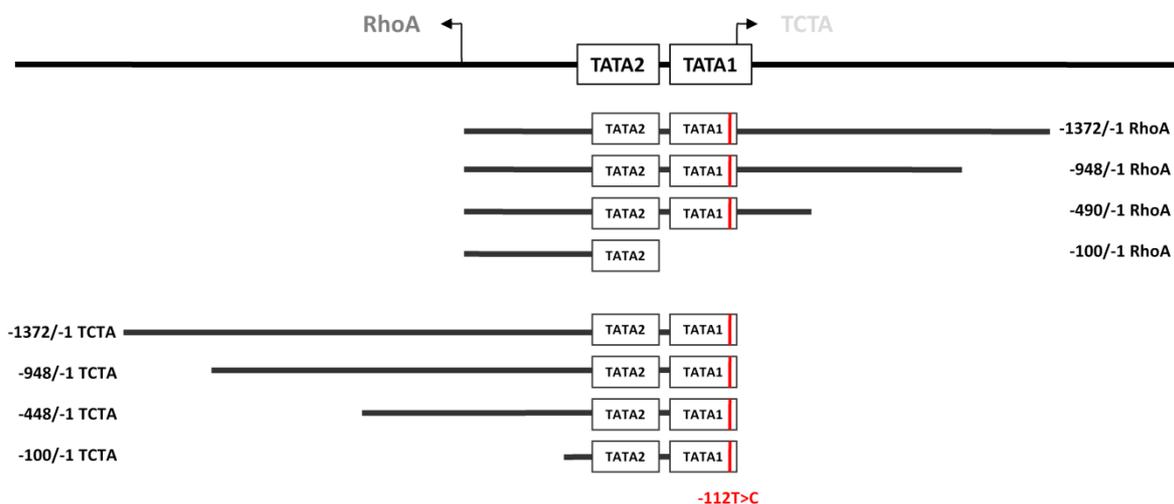


Abb. 4.5.1.a: Schematische Darstellung der RhoA- und TCTA-Promotordeletionskonstrukte. Die Deletionskonstrukte begannen an Position -1 bezogen auf die *RhoA*- bzw. *TCTA*-Transkriptionsstartstelle und reichten 100 bp, 448 bp bzw. 490 bp, 948 bp sowie 1372 bp in die 5'-flankierende Region des *RhoA*- bzw. *TCTA*-Gens. Hergestellt wurden Deletionskonstrukte mit dem T- (Haplotyp H2) sowie mit dem C-Allel (Haplotyp H1). Die Größe der Promotorfragmente ist für die *RhoA*-Konstrukte am linken, für die *TCTA*-Konstrukte am rechten Rand angegeben. Die relative Lage der TATA-Boxen1 und 2 sowie die Position der genetischen Variante ist gekennzeichnet.

Die RhoA- und TCTA-Promotordeletionskonstrukte wurden zur Überprüfung ihrer transkriptionellen Aktivität unter nicht-stimulatorischen (w/o) sowie 8-Br-cAMP- [0,5 mM] und PMA- [10^{-8} M] stimulatorischen Bedingungen in EA.hy926 Zellen transfiziert und die enzymatische Aktivität des exprimierten Reportergens nach 24 h bestimmt (Abbildung 4.5.1.b).

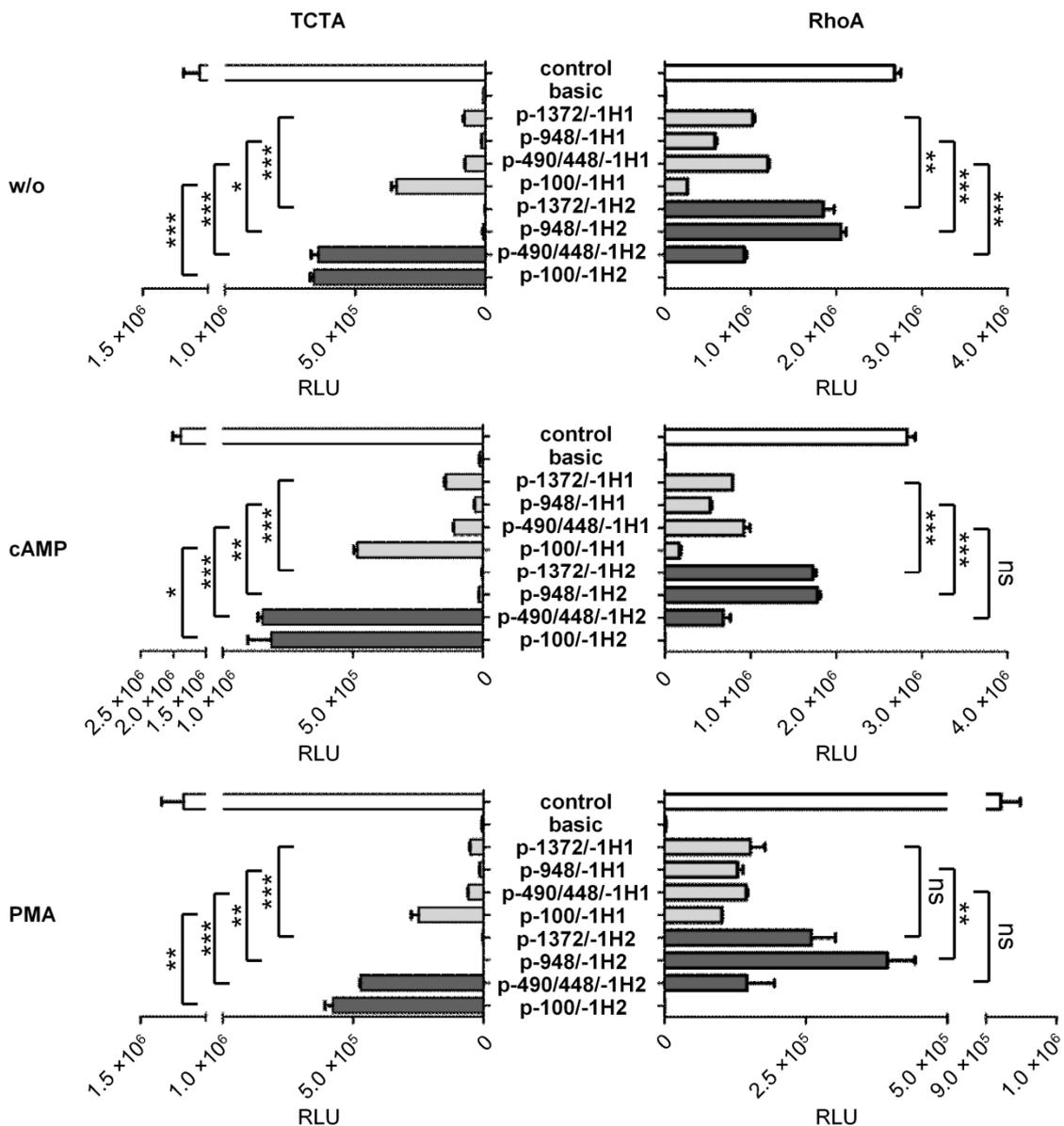


Abb. 4.5.1.b: Transkriptionelle Aktivität der RhoA- und TCTA-Promotordeletionskonstrukte. EA.hy926 Zellen wurden unter nicht-stimulatorischen (w/o) sowie 8-Br-cAMP- [0,5 mM] und PMA- [10^{-8} M] stimulatorischen Bedingungen mit RhoA- und TCTA-Promotordeletionskonstrukten transfiziert. RhoA- und TCTA-Konstrukte des Haplotypen H2 (T-Allel, dunkelgraue Balken) zeigten eine signifikant höhere transkriptionelle Aktivität im Vergleich zu Konstrukten des Haplotypen H1 (C-Allel, hellgraue Balken). Für RhoA zeigten die längsten (p-1372/-1; p-948/-1), für TCTA die kürzesten (p-448/-1; p-100/-1) Promotorkonstrukte die stärkste transkriptionelle Aktivität. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Sowohl für RhoA als auch für TCTA zeigten die Deletionskonstrukte des Haplotypen H2 (T-Allel, dunkelgraue Balken) unter allen getesteten Stimulationen eine signifikant höhere transkriptionelle Aktivität als Konstrukte des Haplotypen H1 (C-Allel, hellgraue Balken). Dabei waren die längsten RhoA- (p-1372/-1H2 und p-948/-1H2), jedoch die kürzesten TCTA-Konstrukte (p-448/-1H2 und p-100/-1H2) am stärksten aktiv.

Die längsten TCTA-Konstrukte (p-1372/-1H2 und p-948/-1H2) waren transkriptionell völlig inaktiv und reichten nicht über das Niveau des pGL3-basic hinaus. Die Trunkierung des Konstrukts p-948/-1H2 um 500 bp führte jedoch zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,0001$) der transkriptionellen Aktivität. Dies lässt auf das Wegfallen eines reprimierenden Elements in der Region -948/-448 schließen. Im Kontext des Haplotypen H1 (C-Allel an Position -1) scheint dieses reprimierende Element nicht mehr optimal mit den Faktoren des Core-Promotors interagieren zu können, da die transkriptionelle Aktivität der längsten TCTA-Konstrukte signifikant anstieg (Anstieg im Vergleich zum Haplotypen H2 um 98,6% [w/o], 98,4% [cAMP] und 96,2% [PMA], p-Wert jeweils $< 0,0001$ für p-1372/-1 bzw. 34,5%, $p = 0,0176$ [w/o], 48,6%, $p = 0,0025$ [cAMP] und 99,6%, $p = 0,0042$ [PMA] für p-948/-1). Das Einbringen des C-Allels führte zudem zu einem deutlich stärkeren Aktivitätseinbruch des p-448/1H2- (88% [w/o]; 87% [cAMP]; 87,7% [PMA], p-Wert jeweils $> 0,0001$) im Vergleich zum p-100/-1H2-Konstrukt (48,4%, $p = 0,0002$ [w/o]; 40,7%, $p = 0,0225$ [cAMP]; 57,1%, $p = 0,0013$ [PMA]). Dies deutet darauf hin, dass ein im Bereich von -448/-100 lokalisiertes aktives Element nicht mehr mit dem nun veränderten Core-Promotor wechselwirken kann.

Das RhoA p-948/-1H2 Konstrukt zeigte unter allen stimulatorischen Bedingungen eine signifikant höhere transkriptionelle Aktivität (55%, $p < 0,0001$ [w/o], 61,7%, $p = 0,0003$ [cAMP] bzw. 63%, $p = 0,0227$ [PMA]) als das RhoA p-490/-1H2-Konstrukt. Dies lässt auf ein aktivierendes Element in den trunkierten 458 bp schließen. Da durch die Einführung des C-Allels an Position -112 (Haplotyp H1) insbesondere die Aktivität der zuvor aktivsten RhoA-Konstrukte p-1372/-1H2 und p-948/-1H2 deutlich einbrach (Einbruch im Vergleich zum Haplotyp H2 um 50,2%, $p = 0,0037$ [w/o], 55,6%, $p < 0,0001$ [cAMP] und 61,3%, $p = 0,0966$ [PMA] für p-1372/-1 bzw. 71,6%, $p < 0,0001$ [w/o], 70,2%, $p < 0,0001$ [cAMP] und 67,3%, $p = 0,006$ [PMA] für p-948/-1) ist zu vermuten, dass dieses aktive Element mit der basalen Transkriptionsmaschinerie des Core-Promotors interagiert.

Die RhoA-Deletionskonstrukte wurden zudem in umgekehrter/reverser Orientierung unter nicht-stimulatorischen (w/o) sowie stimulatorischen (8-Br-cAMP [0,5 mM] und PMA [10^{-8} M]) Bedingungen im Transkriptionsassay angeboten (Abbildung 4.5.1.c).

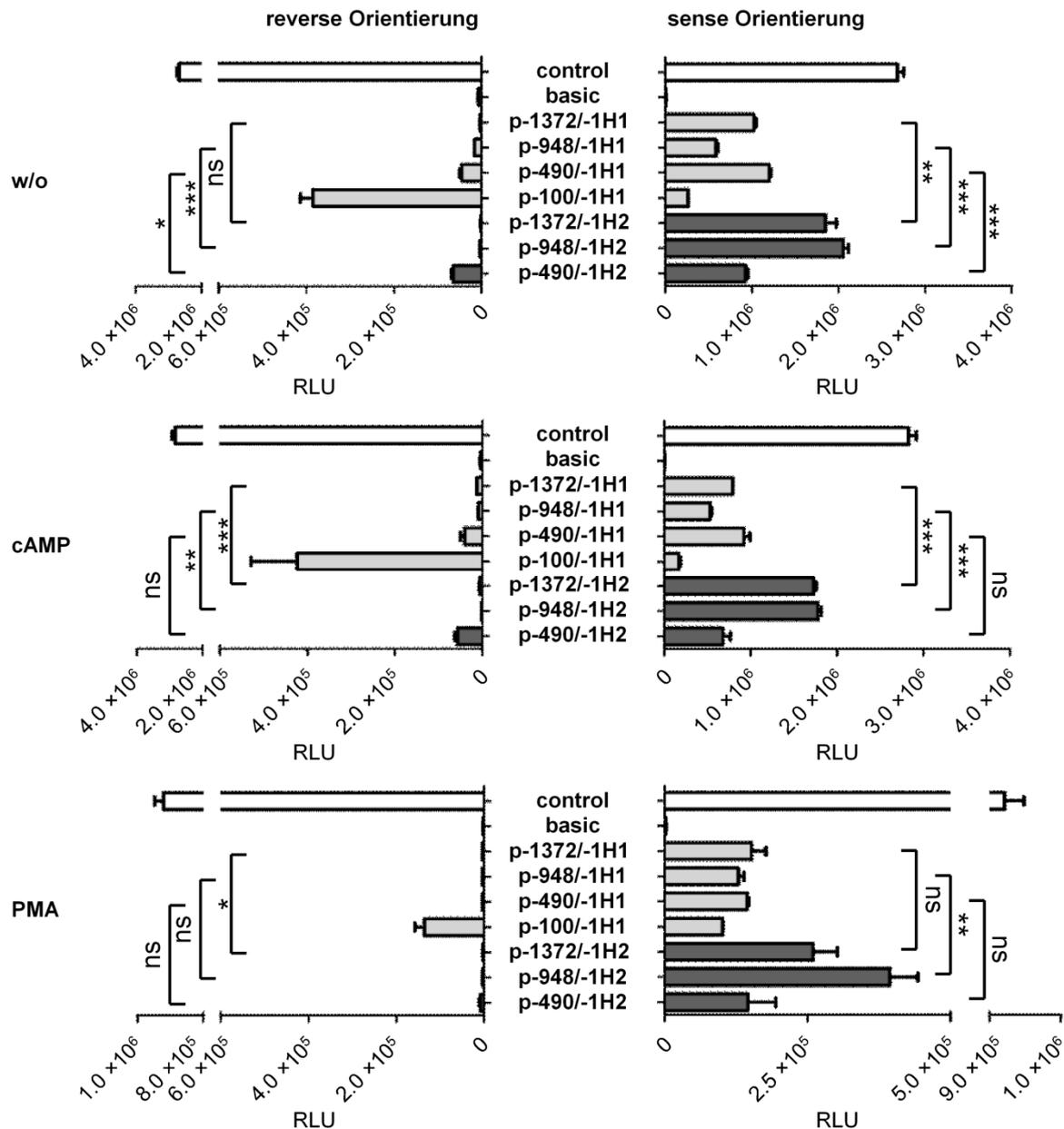


Abb. 4.5.1.c: Transkriptionelle Aktivität der RhoA-Promotordelionskonstrukte in reverser Orientierung. EA.hy926 Zellen wurden unter nicht- (w/o) sowie unter stimulatorischen Bedingungen (8-Br-cAMP [0,5 mM] und PMA [10^{-8} M]) mit RhoA-Promotordelionskonstrukten in reverser Orientierung transfiziert. Während die transkriptionelle Aktivität der längeren Konstrukte (p-1372/-1; p-948/-1) nicht über das Basalniveau des Leervektors pGL3-basic hinausreichte, zeigten die kürzeren Konstrukte, insbesondere das Kürzeste (p-100/-1), eine starke Aktivität. Zum Vergleich sind die transkriptionellen Aktivitäten der revers orientierten Konstrukte denen der sense orientierten Konstrukte gegenübergestellt. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Im Vergleich zu ihrer ursprünglichen/sense Orientierung zeigten die Konstrukte in reverser Orientierung eine deutlich geringere Aktivität. So wies das aktivste Konstrukt in reverser Orientierung eine etwa 5-fach schwächere Aktivität auf als das aktivste Konstrukt in sense Orientierung. Zudem reichten die in sense Orientierung aktivsten Konstrukte (p-1372/-1H2 und p-948/-1H2) in umgekehrter Orientierung unter allen getesteten Bedingungen in ihrer Aktivität nicht über das Niveau des Leervektors pGL3-basic hinaus. Die stärkste transkriptionelle Aktivität wies das in sense Orientierung inaktivste Konstrukt p-100/-1 auf. Dieses Konstrukt stellt eine 3'-Trunkierung des p-100/-1 TCTA-Konstrukts dar. Da jedoch keine wesentliche Änderung in der transkriptionellen Aktivität dieser beiden Konstrukte zu beobachten war, scheint diese Deletion mit der in ihr enthaltenen TATA-Box1 keinen entscheidenden Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität zu nehmen.

4.5.2 Mutation der TATA-Box2

Die Veränderung der TATA-Box1 durch das C-Allel an Position -112 führte zu einem signifikanten Einbruch der transkriptionellen Aktivität der RhoA- und TCTA-Promotordeletionskonstrukte (siehe Abschnitt 4.5.1). Um zu überprüfen, ob eine Veränderung der TATA-Box2 zu einer vergleichbaren Veränderung der transkriptionellen Aktivität führt, wurde analog zum SNP in der TATA-Box1 eine Mutation in die TATA-Box2 des aktivsten RhoA-Promotordeletionskonstrukts (p-948/-1) eingebracht (Abbildung 4.5.2). Diese Mutation erfolgte sowohl im Kontext des Haplotypen H1 (p-948/-1H1 Mut TATA2; hellgraue Balken) als auch des Haplotypen H2 (p-948/-1H2 Mut TATA2; dunkelgraue Balken).

Die Veränderung der TATA-Box2 im Kontext des Haplotypen H2 (p-948/-1H2 Mut TATA2) führte unter allen getesteten stimulatorischen Bedingungen (w/o, 8-Br-cAMP [0,5 mM] und PMA [10^{-8} M]) zu einem Einbruch der transkriptionellen Aktivität auf bzw. unter das Niveau des Vektors p-948/-1H1 ($p < 0,0001$ für [w/o] und [cAMP],

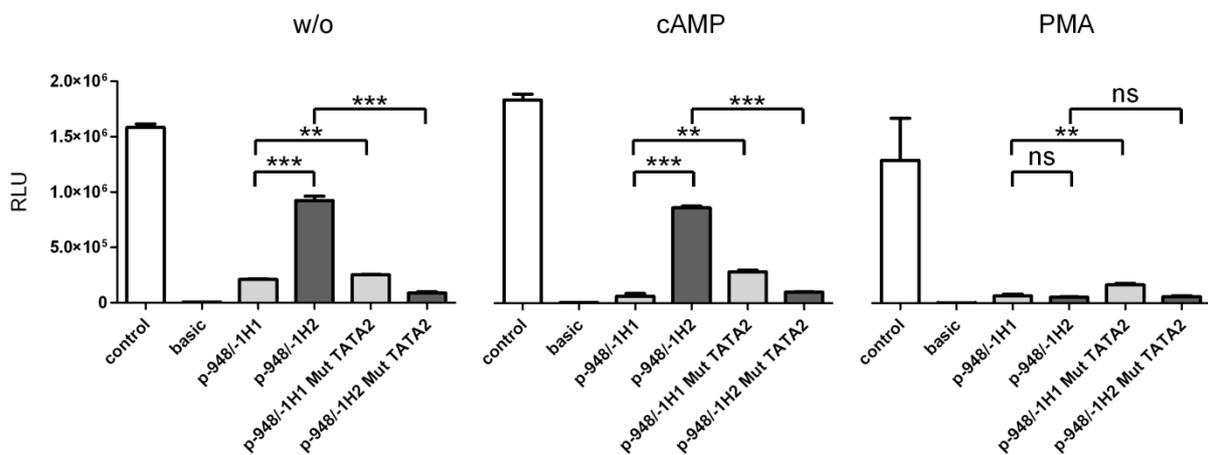


Abb. 4.5.2: Transkriptionelle Aktivität von RhoA-Konstrukten mit mutierter TATA-Box2.

Die TATA-Box2 des RhoA-Promotordeletionskonstrukts p-948/-1 wurde im Kontext des Haplotypen H1 sowie des Haplotypen H2 analog zur TATA-Box1 mutiert und die Konstrukte unter nicht-stimulatorischen sowie 8-Br-cAMP- [0,5 mM] und PMA- [10^{-8} M] stimulatorischen Bedingungen in EA.hy926 Zellen transfiziert. Das Einbringen einer Punktmutation in die TATA-Box2 führte im Kontext des Haplotypen H1 zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität, die jedoch nicht das Niveau des Wildtyp-Konstrukts p-948/-1H2 erreichte. Im Kontext des Haplotypen H2 resultierte aus der Punktmutation ein Einbruch der transkriptionellen Aktivität auf bzw. unter das Niveau des Haplotypen H1. ns: $p > 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

$p=0,4941$ für [PMA]). Im Kontext des Haplotypen H1 (p-948/-1H1 Mut TATA2) kam es hingegen zu einem Anstieg der transkriptionellen Aktivität, insbesondere unter 8-Br-cAMP- (Anstieg um 77,8%, $p=0,0018$) und PMA- (Anstieg um 60%, $p=0,0095$) stimulatorischen Bedingungen. Die Aktivität erreichte jedoch nicht die des Wildtyp-Konstrukts p-948/-1H2. Demzufolge scheinen zwei perfekte TATA-Boxen für eine ausreichende transkriptionelle Aktivität des p-948/-1 RhoA-Konstrukts notwendig zu sein.

4.5.3 Deletion der TATA-Boxen

Da die Veränderung der TATA-Box1 durch den -112T>C SNP die transkriptionelle Aktivität der RhoA- und TCTA-Promotordeletionskonstrukte signifikant reduzierte (siehe Abschnitt 4.5.1) und zudem eine analoge Veränderung der TATA-Box2 zum Einbruch der transkriptionellen Aktivität des RhoA p-948/-1 Konstrukts führte (siehe Abschnitt 4.5.2), wurde zur weiteren Überprüfung des Einflusses der TATA-Boxen im jeweils aktivsten RhoA- (p-948/-1) bzw. TCTA- (p-448/-1) Promotordeletionskonstrukt die TATA-Box1 und/oder 2 im Kontext des Haplotypen H1 sowie des Haplotypen H2 deletiert (Abbildung 4.5.3.a). Es erfolgte sowohl die Deletion der TATA-Box Core-Sequenz (TATAAA; Del), als auch die Deletion der Core-Sequenz mit umgebenden Nukleotiden (Del comp.).

	<u>TATA-Box2</u>	<u>TATA-Box1</u>
p-H1	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctggaccaacgat	<u>aaaacat</u> gagggcctcag
p-H2	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctggaccaacgat	<u>aaaatat</u> gagggcctcag
p-Del 1	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctggaccaacgat	-----gagggcctcag
p-Del 1 comp.	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctggaccaac	-----cctcag
p-Del 2 H1	ttgaggccccg-----ctggaccaacgat	<u>aaaacat</u> gagggcctcag
p-Del 2 H1 comp.	ttgaggc-----accaa	cgat <u>aaaacat</u> gagggcctcag
p-Del 2 H2	ttgaggccccg-----ctggaccaacgat	<u>aaaatat</u> gagggcctcag
p-Del 2 H2 comp.	ttgaggc-----accaa	cgat <u>aaaatat</u> gagggcctcag
p-Del 1/2	ttgaggccccg-----ctggaccaacgat	-----gagggcctcag
p-Del 1/2 comp.	ttgaggc-----accaa	-----cctcag

Abb. 4.5.3.a: Basengenaue Darstellung der TATA-Box-Deletionskonstrukte. Die Haplotypen H1 und H2 sind in ihrer natürlichen Sequenz dargestellt, darunter sind die jeweils veränderten TATA-Box-Deletionskonstrukte abgebildet. In dem RhoA-Konstrukt p-948/-1 und in dem TCTA-Konstrukt p-448/-1 wurde die Core-Sequenz der TATA-Box1 und/oder 2 (Del) sowie die TATA-Box1 und/oder 2 mit umgebenden Nukleotiden (Del comp.) deletiert. Die Bezeichnung der Vektoren und ihre Sequenz im Bereich der TATA-Boxen sind dargestellt. Grau markierte Nukleotide sind in den TCTA-Konstrukten nicht vorhanden.

Die TATA-Box-Deletionskonstrukte wurden unter nicht-stimulatorischen (w/o) sowie stimulatorischen (8-Br-cAMP [0,5 mM] und PMA [10^{-8} M]) Bedingungen in EA.hy926 Zellen transfiziert und die Aktivität der Luziferase nach 24 h bestimmt (Abbildung 4.5.3.b).

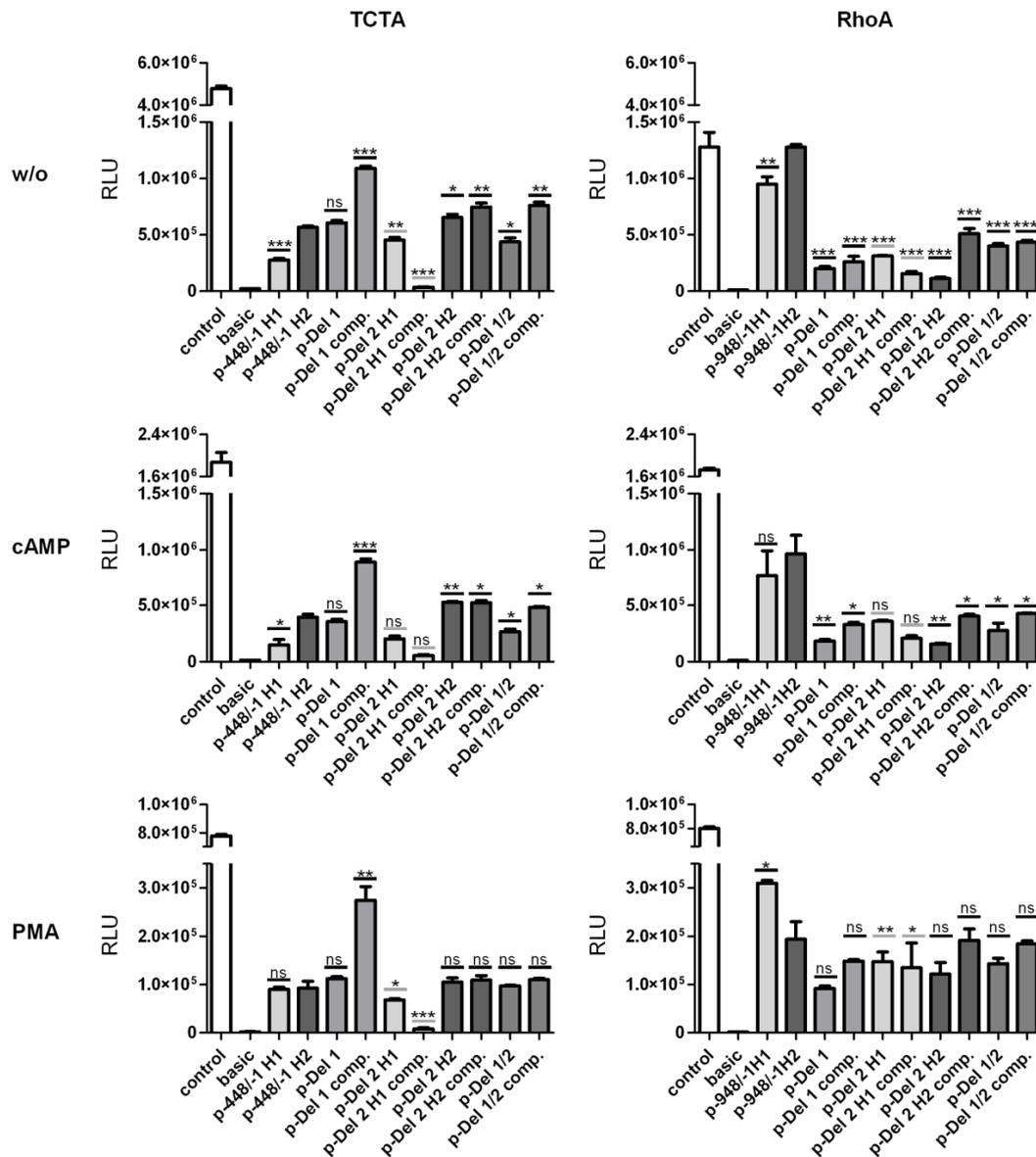


Abb. 4.5.3.b: Einfluss der TATA-Boxen auf die transkriptionelle Aktivität. RhoA- und TCTA-Konstrukte mit deletierter Core- (Del) sowie kompletter TATA-Box (Del comp.) 1 und/oder 2 wurden unter nicht-stimulatorischen sowie 8-Br-cAMP- [0,5 mM] und PMA- [10^{-8} M] stimulatorischen Bedingungen in EA.hy926 Zellen transfiziert. Die Deletion der Core- sowie der kompletten TATA-Box1 und/oder 2 resultierte bei den RhoA-Konstrukten in einem Einbruch der transkriptionellen Aktivität auf bzw. unter das Niveau des Haplotypen H1. Hingegen führte die Deletion der TATA-Boxen1 und/oder 2 bei den TCTA-Konstrukten zu keiner wesentlichen Änderung der transkriptionellen Aktivität. Ausnahme bildete die Deletion der kompletten TATA-Box1, die in einem Anstieg der transkriptionellen Aktivität resultierte sowie die Deletion der kompletten TATA-Box2 im Kontext des Haplotypen H1, die zu einem Einbruch der transkriptionellen Aktivität auf Basalniveau führte. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Die Deletion der (kompletten) TATA-Box1 (p-Del1 und p-Del1 comp., helles mittelgrau), oder der (kompletten) TATA-Box2 im Kontext des Haplotypen H1 (p-Del2 H1 und p-Del2 H1 comp., hellgrau) bzw. des Haplotypen H2 (p-Del2 H2 und p-Del2 H2 comp., dunkelgrau) resultierte bei den RhoA-Konstrukten unter allen getesteten Bedingungen in einem Einbruch der transkriptionellen Aktivität unter das Niveau des Haplotypen H1 (p-948/-1H1; Einbruch zwischen 60% - 91%, p-Wert zwischen $<0,0001$ - $0,0007$ [w/o]; 58% - 83,7%, p-Wert zwischen $0,0081$ – $0,1360$ [cAMP]; 1,3% - 52,6%, p-Wert zwischen $0,0015$ – $0,9599$ [PMA]). Dieser Effekt war zudem bei gleichzeitiger Deletion der TATA-Box1 und 2 zu beobachten (p-Del 1/2 [68,6%, $p<0,0001$ [w/o]; 71,4%, $p=0,0177$ [cAMP]; 26,1%, $p=0,2626$ [PMA]] und p-Del 1/2 comp. [65,8%, $p<0,0001$ [w/o]; 55,7%, $p=0,031$ [cAMP]; 4,7%, $p=0,8209$ [PMA]], dunkles mittelgrau). Dies bestätigt, dass für eine ausreichende transkriptionelle Aktivität des p-948/-1 RhoA-Konstrukts beide TATA-Boxen mit perfekter kanonischer Sequenz erforderlich sind.

Bei den TCTA-Konstrukten führte die Deletion der TATA-Boxen hingegen unter allen getesteten stimulatorischen Bedingungen zu keinen wesentlichen Veränderungen der transkriptionellen Aktivität. Eine Ausnahme bildete die Deletion der kompletten TATA-Box1 (p-Del1 comp., helles mittelgrau), die in einem signifikanten Anstieg der Aktivität (48%, $p<0,0001$ [w/o], 55,7%, $p=0,0002$ [cAMP] bzw. 66,3%, $p=0,0045$ [PMA]) resultierte sowie die Deletion der kompletten TATA-Box2 im Kontext des Haplotypen H1 (p-Del2 H1 comp.; hellgrau), die einen Einbruch der Aktivität (86,6%, $p<0,0001$ [w/o], 64%, $p=0,1181$ [cAMP] bzw. 91,1%, $p<0,0001$ [PMA]) bis auf Niveau des Leervektors pGL3-basic zur Folge hatte.

4.5.4 Veränderung des TATA-Box Spacings

Für eine ausreichende transkriptionelle Aktivität der RhoA-Konstrukte müssen beide TATA-Boxen in perfekter kanonischer Sequenz vorliegen (siehe Abschnitte 4.5.1 – 4.5.3). Sowohl eine Punktmutation in TATA-Box1 oder 2 als auch die Deletion einer der beiden TATA-Boxen bzw. beider TATA-Boxen resultierte in einer signifikant verminderten transkriptionellen Aktivität der RhoA-Konstrukte. Um zu überprüfen, ob die Distanz beider TATA-Boxen zueinander von Bedeutung ist, wurde durch Deletion von einem, 5 bzw. 9 Nukleotid(en) sowie durch Insertion von einem, 6 bzw. 11 Nukleotid(en) das Spacing der TATA-Boxen in dem RhoA-Konstrukt p-948/-1H2 sowie dem TCTA-Konstrukt p-448/-1H2 verändert. Die inserierten Nukleotide wurden so gewählt, dass sie Anteile der bereits zwischen den TATA-Boxen liegenden Sequenz bzw. eine „nonsense“ Sequenz darstellten (Abbildung 4.5.4.a).

	<u>TATA-Box2</u>	<u>TATA-Box1</u>
p-H1	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctggaccaacgat	<u>aaaacat</u> gagggcctcag
p-H2	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctggaccaacgat	<u>aaaatat</u> gagggcctcag
p-SpDel 1	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctggac-aacgat	<u>aaaatat</u> gagggcctcag
p-SpDel 2	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctgg-----cgat	<u>aaaatat</u> gagggcctcag
p-SpDel 3	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ct-----at	<u>aaaatat</u> gagggcctcag
p-Splns 1	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctggacc	caacgat <u>aaaatat</u> gagggcctcag
p-Splns 2	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctggacc	aacgacgaacgat <u>aaaatat</u> gagggcctcag
p-Splns 3	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctggacc	tggaccaacgaaacgat <u>aaaatat</u> gagggcctcag
p-Splns 3.1	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctggacc	tgtatctatgtaacgat <u>aaaatat</u> gagggcctcag
p-Splns 3.2	ttgaggccccg <u>atattttt</u> ctggacc	ttttttttttttaacgat <u>aaaatat</u> gagggcctcag

Abb. 4.5.4.a: Basengenaue Darstellung der Konstrukte im Bereich des veränderten TATA-Box Spacings. In dem RhoA-Konstrukt p-948/-1H2 sowie in dem TCTA-Konstrukt p-448/-1H2 wurde(n) ein (SpDel 1), 5 (SpDel 2) bzw. 9 (SpDel 3) Nukleotid(e) zwischen TATA-Box1 und 2 deletiert bzw. ein (Splns 1), 6 (Splns 2) bzw. 11 (Splns 3; Splns 3.1; Splns 3.2) Nukleotid(e) inseriert (dargestellt durch Striche bzw. rot markierte Nukleotide). Die Bezeichnung der Vektoren und ihre Sequenz im Bereich der TATA-Boxen sind dargestellt. Grau markierte Nukleotide sind in den TCTA-Konstrukten nicht vorhanden.

Die Konstrukte wurden unter nicht-stimulatorischen (w/o), 8-Br-cAMP- [0,5 mM] und PMA- [10⁻⁸ M] stimulatorischen Bedingungen in EA.hy926 Zellen transfiziert und die enzymatische Aktivität des exprimierten Reportergens nach 24 h bestimmt (Abbildung 4.5.4.b).

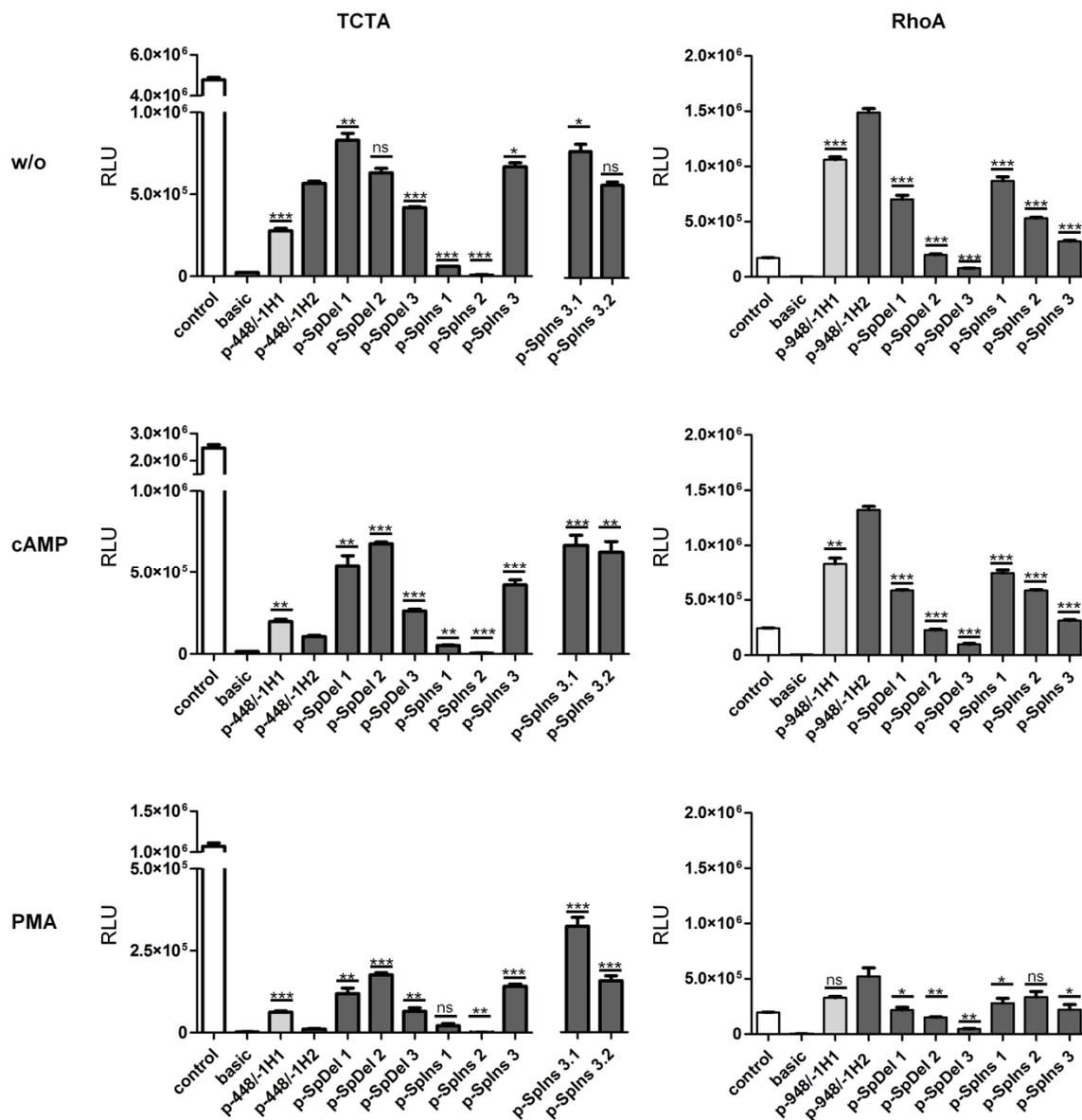


Abb. 4.5.4.b: Einfluss des TATA-Box Spacings auf die transkriptionelle Aktivität von RhoA- und TCTA-Konstrukten. RhoA- und TCTA-Konstrukte mit deletierten (SpDel) bzw. inserierten (SpIns) Nukleotiden zwischen TATA-Box1 und TATA-Box2 wurden unter nicht-stimulatorischen sowie 8-Br-cAMP- [0,5 mM] und PMA- [10⁻⁸ M] stimulatorischen Bedingungen in EA.hy926 Zellen transfiziert. Eine Deletion bzw. Insertion von Nukleotiden zwischen den TATA-Boxen resultierte bei den RhoA-Konstrukten in einer signifikanten Abnahme der transkriptionellen Aktivität proportional zur Anzahl der deletierten/inserierten Nukleotide. Eine Änderung der transkriptionellen Aktivität der TCTA-Konstrukte war abhängig von der Anzahl der inserierten bzw. deletierten Basen sowie dem stimulatorischen Regime. ns: p>0,05; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

Bereits die Deletion bzw. Insertion eines Nukleotids zwischen die TATA-Boxen des RhoA p-948/-1H2 Konstrukts (p-SpDel 1 bzw. p-Splns 1) resultierte unter allen stimulatorischen Bedingungen in einem Einbruch der transkriptionellen Aktivität unter das Niveau des Haplotypen H1 (p-948/-1H1; Einbruch um 52,8%, $p=0,0001$ [w/o], 55,8%, $p<0,0001$ [cAMP] und 58,4%, $p=0,0187$ [PMA] für Deletion einer Base bzw. 41,6%, $p=0,0003$ [w/o], 44%, $p=0,0002$ [cAMP] und 46,3%, $p=0,0496$ [PMA] für Insertion einer Base). Weitere Veränderungen des Abstands führten zu einer stärkeren Abnahme der Aktivität (Deletion von 5 bzw. Insertion von 6 Basen: 86,7% bzw. 64,3%, p -Wert jeweils $<0,001$ [w/o], 82,9% bzw. 55,7%, p -Wert jeweils $<0,0001$ [cAMP], 70,9%, $p=0,0081$ bzw. 35,9%, $p=0,1091$ [PMA]; Deletion von 9 bzw. Insertion von 11 Basen: 94,7% bzw. 78,3%, p -Wert jeweils $<0,0001$ [w/o], 92,7% bzw. 76,4%, p -Wert jeweils $<0,0001$ [cAMP], 91,1%, $p=0,0033$ bzw. 57,4%, $p=0,0271$ [PMA]), so dass ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Anzahl deletierter bzw. inserierter Nukleotide und einer Abnahme der transkriptionellen Aktivität zu beobachten war.

Hingegen veränderte sich die transkriptionelle Aktivität der TCTA-Konstrukte in Abhängigkeit der Art (Insertion/Deletion) und Anzahl der inserierten/deletierten Nukleotide. Unter allen getesteten Bedingungen führte die Insertion von einem bzw. 6 Nukleotid(en) (p-Splns 1 und p-Splns 2) zu einem Einbruch der transkriptionellen Aktivität (89,3% bzw. 98,7%, p -Wert jeweils $<0,001$ [w/o]) auf Niveau des Leervektors pGL3-basic. Die Insertion von 11 Nukleotiden (p-Splns 3) hingegen führte zu einem Anstieg der Aktivität (15,1%, $p=0,0196$ [w/o]). Dieser war sequenzunabhängig, da der Effekt sowohl nach Verdopplung der zwischen den TATA-Boxen liegenden Sequenz als auch nach Einbringen einer „nonsense“ Sequenz (p-Splns 3.1: 24,4%, $p=0,0111$ [w/o] bzw. p-Splns 3.2: 0,5%, $p=0,9158$ [w/o]) erfolgte.

Unter allen stimulatorischen Bedingungen konnte zudem eine signifikante Abnahme der transkriptionellen Aktivität durch Deletion von 9 Nukleotiden zwischen den TATA-Boxen beobachtet werden (p-SpDel 3: 26,3%, $p=0,0004$ [w/o]). Die Deletion nur eines Nukleotids resultierte unter nicht-stimulatorischen Bedingungen in einem signifikanten Anstieg der Aktivität (p-SpDel 1: 31,7%, $p=0,0039$ [w/o]), die Deletion von 5 Nukleotiden hingegen führte zu keiner wesentlichen Änderung (p-SpDel 2: Anstieg um 10,2%, $p=0,0907$ [w/o]). Diese Tendenz schien sich unter 8-Br-cAMP- und PMA-stimulatorischen Bedingungen umzukehren.

4.5.5 Tausch der TATA-Box flankierenden Bereiche

Die 10 Nukleotide direkt 5' der TATA-Box2 sowie direkt 3' der TATA-Box1 stellen zusammen eine (fast) perfekt palindromische Sequenz dar (Abbildung 4.5.5.a, fett gedruckte Sequenz). Zur Überprüfung, ob diese Sequenz die transkriptionelle Aktivität des RhoA-Konstrukts p-948/-1H2 beeinflusst wurden 8 (p-FT1 - p-FT6; blau und grün unterlegte Sequenz) bzw. 9 Nukleotide (p-FT7 - p-FT12; gelb und orange unterlegte Sequenz) dieser Sequenz in gleicher (p-FT1 und p-FT7) bzw. inverser (p-FT4 und p-FT10) Orientierung gegeneinander ausgetauscht. In einem zweiten Ansatz wurden die 8 bzw. 9 flankierenden Nukleotide der TATA-Box2 durch die 8

	TATA-Box2	TATA-Box1
p-948/-1 RhoA H1	cccttgaggccccgatatttctggaccaacgataaaa	catgagggcctcagtgag
p-948/-1 RhoA H2	cccttgaggccccgatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag
p-FT1	ccctgaggcctcagatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag
p-FT2	ccctgaggcctcagatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag
p-FT3	ccctgaggcctcagatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag
p-FT4	ccctgaggcctcagatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag
p-FT5	ccctgaggcctcagatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag
p-FT6	ccctgaggcctcagatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag
p-FT7	ccctgaggcctcagatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag
p-FT8	ccctgaggcctcagatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag
p-FT9	ccctgaggcctcagatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag
p-FT10	ccctgaggcctcagatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag
p-FT11	ccctgaggcctcagatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag
p-FT12	ccctgaggcctcagatatttctggaccaacgataaaa	atgagggcctcagtgag

Abb. 4.5.5.a: Basengenaue Darstellung der Konstrukte im Bereich der veränderten TATA-Box flankierenden Bereiche. Die Haplotypen H1 (hellgrau) und H2 (dunkelgrau) sind in ihrer natürlichen Sequenz abgebildet. Farblich dargestellt sind Gruppen von Vektoren, deren TATA-Box flankierende Bereiche verändert wurden. Zusammen bilden die 10 Nukleotide direkt 5' der TATA-Box2 (fett gedruckt) sowie direkt 3' der TATA-Box1 (fett gedruckt) eine (fast) perfekt palindromische Sequenz. In dem RhoA-Konstrukt p-948/-1H2 wurden 8 Nukleotide (p-FT1 - p-FT6; blau und grün unterlegte Sequenz) bzw. 9 Nukleotide (p-FT7 - p-FT12; gelb und orange unterlegte Sequenz) dieser Sequenz in gleicher (p-FT1 und p-FT7) bzw. inverser (p-FT4 und p-FT10) Orientierung gegeneinander ausgetauscht. Zudem wurden die 8 bzw. 9 flankierenden Nukleotide der TATA-Box2 durch die 8 bzw. 9 flankierenden Nukleotide der TATA-Box1 in gleicher (p-FT2; p-FT8) sowie inverser (p-FT5; p-FT11) Orientierung ersetzt und umgekehrt (p-FT3; p-FT9 bzw. p-FT6; p-FT12). Die Bezeichnung der verschiedenen Vektoren und ihre Sequenz im Bereich der TATA-Boxen sind dargestellt.

bzw. 9 Nukleotide der TATA-Box1 in gleicher (p-FT2; p-FT8) sowie inverser (p-FT5; p-FT11) Orientierung ersetzt und umgekehrt (p-FT3; p-FT9 bzw. p-FT6; p-FT12).

Die Konstrukte wurden unter nicht-stimulatorischen Bedingungen in EA.hy926 Zellen transfiziert und die Aktivität des Reportergens nach 24 h bestimmt (Abbildung 4.5.5.b).

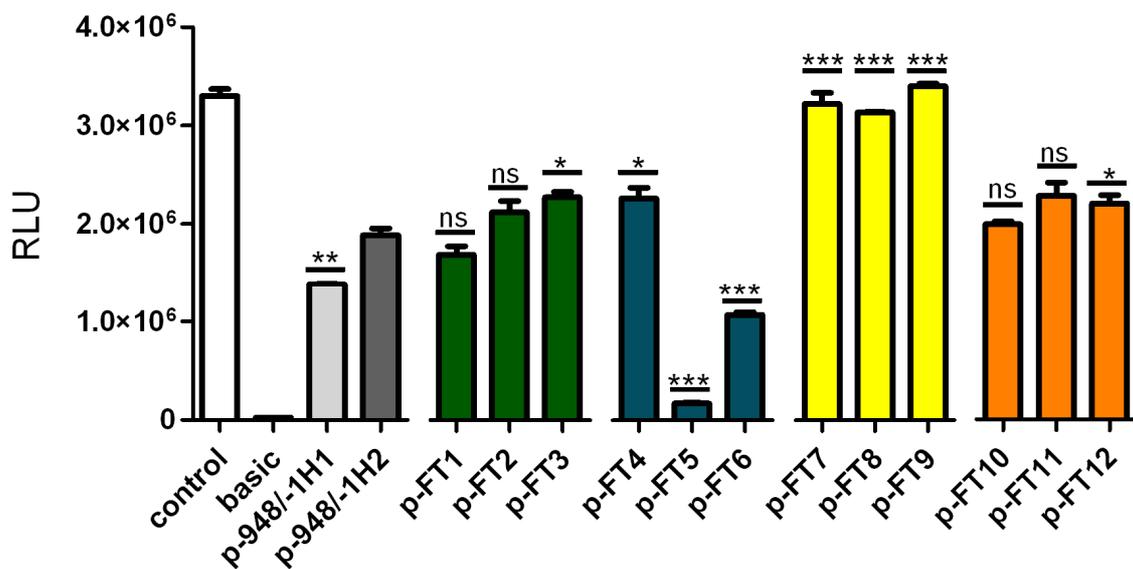


Abb. 4.5.5.b: Einfluss einer Veränderung der TATA-Box flankierenden Bereiche auf die transkriptionelle Aktivität von RhoA-Konstrukten. Die RhoA-Konstrukte mit veränderten TATA-Box flankierenden Bereichen wurden unter nicht-stimulatorischen Bedingungen in EA.hy926 Zellen transfiziert. Ein Austausch der 8 flankierenden Nukleotide der TATA-Boxen 1 und 2 führte zu keiner wesentlichen Änderung der transkriptionellen Aktivität (p-FT1). Erfolgte der Austausch in inverser Orientierung (p-FT4) bzw. wurden die 8 flankierenden Nukleotide der TATA-Box1 bzw. 2 durch die 8 flankierenden Nukleotide der TATA-Box2 bzw. 1 ersetzt (p-FT2 bzw. p-FT3), kam es zu einem tendenziellen Anstieg der transkriptionellen Aktivität. Das Ersetzen der 8 flankierenden Nukleotide in inverser Orientierung führte zu einem signifikanten Einbruch der transkriptionellen Aktivität (p-FT5 und p-FT6). Der Austausch der 9 flankierenden Nukleotide der TATA-Box1 bzw. 2 (p-FT7) sowie deren wechselseitiges Ersetzen (p-FT8 und p-FT9) resultierte in einem signifikanten Anstieg der transkriptionellen Aktivität. Erfolgte der Austausch (p-FT10) bzw. das Ersetzen (p-FT11 und p-FT12) der 9 flankierenden Nukleotide in inverser Orientierung, resultierte daraus keine wesentliche Änderung der transkriptionellen Aktivität. Die Farbe der Balken entspricht den in 4.5.5.a dargestellten Gruppen von Vektoren. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Der Austausch der 8 flankierenden Nukleotide der TATA-Box1 und 2 in gleicher Orientierung (p-FT1) sowie das Ersetzen der 8 flankierenden Nukleotide der TATA-Box2 durch die der TATA-Box1 (p-FT2) führte zu keiner wesentlichen Änderung der transkriptionellen Aktivität. Wurden hingegen die 8 flankierenden Nukleotide der TATA-Box1 durch die der TATA-Box2 ersetzt (p-FT3), bzw. erfolgte der Austausch dieser 8 flankierenden Nukleotide in inverser Orientierung (p-FT4), kam es zu einem signifikanten Anstieg der transkriptionellen Aktivität (17,5%, $p=0,0111$ bzw. 17,2%, $p=0,0399$). Die Aktivität brach jedoch fast vollständig ein, wenn die 8 Nukleotide der TATA-Box2 durch die der TATA-Box1 in inverser Orientierung (p-FT5; 91%, $p<0,0001$) ersetzt wurden. Auch die umgekehrte Orientierung (p-FT6) war mit einer Reduktion um 42,7% ($p=0,0004$) deutlich inaktiver als das Wiltyp-Konstrukt p-948/-1H2. Der Austausch der 9 flankierenden Nukleotide der TATA-Box1 und 2 in gleicher Orientierung (p-FT7) sowie deren wechselseitiges Ersetzen (p-FT8 und p-FT9) resultierte in einem signifikanten Anstieg der transkriptionellen Aktivität (41,8%, $p=0,0005$; 40,2%, $p<0,0001$ bzw. 44,9%, $p<0,0001$). Erfolgte dies jedoch in inverser Orientierung (p-FT10, p-FT11 und p-FT12), kam es zu keiner wesentlichen Änderung der transkriptionellen Aktivität.

Ein Tausch der TATA-Box flankierenden, (fast) perfekt palindromischen Sequenzen resultierte in keiner einheitlichen Veränderung der transkriptionellen Aktivität des RhoA p-948/-1H2-Konstrukts. Vielmehr waren die genaue Sequenz sowie die Art des Austausches (gleiche Orientierung/inverse Orientierung) von Bedeutung. Dies, zusammen mit den Ergebnissen der TATA-Box Mutationen (Abschnitt 4.5.2), Deletionen (Abschnitt 4.5.3) und den Veränderungen des TATA-Box Spacings (Abschnitt 4.5.4) lässt darauf schließen, dass eine genaue, unveränderte Sequenzabfolge des offensichtlich als gemeinsame Core-Promotorregion des divergenten Genpaares fungierenden Bereichs um die TATA-Boxen1 und 2 für die transkriptionelle Regulation, insbesondere des *RhoA*-Gens, jedoch auch des *TCTA*-Gens, erforderlich ist.

4.6 EMSA-Analysen

Zur Untersuchung von DNA-Protein-Interaktionen im Bereich des -112T>C SNPs wurden EMSA-Analysen mit unstimuliertem (w/o) sowie 8-Br-cAMP- [0,5 mM] und PMA- [10⁻⁸ M] stimuliertem EA.hy926-Kernextrakt durchgeführt. Als Sonden dienten 31bp-Oligomere, die das -112T- oder das -112C-Allel trugen (Abbildung 4.6.a). Die Kompetition erfolgte mit der unmarkierten, jeweils homologen Sonde in 200-fachem Überschuss.

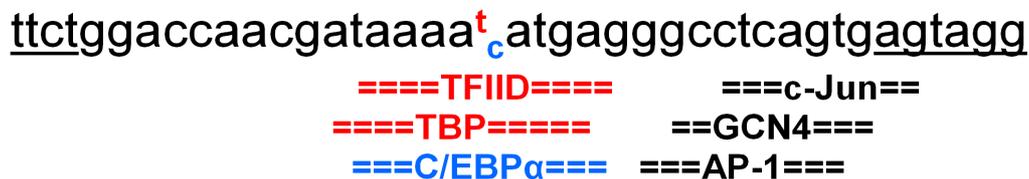


Abb. 4.6.a: Basengenaue Darstellung der in den EMSA-Analysen verwendeten 31bp-Oligomere. Für die Bandshift-Assays wurden synthetisch hergestellte 31bp-Oligomere verwendet, die das -112C- oder -112T-Allel trugen. Farblich gekennzeichnet sind putative Faktoren, die das T-Allel (rot) bzw. C-Allel (blau) binden. Schwarz markierte Faktoren sind allelunabhängig. Unterstrichene Nukleotide sind in der Sonde nicht vorhanden.

Mit nicht-stimuliertem sowie mit 8-Br-cAMP- und PMA-stimuliertem Kernextrakt trat eine spezifische, kompetierbare Bande für das T-Allel auf, die für das C-Allel deutlich schwächer ausfiel (Abbildung 4.6.b; Pfeil). Dieses Bandenmuster war unter nicht-stimulatorischen Bedingungen deutlich stärker, konnte jedoch auch unter 8-Br-cAMP- und PMA-Stimulation beobachtet werden.

Eine weitere, schneller migrierende, T-Allel spezifische Bande war unter nicht-stimulatorischen sowie 8-Br-cAMP-stimulatorischen Bedingungen zu erkennen (Sternchen). Jedoch fiel diese ebenfalls unter 8-Br-cAMP-Stimulation deutlich schwächer aus.

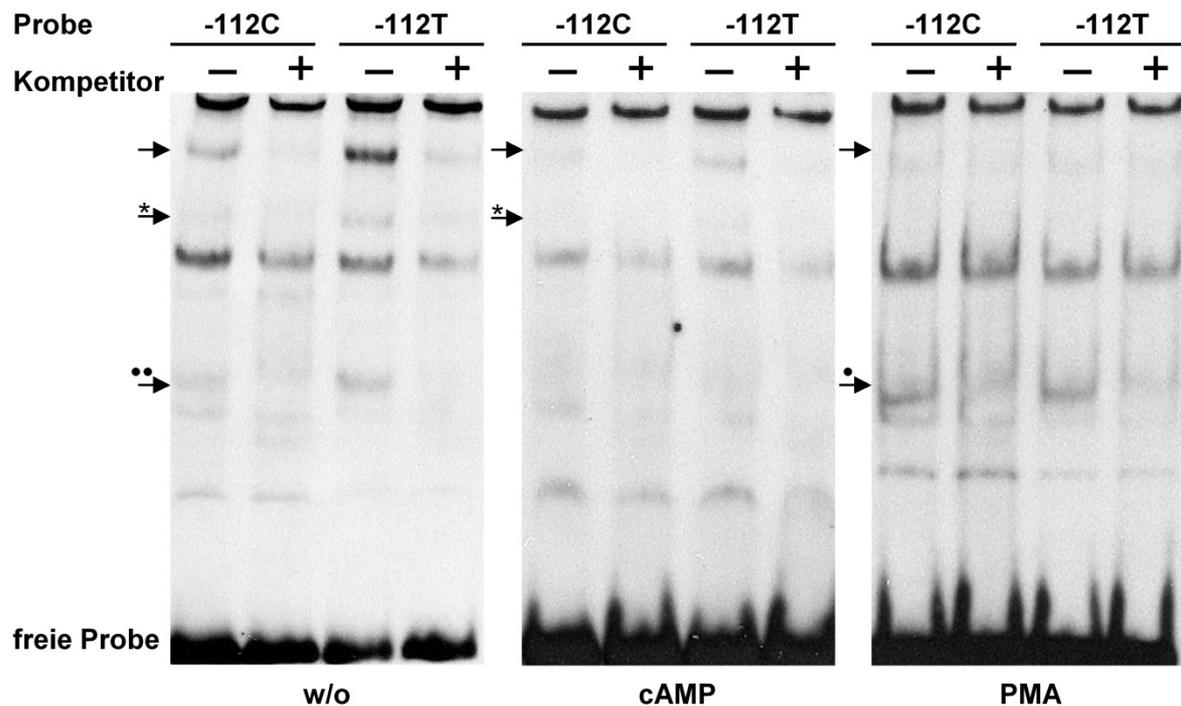


Abb. 4.6.b: Differentielles Bindungsmuster des -112C- und -112T-Allels in EMSA-Analysen. Für die EMSA-Analysen wurde 5 µg Kernextrakt von nicht-stimulierten sowie 8-Br-cAMP- [0,5 mM] und PMA- [10⁻⁸ M] stimulierten EA.hy926 Zellen eingesetzt. Die Konkurrenz (+) erfolgte mit 200-fachem Überschuss an unmarkierter Sonde. Das T-Allel zeigte unter allen stimulatorischen Bedingungen ein spezifisches Bindungsmuster, welches für das C-Allel deutlich schwächer ausfiel.

Zudem konnte eine kompetierbare Bindung mit nicht-stimuliertem sowie PMA-stimuliertem Kernextrakt beobachtet werden. Unter PMA-Stimulation zeigte sich diese Bindung für beide Allele gleich stark ausgeprägt (ein Punkt), unter nicht-stimulatorischen Bedingungen fiel sie hingegen für das C-Allel deutlich schwächer aus (zwei Punkte).

4.7 Methylierungsstatus

In genregulatorischen Regionen sind häufig sogenannte CpG-Inseln lokalisiert, die durch unterschiedliche Methylierungsgrade Einfluss auf die transkriptionelle Kontrolle nehmen. Sie stellen DNA-Regionen von ≥ 200 bp mit einem GC-Anteil von $> 50\%$ und einem Verhältnis von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden von ≥ 0.6 dar (Kim et al., 2009). Durch das Programm „EMBOSS CpGPlot“ (<http://www.ebi.ac.uk/tools/emboss/cpgplot/index.html>) wurden sowohl in der 5'-flankierenden Region des *RhoA*- als auch des *TCTA*-Gens CpG-Inseln vorhergesagt (Abbildung 4.7.a). Um ihren Methylierungsstatus zu prüfen, wurde die genomische DNA von vier Probanden einer Bisulfit-Konvertierung unterzogen und anschließend in eine PCR mit Primern gegen nicht-methylierte (nm) und methylierte (m) Sequenzen der CpG-Inseln eingesetzt (Abbildung 4.7.b).

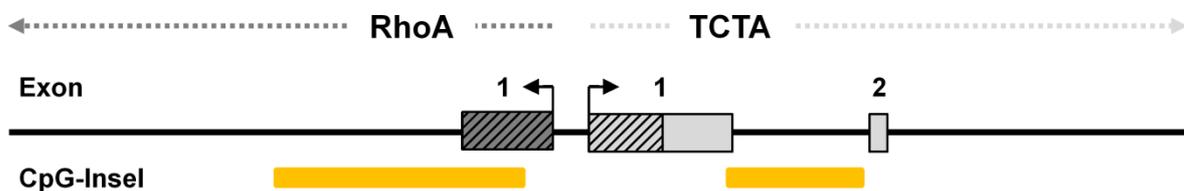


Abb. 4.7.a: Schematische Darstellung der Lage der CpG-Inseln. Mit Hilfe des netzbasierten Programms „EMBOSS CpGPlot“ wurden putative CpG-Inseln in der 5'-regulatorischen Region des *RhoA*- und *TCTA*-Gens vorhergesagt. Die *RhoA* 5'-UTR (dunkelgrau schraffiertes Kästchen), die *TCTA* 5'-UTR (hellgrau schraffiertes Kästchen), kodierendes Exon (hellgraues Kästchen) sowie Transkriptionsstartstellen (rechtswinkliger und linkswinkliger Pfeil) sind gekennzeichnet. Die Lage der putativen CpG-Inseln ist durch gelbe Striche markiert.

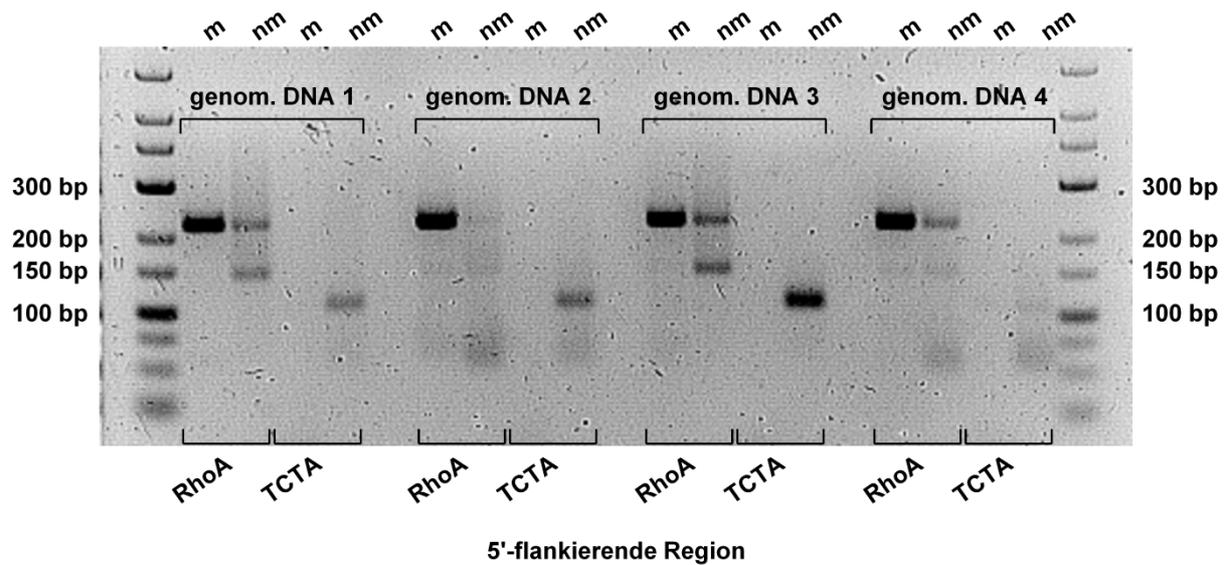


Abb. 4.7.b: Die CpG-Inseln der 5'-flankierenden Region des *RhoA*- und *TCTA*-Gens sind differenziell methyliert. Bisulfitkonvertierte genomische DNA von vier Probanden wurde durch PCR mit Primern gegen die nicht-methylierte (nm) und methylierte (m) Sequenz der CpG-Inseln analysiert. Die CpG-Insel der 5'-flankierenden Region des *RhoA*-Gens lag methyliert vor, die CpG-Insel der *TCTA* 5'-regulatorischen Region war nicht-methyliert.

Bei allen vier Probanden (unserer Laborgruppe) konnte durch die PCR eine deutliche Bande von 216 bp, die einer methylierten CpG-Insel in der 5'-flankierenden Region des *RhoA*-Gens entsprach, sowie bei den Probanden 1, 2 und 3 eine Bande von 106 bp, die eine nicht-methylierte CpG-Insel in der 5'-flankierenden Region des *TCTA*-Gens widerspiegelte, amplifiziert werden. Zudem war eine Bande in Höhe von 216 bp, die einer nicht-methylierten CpG-Insel der *RhoA* 5'-flankierenden Region entsprach sowie eine weitere unspezifische Bande in Höhe von 150 bp zu erkennen. Dies lässt auf eine differenzielle Methylierung der CpG-Inseln in der *RhoA* und *TCTA* 5'-regulatorischen Region schließen.

5. Diskussion

Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zur Genstruktur oder zur transkriptionellen Kontrolle des humanen *RhoA*, obwohl es zu den physiologisch best untersuchten kleinen GTPasen gehört. In neueren Studien konnte eine stimulationsabhängige *RhoA*-Expression mit IL-4 bzw. IL-13 sowie TNF- α in humanen bronchialen glatten Muskelzellen gezeigt werden. Als verantwortlich für die transkriptionelle Aktivierung von *RhoA* wurde eine STAT6 sowie eine NF- κ B Bindestelle im proximalen Promotorbereich (Position -78 bp - -70 bp bzw. -84 bp - -74 bp bezogen auf die TSS1 des *RhoA*-Gens) identifiziert (Goto et al., 2010; ¹Chiba et al., 2010). Auch erfolgte in jüngerer Zeit eine Charakterisierung des Ratten *RhoA*-Promotors (²Chiba et al., 2010). Eine genaue Beschreibung des humanen *RhoA*-Promotors sowie eine Darstellung der divergente Anordnung von *RhoA* und *TCTA* wurde in der Literatur jedoch bisher nicht beschrieben, auch ist die transkriptionelle Regulation von *TCTA* bislang gänzlich unbekannt (Stand: 7. Okt. 2010). In dieser Arbeit wurden daher jeweils 1600 bp der 5'-flankierenden Region des *RhoA*- und *TCTA*-Gens auf genetische Varianten untersucht und regulatorisch aktive Bereiche der beiden Gene mit Hilfe von Promotordeletionskonstrukten eingegrenzt. Der Einfluss des SNPs -112T>C [rs940045] sowie zweier TATA-Boxen in der gemeinsam genutzten Promotorregion zwischen den Transkriptionsstartstellen (TSS) des *RhoA*- und *TCTA*-Gens auf die transkriptionelle Kontrolle wurde durch Reporterassays und EMSA-Untersuchungen analysiert.

5.1 *RhoA* und *TCTA* bilden ein divergentes Genpaar

RhoA- und *TCTA* sind auf Chromosom 3p21 in einer divergenten Orientierung angeordnet. Die TSS des auf dem (-)-Strang des Chromosoms lokalisierten *RhoA*-Gens ist durch 112 bp von der TSS des auf dem (+)-Strang gelegenen *TCTA*-Gens getrennt (siehe Abbildung 4.1). Eine solche divergente Anordnung von Genen stellt eine spezielle Form alternativer Promotoren dar.

Die Untersuchung der intergenischen Distanz der Chromosomen 20, 21 und 22 durch Takai und Jones zeigte, dass etwa die Hälfte der Gene in einer

„head-to-head“-Situation angeordnet und somit divergent orientiert, die andere Hälfte hingegen im Tandem auf dem selben DNA-Strang lokalisiert ist. Jedoch besitzen mehr divergent angeordnete Gene eine Distanz ≤ 1 kb zwischen ihren TSS, als es der Zufall erwarten ließe. Dabei beträgt die durchschnittliche Länge der gemeinsam genutzten Promotorregion dieser in sehr enger Nachbarschaft liegenden Gruppe „head-to-head“ orientierter Gene 300 bp (Takai und Jones, 2004).

Etwa 11% von 23.752 untersuchten humanen Genen gehören der divergenten Gengruppe mit ≤ 1 kb zwischen ihren TSS an. Von diesen 11% weisen 23% überlappende Transkripte auf, während die Transkripte von 77% der divergenten Paare nicht überlappen. Von letzteren sind wiederum bei 67% die TSS durch weniger als 300 bp getrennt (Trinklein et al., 2004).

Eine solch enge, divergente Anordnung tritt bei einigen funktionellen Gengruppen gehäuft auf. So sind DNA-Reparaturgene 5-fach, Gene für Chaperon-Proteine fast 3-fach und mitochondriale Gene mehr als 2-fach in der Gruppe der „head-to-head“ orientierten Gene überrepräsentiert. Auch eine Klasse der DEAD-Box RNA-Helicasen ist mit einer 2-fachen Überrepräsentation besonders häufig divergent angeordnet (Trinklein et al., 2004). Dabei ist die divergente Anordnung unabhängig von der Gendichte des Genoms bzw. bestimmter Chromosomen(abschnitte). Adachi und Lieber zeigten, dass auf Chromosom 21 etwa 22% der Gene divergent orientiert sind, auf Chromosom 22 weisen 18% eine „head-to-head“ Orientierung auf. Dabei stellt Chromosom 21 ein Chromosom mit geringer Gendichte dar, Chromosom 22 hingegen ist eines der genreichsten Chromosomen (Adachi und Lieber, 2002).

Eine charakteristische, strukturelle Besonderheit einer divergenten Genkonstellation ist der erhöhte GC-Gehalt der von beiden Genen eingerahmten, bidirektionalen Promotorregion. Er liegt bei etwa 66% im Vergleich zu 57% bei unidirektionalen Promotoren (Trinklein et al., 2004). In Abhängigkeit davon, ob annotierte Gene oder transkriptionelle Einheiten als Referenz genutzt wurden, besitzen zwischen 77% und 94% der bidirektionalen Promotoren klassische CpG-Inseln, während der Anteil der unidirektionalen Promotoren mit CpG-Inseln hingegen lediglich zwischen 38% und 60% liegt. Zudem sind die CpG-Inseln divergenter Gene signifikant länger (Kalitsis und Saffery, 2009). Dieses überdurchschnittlich häufige Auftreten von CpG-Inseln hat möglicherweise selbst zur Bildung divergenter Genpaare beigetragen: so vermuten Kalitsis und Saffery, dass die durch CpG-Inseln aufgelockerte Chromatinstruktur und der dadurch verursachte konstitutiv transkriptionelle Status die Insertion

transposabler Elemente begünstigt und diese vor einem Gen-Silencing durch Methylierungsereignisse schützt (Kalitsis und Saffery, 2009). Auch in der 5'-regulatorischen Region des *RhoA*- und *TCTA*-Gens sind CpG-Inseln lokalisiert (siehe Abbildung 4.7.a). Folglich kann die Entstehung dieses divergenten Genpaares prinzipiell auf den von Kalitsis und Saffery vermuteten Mechanismus zurückzuführen sein. Dies wäre jedoch ein evolutionär altes Ereignis, da die genomische Organisation von *RhoA* und *TCTA* bis zum Opossum (*Monodelphis domestica*) konserviert ist und somit vor der Eutheria-Metatheria-Trennung und der Entstehung der Didelphidae vollzogen worden sein muss (ermittelt mit Hilfe des „ECR browsers“ [<http://ecrbrowser.dcode.org/>]; Ergebnis siehe Anhang 8.2).

Ob die CpG-Inseln in der *RhoA* bzw. *TCTA* 5'-regulatorischen Region Einfluss auf die transkriptionelle Kontrolle der Gene nehmen, konnte mit Hilfe der klassischen Reporteranalysen nicht überprüft werden, da sich der differentielle Methylierungsstatus der zu verwendenden Reportervektoren methodisch nicht gewährleisten lässt. Jedoch zeigten methylierungsspezifische PCR-Analysen mit genomischer DNA von vier verschiedenen Probanden, dass *in vivo* die CpG-Insel des *RhoA*-Gens methyliert, die des *TCTA*-Gens nicht-methyliert vorlagen (siehe Abbildung 4.7.b).

5.2 *RhoA* und *TCTA* besitzen multiple Transkriptionsstartstellen

Yang und Elnitski konnten mit Hilfe von „Cap Analysis of Gene Expression“ (CAGE)-Untersuchungen zeigen, dass divergent angeordnete Gene, neben wenigen seltener genutzten TSS, in der Regel eine Haupt-TSS aufweisen (Yang und Elnitski, 2007). Damit zählen sie nicht zu den klassischen CpG-Insel Promotoren, die durch einen relativ großen Bereich mit multiplen Initiationsstellen für die Transkription charakterisiert sind (Sandelin et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnten durch 5'-RACE Analysen sowohl für *RhoA* als auch für *TCTA* je vier diskrete TSS identifiziert werden, die - mit Ausnahme je einer TSS - gleichmäßig genutzt zu werden scheinen (siehe Abbildung 4.3.a und 4.3.b). Somit erfüllen sie weder das Charakteristikum klassischer CpG-Insel Promotoren mit multiplen TSS, noch die von Yang und Elnitski postulierten Kennzeichen divergent

angeordneter Gene. Obwohl in der gemeinsam genutzten Promotorregion zwischen dem *RhoA*- und *TCTA*-Gen zwei TATA-Box-Motive lokalisiert sind, zeigten beide Gene zudem keine klassischen TATA-Box Promotoreigenschaften mit lediglich einer einzigen, diskreten TSS.

Die TSS für *RhoA* und *TCTA* liegen in einem Bereich von ca. 200 bp und führen zur Bildung unterschiedlich langer 5'-untranslatierter Regionen. Somit wird durch Nutzung der verschiedenen TSS die *RhoA*- und *TCTA*-Proteinsequenz nicht beeinflusst. Vielmehr entstehen verschiedene Transkriptisoformen mit möglicherweise veränderter Transkriptstabilität und damit denkbaren stöchiometrischen Konsequenzen für das Genprodukt aufgrund einer veränderten Translationseffizienz.

5.3 *RhoA* und *TCTA* sind positiv coreguliert

RhoA- und *TCTA*-Transkripte wurden in der Endothelzelllinie EA.hy926 (siehe Abbildung 4.2) sowie in weiteren Zelllinien (SaOs-2, THP-1, HL60, MCF-7; Ergebnisse siehe Anhang 8.3) unter nicht-stimulatorischen und 8-Br-cAMP- bzw. PMA-stimulatorischen Bedingungen parallel/synchron exprimiert. Schon 1995 beschrieb Ridley die durch Northern-Blot Analysen in vielen Geweben und Zelltypen nachgewiesene Expression der kleinen GTPase *RhoA* (Ridley, 1997). Ebenfalls mit Hilfe von Northern-Blot Analysen wurde 1995 durch Aplan et al. die ubiquitäre Expression von *TCTA*-mRNA gezeigt, wobei die höchsten Expressionslevel in der Niere beobachtet werden konnten (Aplan et al., 1995). Demzufolge werden die divergent angeordneten Gene *RhoA* und *TCTA* in zahlreichen Geweben und Zelllinien parallel transkribiert, obwohl zu vermuten wäre, dass durch den Vorgang der Transkription und somit der lokalen Öffnung des DNA-Doppelstrangs die Transkriptionsfaktoren (TF) des jeweils anderen Gens verdrängt werden.

Durch Nutzung von 18 unabhängigen Microarray Datensätzen der „Stanford Microarray Database“ konnten Trinklein et al. zeigen, dass divergent angeordnete Genpaare häufiger positiv korreliert sind als zufällig gewählte Genpaare. Zudem sind sie stärker korreliert als auf andere Weise benachbarte Gene, obwohl von humanen Genen der selben Region des Genoms gezeigt werden konnte, dass sie häufig

coexprimiert werden (Caron et al., 2001). Die Länge der von den divergent angeordneten Genen gemeinsam genutzten Promotorregion nimmt keinen Einfluss auf den Grad der parallelen/synchronen Expression (Trinklein et al., 2004).

Von den coregulierten divergenten Genpaaren zeigen lediglich 11% eine negative Coregulation, in dessen Folge die Transkription des einen Gens die des anderen Gens inhibiert (Trinklein et al., 2004). Dies liegt vermutlich in der häufigen inhärenten Bidirektionalität der von zwei „head-to-head“ orientierten Genen gemeinsam genutzten Promotorregion begründet (Kalitsis und Saffery, 2009). Trinklein et al. konnten durch Luziferaseassays mit seriell trunkierten bidirektionalen Promotoren in einem von neun Fällen die inhärente Bidirektionalität auf einen Bereich von nur 30 bp eingrenzen (Trinklein et al., 2004). Dabei scheint insbesondere eine GABPA (GA-binding protein alpha chain)-Bindestelle in diesen 30 bp für die bidirektionale Promotoraktivität essentiell (Lin et al., 2007). Da eine veränderte Chromatinstruktur eine gerichtete Transkription aufheben kann (Whitehouse et al., 2007) und der RNA-Polymerase II so eine Transkription in beide Richtungen des DNA-Strangs ermöglicht, könnte die inhärente Bidirektionalität vieler bidirektionaler Promotoren in der durch die CpG-Inseln verursachten offenen Chromatinstruktur begründet liegen. Auch der von den Genen *RhoA* und *TCTA* eingeschlossene Promotorbereich wies eine inhärente Bidirektionalität auf. Dies wird durch die Ergebnisse der Transkriptionsassays, insbesondere die transkriptionelle Aktivität des *RhoA*-Konstrukts p-100/-1H1 in sense und reverser Orientierung (Abbildung 4.5.1.c) klar belegt. Die gemeinsam genutzte Promotorregion ist jedoch so klein, dass sie vermutlich lediglich der Assemblierung des Initiationskomplexes dienen kann. Folglich wird durch sie nur eine basale Transkriptionsaktivität erreicht. Während die Transkription des *TCTA*-Gens offensichtlich durch diese basale Aktivität reguliert wird und weiter distal gelegene regulatorische Regionen bis zur Position -1372 nicht zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität beitragen, scheinen aktivierende Elemente in distalen Bereichen der 5'-regulatorischen Region des *RhoA*-Gens mit der basalen Transkriptionsmaschinerie des Core-Promotors zu interagieren und so die Transkription zu stimulieren (Abbildung 4.5.1.b).

5.4 Einfluss genetischer Varianten auf transkriptionelle Ereignisse

Transkriptionsfaktoren besitzen ähnlich wie Restriktionsendonukleasen spezifische, jedoch weniger sequenzkonservative DNA-Erkennungsmotive. Dabei entspricht die Bindungssequenz einer elektrostatischen und räumlichen Oberfläche, in der, anders als bei Restriktionsschnittstellen, jede Base der Consensus-Sequenz eine individuelle Bedeutung für die Bindungsaffinität des TF besitzt. Während manche Position konstitutiv ist und eine Abweichung an dieser Stelle zum Verlust der Bindungsfähigkeit führt, erlauben andere Positionen im Kontext der Gesamtbindungsstelle und der proteomischen Umgebung für einen distinkten Bindungspartner Basenaustausche, u. a. zwischen Purin- und Pyrimidinbasen. Je nach Position hat mitunter der Austausch eines Nukleotids durch das Auftreten eines SNPs, oder auch mehrerer Basen durch das Auftreten anderer Polymorphismen, folglich keinen Einfluss auf die TF-Bindung bzw. modifiziert vornehmlich die Bindungsaffinität, während der Austausch einer anderen Base die elektrostatische Umgebung in der Form verändert, dass sie durch den TF nicht mehr erkannt werden kann. So können TF, anders als Restriktionsenzyme, mit zahlreichen, der Consensus-Sequenz ähnlichen Regionen interagieren.

Die Bindung und Funktionalität eines TF beruht nicht ausschließlich auf dem Vorhandensein einer geeigneten Bindungsstelle. TF fungieren als Module aus mindestens zwei Partnern, die sowohl synergistisch als auch antagonistisch interagieren können (Abbildung 5.1).

Eine synergistische, kooperative Interaktion zweier TF erfordert hierbei das Vorhandensein beider Modulpartner für eine transkriptionelle Antwort. Dabei können kooperativ agierende TF gleichberechtigte Partner darstellen, die mitunter durch Biegung der DNA über große Distanzen miteinander wechselwirken, jedoch kann auch einer der Faktoren für die Rekrutierung seines kooperativen Partners erforderlich sein.

Antagonistisch, kompetitiv wirkende TF hingegen konkurrieren um dieselbe bzw. räumlich eng benachbarte Bindungsstellen, so dass in diesem Fall die transkriptionelle Antwort u. a. vom quantitativen Verhältnis der konkurrierenden Faktoren abhängig ist.

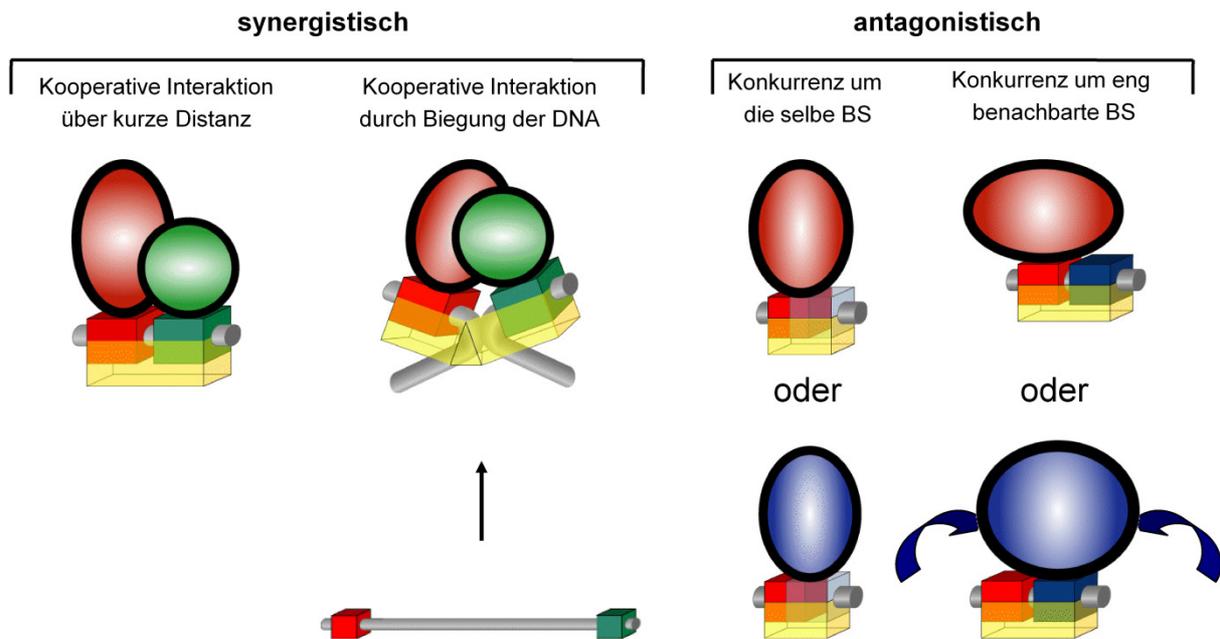


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der synergistischen und antagonistischen Wirkungsweise von Transkriptionsfaktor (TF)-Modulen. Synergistisch, kooperativ agierende TF können sowohl über große Distanz durch Biegung der zwischen ihnen liegenden DNA, als auch über kurze Distanz miteinander wechselwirken. Hierbei sind beide Modulpartner für eine transkriptionelle Antwort erforderlich. Antagonistisch, kompetitiv wirkende TF konkurrieren um dieselbe oder räumlich eng benachbarte Bindungsstellen (BS). [Abbildung verändert nach "MatInspector: Too Many Matches"; Genomatix-Homepage].

Demzufolge hängt der Einfluss eines TF auf die transkriptionelle Aktivität des durch ihn beeinflussten Gens neben dem Vorhandensein einer physikalischen Bindungsstelle u. a. von der Bioverfügbarkeit aller TF eines Moduls, der kooperativen bzw. kompetitiven Protein-Protein-Interaktion dieser Faktoren, der Interaktion mit Co-Faktoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie sowie von sekundären Aktivierungen in Form von beispielsweise Phosphorylierungen ab. Folglich ist die Bindungsfähigkeit und somit die Aktivität eines TF von seiner genomischen und proteomischen Umgebung bestimmt.

Eine Transkriptionsfaktorbindestelle (TFBS) kann durch einen SNP so verändert werden, dass die Bindungsaffinität eines TF beeinflusst bzw. die Bindung des Faktors verhindert wird. In der Folge kann sich die Zusammensetzung eines TF-Moduls abwandeln und die transkriptionelle Aktivität eines Gens verändert werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit für den -112T>C Polymorphismus [rs940045] untersucht.

5.5 Die TATA-Box Variante -112T>C beeinflusst die transkriptionelle Aktivität von *RhoA* und *TCTA*

Um den Einfluss eines Einzelbasenaustausches funktionell zu bestimmen, muss zunächst überprüft werden, in welchem Promotorbereich die natürliche Konfiguration ausreichende transkriptionelle Aktivität besitzt. Durch serielle Deletionskonstrukte lassen sich überdies *cis*-regulatorische Regionen detektieren.

Daher wurden zur Identifizierung ausreichend transkriptionell aktiver Regionen für die Untersuchung sowohl der genetischen Variante -112T>C als auch des von *RhoA* und *TCTA* gemeinsam genutzten bidirektionalen Promotorbereichs Promotordeletionskonstrukte sowohl der *RhoA* als auch der *TCTA* 5'-flankierenden Region hergestellt. Die längsten Konstrukte reichten 1372 bp in die 5'-flankierende Region der jeweiligen Gene (siehe Abbildung 4.5.1.a)

Für das *RhoA*-Gen zeigten 1372 bp der 5'-regulatorischen Region, die sowohl die Sequenz des ersten und zweiten Exons des *TCTA*-Gens, als auch das gesamte Intron 1 sowie einen Teil des Introns 2 von *TCTA* beinhalteten (Abbildung 5.2), eine ausreichende transkriptionelle Aktivität in EA.hy926 Zellen (siehe Abbildung 4.5.1.b). Durch Trunkierung von 424 bp (Bildung des Konstrukts p-948/-1) und somit der Deletion des Exon 2 sowie des Intron 2-Bereichs von *TCTA*, stieg diese Aktivität tendenziell an. Eine weitere Trunkierung um 458 bp (Bildung des Konstrukts p-490/-1) und der damit verbundene Verlust der Intron 1-Sequenz des *TCTA* führte

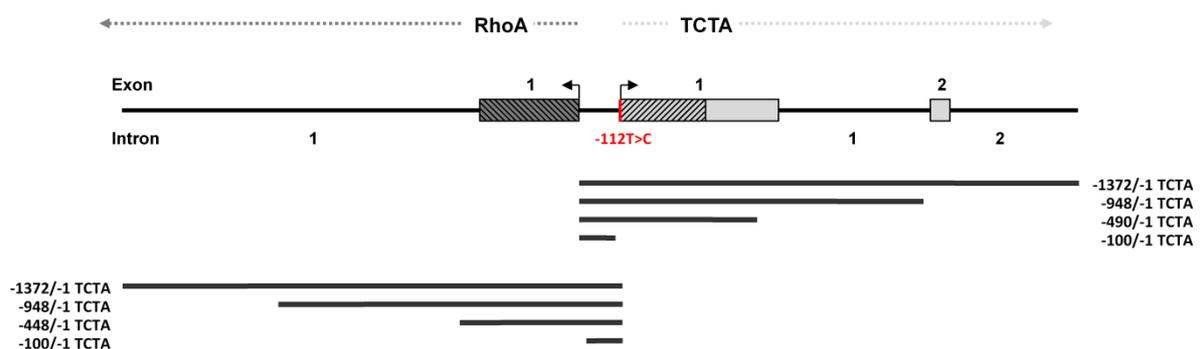


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der Lage der *RhoA*- und *TCTA*-Promotordeletionskonstrukte relative zu Intron- und Exonbereichen. Das durch den (-)-Strang des Chromosoms 3p21 kodierte *RhoA*-Gen ist grau, das durch den (+)-Strang kodierte *TCTA*-Gen hellgrau dargestellt. Kästchen kennzeichnen Exons, Linien Introns. Schraffierte Kästchen stellen die 5'-UTR dar. Abgewinkelte Pfeile markieren die *RhoA*- bzw. *TCTA*-Transkriptionsstartstelle. Die relative Lage der Promotordeletionskonstrukte ist unterhalb der schematischen Darstellung des *RhoA*-*TCTA*-Genbereichs abgebildet.

zu einem signifikanten Einbruch der transkriptionellen Aktivität. Folglich ist in dem deletierten Bereich-948/-490, der das gesamte Intron 1 sowie die letzten 58 bp des Exon 1 von *TCTA* trug, ein konstitutives, aktivierendes Element zu vermuten.

Die längsten *TCTA*-Konstrukte (p-1372/-1; p-948/-1) hingegen waren transkriptionell völlig inaktiv (siehe Abbildung 4.5.1.b). Sie trugen das gesamte erste Exon von *RhoA* sowie 988 bp bzw. 605 bp des insgesamt über 36 kb großen ersten *RhoA*-Introns. Erst die Trunkierung des p-948/-1-Konstrukts um 500 bp (Bildung des Konstrukts p-448/-1) und somit die Reduzierung der *RhoA*-Intronsequenz auf 63 bp führte zu einem Anstieg der transkriptionellen Aktivität. Dies lässt auf den Wegfall eines in der deletierten, intronischen *RhoA*-Sequenz lokalisierten, reprimierenden Elements schließen. Eine weitere Deletion um 348 bp führte zu keiner Änderung der Aktivität. Das so gebildete Konstrukt p-100/-1 enthielt ausschließlich einen Großteil der von *RhoA* und *TCTA* gemeinsam genutzten Promotorregion, jedoch weder Exon- noch Intronsequenzen des *RhoA*-Gens. Demzufolge ist die von *RhoA* und *TCTA* gemeinsam genutzte Promotorregion für die Regulation des *TCTA*-Gens offensichtlich ausreichend und wird zudem von dem Exon 1 Bereich des *RhoA* nicht behindert. Die repressive, *cis*-regulatorische Region liegt demnach im intronischen Bereich des *RhoA*-Gens vor.

Da die für die Regulation des *TCTA*-Gens ausreichende, von beiden Genen des divergenten Paares gemeinsam genutzte Promotorregion mit 112 bp vermutlich nicht wesentlich größer ist als der Core-Promotor, stellt die hier gemessene Aktivität mutmaßlich lediglich die basale Promotoraktivität dar. Es ist denkbar, dass weiter distal gelegene Bereiche jenseits der untersuchten 1372 bp aktivierende Elemente tragen und somit zu einer Regulierung und Steigerung der transkriptionellen Aktivität beitragen sowie eine gewebs- und differenzierungsspezifische Kontrolle vermitteln. Für die Analyse des von beiden Genen eingerahmten bidirektionalen Promotorbereichs und des doppelten TATA-Box Systems reichen die hier ermittelten transkriptionell aktiven Regionen jedoch aus.

Der -112T>C Polymorphismus nimmt Einfluss auf die Nutzung der oben charakterisierten Promotorkonstrukte, da die Einführung des -112C-Allels bei nahezu allen *RhoA*- und *TCTA*-Deletionskonstrukten zu einem signifikanten Einbruch der transkriptionellen Aktivität führte. Der SNP -112T>C liegt in einer der TATA-Boxen, die in der von beiden Genen gemeinsam genutzten Promotorregion lokalisiert ist. In Hefen konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung genereller TF durch

aktivierende Faktoren des distalen Promotors u. a. von der Art der TATA-Box (kanonische [TATAAAA] bzw. nicht kanonische Sequenz) abhängt (Mencía et al., 2002). Demnach ist zu vermuten, dass durch die Einführung des Cytosins an Position drei der TATA-Box-bindende Komplex aus generellen TF verändert wird. Dadurch konnten aktivierende TF der distalen Promotorregion nicht mehr mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren und die transkriptionelle Aktivität wurde reduziert.

Eine Ausnahme bildete die Einführung des -112C-Allels in die längsten TCTA-Promotordeletionskonstrukte. Diese führte zu einer signifikanten Steigerung der transkriptionellen Aktivität (siehe Abbildung 4.5.1.b), was auf einen Verlust der Interaktion reprimierender Elemente mit der basalen Transkriptionsmaschinerie schließen lässt. Diese Aufhebung der transkriptionellen Repression lässt die Annahme zu, dass der Bereich -948/-448 und die Region um den Polymorphismus -112T>C funktionell gekoppelt sind.

5.6 Beide TATA-Boxen in unveränderter Distanz zueinander sind erforderlich für eine ausreichende *RhoA* Transkription

In der von *RhoA* und *TCTA* gemeinsam genutzten Promotorregion zwischen den TSS beider Gene sind zwei TATA-Boxen mit kanonischer Sequenz (TATAAAA) lokalisiert. Eine der TATA-Boxen ist zum *RhoA*-Gen, die andere zum *TCTA*-Gen orientiert.

Promotoren mit zwei TATA-Boxen wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. In der Regel besitzt eine der TATA-Boxen eine kanonische, die andere hingegen eine nicht-kanonische Sequenz. Iyer und Struhl konnten zeigen, dass in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beide TATA-Boxen des *his3*-Promotors differentiell und aktivierungsabhängig genutzt werden (Iyer und Struhl, 1995). Auch bei dem humanen Myoglobin-Gen konnte eine enhancerabhängige Nutzung unterschiedlicher TATA-Box-Sequenzen beobachtet werden (Wefald et al., 1990).

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass der in einer der beiden TATA-Boxen lokalisierte Polymorphismus -112T>C funktionelle Konsequenzen hat und die Einführung des C-Allels die transkriptionelle Aktivität negativ beeinflusst,

wurde in einem weiteren Schritt überprüft, ob beide TATA-Boxen in der gemeinsam genutzten Promotorregion von *RhoA* und *TCTA* für die transkriptionelle Kontrolle der Gene erforderlich sind und ob die Distanz der TATA-Boxen zueinander Bedeutung hat. Hierzu wurden in den jeweils aktivsten RhoA- und TCTA-Promotordeletionskonstrukten (p-948/-1H2 RhoA; p-448/-1H2 TCTA) die TATA-Boxen deletiert bzw. ihre Distanz verändert.

Sowohl die Deletion der (kompletten) TATA-Box1 als auch der (kompletten) TATA-Box2 sowie beider TATA-Boxen führte im RhoA-Kontext zum Einbruch der transkriptionellen Aktivität, so dass für die transkriptionelle Kontrolle des *RhoA*-Gens offensichtlich beide TATA-Boxen erforderlich sind (siehe Abbildung 4.5.3.b).

Auch die korrekte Distanz beider TATA-Boxen zueinander ist von Bedeutung, da bereits die Deletion bzw. Insertion eines Nukleotids zu einem bis zu 50%-igem Einbruch der transkriptionellen Aktivität führte (siehe Abbildung 4.5.4.b). Ob im Bezug auf *RhoA* die TATA-Box-Motive tatsächlich als klassische TATA-Boxen fungieren ist jedoch fraglich. Sie besitzen mit 88 bp bzw. 107 bp Abstand von der TSS eine erheblich größere Distanz als klassische TATA-Boxen mit einem optimalen Abstand von 28 bp bis 30 bp von der TSS (Sandelin et al., 2007). Möglicherweise dienen sie vielmehr als Strukturelemente, die eine für die Transkription des Gens notwendige Flexibilität oder Biegung der DNA ermöglichen. Wie von Davis et al. gezeigt, weist das ungebundene TATA-Box-Motiv TATAAAAG eine außergewöhnliche Krümmung und/oder anisotrope Flexibilität auf, während diese im TATA-Box-Motiv TACAAAAG deutlich reduziert ist (Davis et al., 1999). Folglich fungieren die TATA-Box-Motive im Bezug auf *RhoA* möglicherweise nicht als funktionelle TATA-Boxen, sondern vielmehr als für transkriptionelle Ereignisse notwendige Strukturelemente. Dies würde u. a. die Notwendigkeit beider TATA-Boxen in unveränderter Distanz zueinander und TATA-Box untypischem Abstand von der TSS erklären.

Auch im Bezug auf das *TCTA*-Gen nehmen die TATA-Boxen mit -1 bp bzw. -19 bp Entfernung von der TSS keine optimale Position ein. Jedoch führte die Deletion der TATA-Boxen sowie eine Veränderung ihres Abstands zueinander bei den TCTA-Konstrukten, im Vergleich zu den RhoA-Konstrukten, zu keinem eindeutigen Bild (siehe Abbildung 4.5.3.b und 4.5.4.b). Während die Deletion der kompletten TATA-Box1 in einem Anstieg der transkriptionellen Aktivität resultierte, führte die Deletion

der kompletten TATA-Box2 im Kontext des Haplotypen H1 zu einem Einbruch der transkriptionellen Aktivität. Zudem führte lediglich eine Veränderung des Spacings durch Insertion von einem bp bzw. 6 bp zu einem Einbruch der transkriptionellen Aktivität. Folglich scheinen auch hinsichtlich des *TCTA*-Gens die TATA-Boxen keine funktionellen Core-Promotor-Elemente darzustellen. Vermutlich sind die durch die Deletion bzw. die Veränderung des Abstands der beiden TATA-Boxen hervorgerufenen Effekte vielmehr auf ein verändertes Spacing anderer Core-Promotorelemente zurückzuführen.

Da die -112T>C Variante im Bezug auf die *TCTA*-TSS an Position -1 lokalisiert ist, könnte die durch das C-Allel verursachte verminderte transkriptionelle Aktivität der Promotordeletionskonstrukte mit einer Veränderung der -1,+1 Dinukleotide zusammenhängen. Carninci et al. konnten in einer genomweiten Analyse mit Hilfe von humanen und murinen CAGE-Daten zeigen, dass die bevorzugten und mit einer stärkeren Aktivität assoziierten Dinukleotide an Position -1,+1 die Basenkombinationen CG, CA und TG sind (Carninci et al., 2006). Folglich könnte eine Änderung der Dinukleotide an dieser Position Einfluss auf transkriptionelle Ereignisse nehmen und die durch das C-Allel hervorgerufene verminderte transkriptionelle Aktivität somit unabhängig von einer Veränderung des TATA-Box-Motivs sein.

5.7 Die TATA-Box flankierenden Bereiche nehmen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von *RhoA*

Die 10 Nukleotide direkt 5' der TATA-Box2 und direkt 3' der TATA-Box1 ergeben zusammen eine (fast) perfekt palindromische Sequenz. Um ihren Einfluss auf transkriptionelle Ereignisse zu überprüfen, wurden diese Regionen im aktivsten *RhoA*-Fragment (p-948/-1H2 *RhoA*) in sense und inverser Orientierung gegeneinander ausgetauscht (Abbildung 4.5.5.a). Der Austausch der TATA-Box flankierenden Regionen führte jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis. Vielmehr kam es in Abhängigkeit der Art der Sequenzveränderung (kompletter oder teilweiser Austausch, sense oder inverse Orientierung) zu einem Einbruch bzw. zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität (siehe Abbildung 4.5.5.b). Dabei führte

schon eine Verschiebung des ausgetauschten Sequenzfensters um zwei Basenpaare zu einer veränderten transkriptionellen Antwort.

Folglich sind nicht nur die TATA-Box-Motive selbst sowie ihr Abstand zueinander, sondern zudem die TATA-Box flankierenden Regionen für die transkriptionelle Kontrolle des *RhoA*-Gens von Bedeutung. Dabei scheint es, dass jede einzelne Base an ihrer genauen Position Einfluss besitzt und eine Änderung ihrer Position sich in der transkriptionellen Antwort widerspiegelt.

Bareket-Samish et al. konnten zeigen, dass die TATA-Box flankierenden Bereiche, obwohl sie an der Interaktion mit dem „TATA-Box bindenden Protein“ (TBP) nicht beteiligt sind, die Stabilität der Bindung beeinflussen (Bareket-Samish et al., 2000). Dies liegt vermutlich in der strukturellen Natur dieser Regionen begründet, so dass im Falle des *RhoA* möglicherweise nicht nur die TATA-Box-Motive, sondern zudem auch die flankierenden Regionen von struktureller Bedeutung sind und somit ihre Veränderung Einfluss auf die transkriptionelle Kontrolle nimmt.

5.8 EMSA-Untersuchungen zeigen ein differentielles Bindungsmuster für das -112T- und -112C-Allel

EMSA-Analysen sowohl mit als auch ohne den -112T>C Polymorphismus im Kontext einer 30 bp Oligonukleotidsonde zeigten zwei Protein-interagierende Banden mit allelspezifisch unterschiedlicher Intensität (siehe Abbildung 4.6.b). So zeigte das -112T-Allel unter allen stimulatorischen Bedingungen eine deutlich stärkere Bindung im Vergleich zum -112C-Allel. Ebenso fiel eine weitere, schneller migrierende Bande für das C-Allel signifikant schwächer aus. Vermutlich repräsentiert erstere Bindung einen Komplex höherer Ordnung (TBP-TFIIA-TATA-Box- bzw. TBP-TFIIB-TATA-Box-Komplex), die schneller migrierende Bande hingegen einen Komplex aus TBP und TATA-Box.

Stewart et al. konnten zeigen, dass zahlreiche TATA-Box Varianten die Bildung von TATA-Box-TBP-TFIIA- und -TFIIB-Komplexen beeinträchtigen und somit Einfluss auf die Genregulation nehmen. Dabei zeigt das TBP eine um 35% schwächere Bindung an die TATA-Box Variante TACAAA im Vergleich zur Wildtypsequenz TATAAA

(Stewart et al., 2006). Dies würde den durch das C-Allel verursachten Einbruch der transkriptionellen Aktivität der Promotordeletionskonstrukte erklären.

SNPs in TATA-Box-Motiven und daraus resultierende vererbte Erkrankungen wurden bereits mehrfach beschrieben. Dabei nehmen TATA-Box Polymorphismen sowohl aktivierenden als auch reprimierenden Einfluss auf transkriptionelle Ereignisse (Savinkova et al., 2009).

5.9 RhoA und TCTA sind mit inflammatorischen Erkrankungen assoziiert

Die kleine GTPase RhoA nimmt über seine Effektorproteine Einfluss auf zahlreiche Signalwege, die zur Entwicklung und Progression atherosklerotischer Ereignisse beitragen können (Loirand et al., 2006; Calò und Pessina, 2007). Zudem ist RhoA, insbesondere vermittelt durch Angiotensin II, in inflammatorische Prozesse involviert, indem es die Aktivierung von NF- κ B und die Expression von Chemo- und Cytokinen sowie endothelialer Adhäsionsmoleküle stimuliert (Cui et al., 2006).

Über die Funktion des TCTA-Proteins ist praktisch nichts bekannt. In einer Untersuchung von Kotake et al. wurde TCTA jedoch in der Synovia von Patienten mit entzündlicher rheumatoider Arthritis detektiert. Die Nachweisführung erfolgte dabei nicht über komplettes, immunreaktives TCTA, sondern indirekt über Peptidmusterzuordnung und wurde bislang noch nicht durch weitere Veröffentlichungen erhärtet. Dennoch waren TCTA-Peptide *in vitro* in der Lage, die „Receptor Activator of NF- κ B Ligand“ (RANKL)-induzierte Osteoclastogenese zu unterbinden (¹Kotake et al., 2009). Folglich werden beide Partner des divergenten Genpaares *RhoA-TCTA* mit entzündlichen Erkrankungen assoziiert.

Als ursächlich für die Entwicklung von Erkrankungen wird oftmals eine transkriptionelle Fehlregulation bestimmter Proteine angesehen. So wurde beispielsweise eine erhöhte Expression von RhoA in verschiedenen humanen Krebsformen nachgewiesen (Karlsson et al., 2009). Folglich kann die Dysregulation des bidirektionalen RhoA/TCTA-Promotorsystems, möglicherweise verursacht durch den als funktionell identifizierten Polymorphismus -112T>C [rs940045], von pathophysiologischem Belang sein.

Da *RhoA* und *TCTA* einerseits die TATA-Box-Motive sehr differentiell nutzen sowie unterschiedlich lange Promotorbereiche für eine ausreichende transkriptionelle

Aktivität benötigen, andererseits für RhoA eine basengenaue Sequenzabhängigkeit erforderlich ist und der Polymorphismus -112T>C nachweislich bidirektional funktionell ist, stellt das RhoA/TCTA-Promotorsystem ein exzellentes Modell für die Feinregulation bidirektionaler Transkription dar.

5.10 Besitzt TCTA eine Proteinfunktion?

Die Funktion des TCTA-Proteins bleibt bislang fast völlig ungeklärt. In einem einzelnen Bericht ist die hypothetische Konfiguration als membranständiges Protein mit zwei Transmembrandomänen und einem langen C-terminalen extrazellulären Bereich dargestellt (²Kotake et al., 2009). Da jedoch bisher kein eindeutiger Nachweis des TCTA-Proteins beschrieben wurde, wäre es denkbar, dass die TCTA-Transkription weniger der Proteinexpression dient, sondern vielmehr als Kontrollmoment für die RhoA-Transkription erforderlich ist und somit eher regulatorische Funktion übernimmt.

Sowohl in der Maus als auch beim Menschen konnte gezeigt werden, dass eine divergente, in reverser Orientierung zur TSS verlaufende Transkription ein Merkmal für die meisten aktiven Promotoren darstellt. Überrepräsentativ häufig ist dabei eine divergente Transkription bei CpG-Insel-Promotoren zu beobachten (Core et al., 2008; Seila et al., 2008). Die divergente Transkription in reverser Orientierung zur TSS bricht jedoch in der Regel nach 20 bis 90 bp ab (Seila et al., 2008), so dass Promotoren offensichtlich ein intrinsisches Signal für die Regulation der gerichteten Transkription besitzen. Es wird vermutet, dass dieses Signal insbesondere durch Histonmodifikation bestimmt wird. So zeigten Seila et al., dass die mit Elongationsereignissen der RNA-Polymerase II assoziierte Histonmodifikation H2K79me2 nicht bimodal um die TSS auftritt (Seila et al., 2008), so dass diese möglicherweise für die gerichtete Transkription verantwortlich ist.

Die Ursache und Relevanz der divergenten Transkription ist bisher weitestgehend unbekannt. Es ist jedoch denkbar, dass sie regulatorische Funktion in Form von kleinen nichtkodierenden RNAs (snoRNAs) übernimmt oder die Transkription selbst als regulatorisches Moment dient, indem sie DNA-Abschnitte nukleosomenfrei hält

und so TFBS vor der Maskierung schützt (Core et al., 2008; Seila et al., 2008, Preker et al., 2009).

Da *RhoA* und *TCTA* durch einen Promotorbereich von nur 112 bp getrennt sind, teilen sich beide Gene nicht nur eine gemeinsame Core-Promotorregion, sondern vermutlich überlappen sich zudem ihre divergenten Transkripte. Ob diese funktionell sind und inwieweit sie sich gegenseitig beeinflussen ist unbekannt. Mit Hilfe des Programms Fantom (<http://fantom.gsc.riken.jp/4/gev/gbrowse/hg18>) konnten im Bereich des von den Genen *RhoA* und *TCTA* eingerahmten bidirektionalen Promotors keine siRNA- oder miRNA-Sequenzen ermittelt werden. Dies könnte jedoch auch mit der geringen Größe divergenter Transkripte zusammenhängen, die in standardisierten RNA-Aufreinigungsprozessen verloren gehen.

Vergleichbar mit der divergenten Transkription könnte die *TCTA*-Transkription dazu dienen, regulatorische DNA-Abschnitte des *RhoA*-Gens nukleosomenfrei zu halten. Demzufolge würde auch die von Aplan et al. beschriebene Form des kleinzelligen Lungenkrebs (SCLC) nicht durch den Verlust einer Kopie des *TCTA*-Gens verursacht, sondern vielmehr durch eine Zerstörung der regulatorischen Region des *RhoA*-Gens (Aplan et al., 1995).

5.11 Schlussfolgerung

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) und ihre Folgen sind in der industrialisierten westlichen Welt für die meisten Todesfälle verantwortlich und verursachen immense direkte und indirekte Kosten. Durch die zunehmende Industrialisierung und der damit einhergehenden Veränderung des Lebensstils der Bevölkerung von Schwellen- und Drittweltländern werden zunehmend mehr Menschen an den Folgen von CVD leiden bzw. versterben (Lloyd-Jones et al., 2009).

Die genetische Grundlage von CVD ist multifaktorieller, polygenetischer Natur und impliziert somit ein komplexes Vererbungsmuster. Da demnach diesen Erkrankungen keine einfache Genotyp-Phänotyp-Beziehung zugrunde liegt, stellt die Erforschung ihrer genetischen Grundlagen eine Herausforderung dar (Herrmann und Paul, 2001; Cambien und Tiret, 2007).

Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien eröffnen die Möglichkeit, mit der Krankheit assoziierte, genomische Risikoloci einzugrenzen. Insbesondere die sich rasant weiterentwickelnden, genomweiten Hochdurchsatzstrategien erhöhen die Zahl putativ mit CVD assoziierter Risikoloci und genetischer Varianten. Da die meisten der identifizierten Risikoloci und genetischen Varianten jedoch intergenisch und somit außerhalb bekannter Gengrenzen liegen, bleibt ihre Funktion und Wirkungsweise im Bezug auf die Prädisposition von CVD unklar und erfordert sich anschließende, funktionelle Untersuchungen (Brand-Herrmann, 2008).

Jedoch setzt sich die Ansicht durch, dass gerade diese Varianten, die u. a. in regulatorischen Regionen von Genen lokalisiert sind, für einen Großteil der Komplexität des Menschen sowie seiner interindividuellen Unterschiede und Krankheitsprädispositionen verantwortlich sind (Buckland, 2006). Ein Einfluss genetischer Polymorphismen in regulatorischen Regionen von kardiovaskulären Kandidatengenen auf die transkriptionelle Aktivität konnte schon mehrfach gezeigt werden (Dördelmann et al., 2008; Hagedorn et al., 2009; Telgmann et al., 2009; Schmidt-Petersen et al., 2009).

Erschwert wird die funktionelle Analyse genetischer Varianten jedoch durch die Erkenntnis, dass das klassische Bild des isolierten, modulären Genaufbaus mit klar definierten Gengrenzen in den meisten Fällen nicht zutreffend ist (Kapranov et al., 2007; Portin, 2009). So besitzt beispielsweise jedes Gen im Schnitt 3,1 Promotoren, die gewebs- und entwicklungsabhängig reguliert werden (Cheong et al., 2006). Folglich haben genetische Polymorphismen mitunter, abhängig vom Gewebe und

Entwicklungsstatus, Einfluss auf mehrere Gene. Dies erschwert ihre funktionelle Annotation und die Erforschung genetischer Ursachen komplexer, polygenetischer Erkrankungen wie CVD.

Ein Sonderfall alternativer Promotoren sind bidirektionale Promotoren. Sie werden von zwei, diesen regulatorischen Bereich flankierenden Genen genutzt. Wie in der vorliegenden Arbeit zum divergenten Genpaar *RhoA/TCTA* gezeigt, kann ein SNP in einem bidirektionalen Promotor Einfluss auf die Regulation beider ihn flankierenden Gene nehmen. Da sich jedoch die Region in unmittelbarer Nachbarschaft zum SNP (TATA-Box-Motive) differentiell auf die Regulation des hier untersuchten divergenten Genpaares auszuwirken scheint, wäre es denkbar, dass auch der Polymorphismus *in vivo* einen unterschiedlichen Einfluss auf die Regulation von *RhoA* und *TCTA* nimmt. Dies könnte eine Dysbalance in der Expression beider Gene zur Folge haben. Da beide Gene mit inflammatorischen Erkrankungen (Atherosklerose und rheumatoide Arthritis) assoziiert sind, könnte durch das Auftreten des SNPs die Prädisposition für die Entwicklung einer dieser Erkrankungen erhöht sein. Zudem wäre denkbar, dass ein Einwirken bestimmter Umweltfaktoren ausschlaggebend für die Entwicklung von entweder atherosklerotischen Läsionen oder rheumatoider Arthritis ist.

6. Ausblick

Divergente Genkonstellationen und damit verbundene bidirektionale Promotoren sind bisher nur unvollständig untersucht. Insbesondere die Feinregulation der Assemblierung der basalen Transkriptionsmaschinerie sowie die Regulation der (kontrolliert) gerichteten Transkription, gerade in Hinsicht auf die pathophysiologische Relevanz, ist gegenwärtig nicht verstanden.

Die in dieser Arbeit identifizierte differenzielle Regulation der divergent orientierten Gene *RhoA* und *TCTA* durch den von ihnen eingerahmten bidirektionalen Promotor und die basengenaue Analyse von Teilen dieses Promotorbereichs gibt erste Hinweise auf die zu Grunde liegenden komplexen Regulationsmechanismen.

Zu klären bleibt, inwieweit sich die Rate der (möglicherweise) „oszillierenden“ Transkription beider Gene hinsichtlich genetischer Varianten (-112T>C [rs940045]), proteomischer Umgebung (Zelllinie, Differenzierungsstatus), epigenetischen Einflüssen und externen Stimuli verändert und welche molekularen Schalter diesem zugrunde liegen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein bidirektionaler Reporter-genvektor konstruiert. Dieser trägt zwei divergent orientierte Reportergene: DsRed und EGFP (siehe Abbildung 6.1).

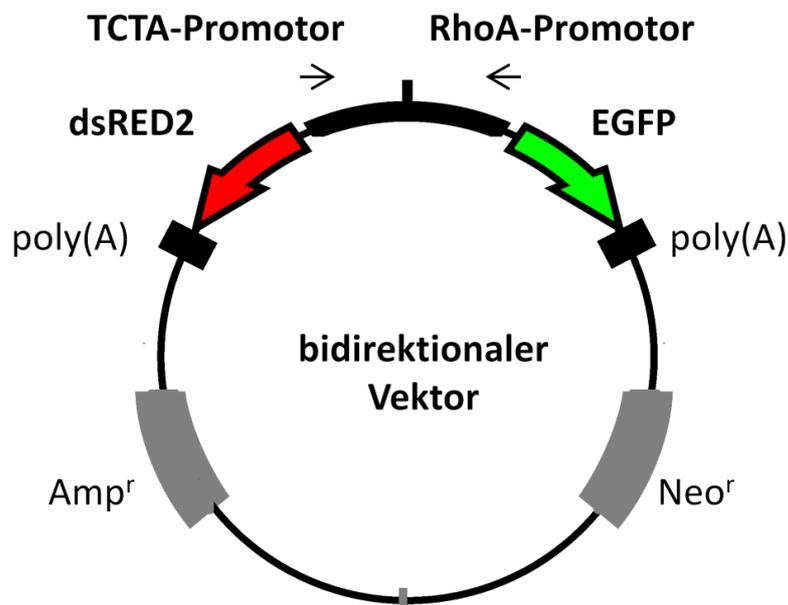


Abb.6.1: Schematische Darstellung des bidirektionalen Vektors. Die Reportergene dsRED2 und EGFP sind divergent orientiert. Durch Einklonierung eines ausreichend aktiven regulatorischen Bereichs in die MCS zwischen den beiden Reportergenen kann die *RhoA-TCTA* 5'-flankierende Region in ihrer natürlichen Konfiguration analysiert werden. Während der Arbeit an diesem Projekt wurde ein ähnlicher Vektor publiziert (Uwanogho et al., 2010)

Durch Einklonierung einer ausreichend aktiven *RhoA* und *TCTA* 5'-regulatorischen Region in natürlicher Konkurrenzsituation zwischen die Reportergene besteht die Möglichkeit, eine durch die oben genannten Faktoren veränderte, orientierungsabhängige transkriptionelle Aktivität „online“ und ohne Zelllyse zu verfolgen und sogar zu quantifizieren. Denkbar wäre dies in Form des „Live Cell Imaging“, bei dem über einen längeren Zeitraum der Einfluss verschiedener Stimuli auf die transkriptionelle Aktivität des bidirektionalen Systems an lebenden Zellen beobachtet werden könnte. Quantifizieren ließen sich mögliche Einflüsse auf das bidirektionale System durch z. B. FACS (fluorescence activated cell sorting)-Analysen oder „single cell microscopy“. (In der Endphase dieses Promotionsvorhabens wurde eine Arbeit veröffentlicht, in der ein ähnliches Vektorkonstrukt vorgestellt wurde. Die Reporterogenaktivität wurde dort jedoch über die jeweiligen Transkriptlevel bestimmt (Uwanogho et al., 2010)).

Zudem ist eine weitere Feinanalyse der bidirektionalen Promotorsequenz notwendig. Dies ermöglicht die Identifizierung regulatorischer Module und in der Folge die Klärung der Fragestellung ob, bzw. inwieweit diese von beiden regulatorischen Maschinerien der divergent orientierten Gene genutzt werden.

Letztlich bleibt zudem die Frage der funktionellen Bedeutung von durch Polymorphismen (wie in diesem Fall der -112T>C Variante) in bidirektionalen Promotoren verursachten möglichen Dysbalancen im Expressionsverhältnis der Gene eines divergenten Paares zu klären. Bezüglich der mit inflammatorischen Erkrankungen assoziierten Gene *RhoA* (Atherosklerose) und *TCTA* (rheumatoide Arthritis) könnte eine Dysbalance in der Expression die Prädisposition für eine der Erkrankungen begünstigen.

7. Referenzen

Adachi N, Lieber MR. (2002) Bidirectional gene organization: a common architectural feature of the human genome. *Cell*. 109, 807-809.

Aplan PD, Johnson BE, Russell E, Chervinsky DS, Kirsch R. (1995) Cloning and characterization of TCTA, a gene located at the site of a t(1;3) translocation. *Cancer Res*. 55, 1917-1921.

Arnett DK, Baird AE, Barkley RA, Basson CT, Boerwinkle E, Ganesh SK, Herrington DM, Hong Y, Jaquish C, McDermott DA, O'Donnell CJ. (2007) Relevance of genetics and genomics for prevention and treatment of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, the Stroke Council, and the Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation*. 115, 2878-2901.

Ayoubi TA, Van De Ven WJ. (1996) Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J*. 10, 453-460.

Backlund PS, Jr. (1997) Post-translational processing of RhoA: carboxyl methylation of the carboxyl-terminal prenylcysteine increases the half-life of RhoA. *J Biol Chem*. 272, 33175-33180.

Bareket-Samish A, Cohen I, Haran TE. (2000) Signals for TBP/TATA box recognition. *J Mol Biol*. 299, 965-977.

Birnboim HC, Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 7, 1513-1523.

Bolick DT, Orr AW, Whetzel A, Srinivasan S, Hatley ME, Schwartz MA, Hedrick CC. (2005) 12/15-lipoxygenase regulates intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte adhesion to endothelium through activation of RhoA and nuclear factor- κ B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25, 2301-2307.

Brand-Herrmann SM. (2008) Where do we go for atherothrombotic disease genetics? *Stroke*. 39, 1070-1075.

Brown JH, Del Re DP, Sussman MA. (2006) The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res*. 98, 730-742.

Buckland PR. (2006) The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta*. 1762, 17-28.

Butler JEF, Kadonaga JT. (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev*. 16, 2583-2592.

- Calò LA**, Pessina AC. (2007) RhoA/RhoA-kinase pathway: much more than just a modulation of vascular tone. Evidence from studies in humans. *J Hypertens.* 25, 259-264.
- Cambien F**, Tiret L. (2007) Genetics of cardiovascular diseases: from single mutations to the whole genome. *Circulation.* 116, 1714-1724.
- Cannizzaro LA**, Madaule P, Hecht F, Axel R, Croce CM, Huebner K. (1990) Chromosome localization of human ARH genes, a ras-related gene family. *Genomics.* 6, 197-203.
- Carninci P**, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, Sempé CAM, Taylor MS, Engström PG, Frith MC, Forrest ARR, Alkema WB, Tan SL, Plessy C, Kodzius R, Ravasi T, Kasukawa T, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Kitazume Y, Kawaji H, Kai C, Nakamura M, Konno H, Nakano K, Mottagui-Tabar S, Arner P, Chesi A, Gustincich S, Persichetti F, Suzuki H, Grimmond SM, Wells CA, Orlando V, Wahlestedt C, Liu ET, Harbers M, Kawai J, Bajic VB, Hume DA, Hayashizaki Y. (2006) Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet.* 38, 626-635.
- Caron H**, van Schaik B, van der Mee M, Baas F, Riggins G, van Sluis P, Hermus MC, van Asperen R, Boon K, Voûte PA, Heisterkamp S, van Kampen A, Versteeg R. (2001) The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science.* 291, 1289-1292.
- Cheong J**, Yamada Y, Yamashita R, Irie T, Kanai A, Wakaguri H, Nakai K, Ito T, Saito I, Sugano S, Suzuki Y. (2006) Diverse DNA methylation statuses at alternative promoters of human genes in various tissues. *DNA Res.* 13, 155-167.
- ¹**Chiba Y**, Goto K, Momata M, Kobayashi T, Misawa M. (2010) Induction of RhoA gene expression by interleukin-4 in cultured human bronchial smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 46, 217-224.
- ²**Chiba Y**, Goto K, Matsusue K, Kimura S, Misawa M. (2010) Identification and characterization of rat RhoA gene promoter. *J Pharmacol Sci.* 112, 467-472.
- Cichon S**, Freudenberg J, Propping P, Nöthen MM. (2002) Variabilität im menschlichen Genom. *Dtsch Arztebl.* 46, A3091-3101.
- Core LJ**, Waterfall JJ, Lis JT. (2008) Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science.* 322, 1845-1848.
- Cui R**, Tieu B, Recinos A, Tilton RG, Brasier AR. (2006) RhoA mediates angiotensin II-induced phospho-ser536 nuclear factor κ B/RelA subunit exchange on the interleukin-6 promoter in VSMCs. *Circ Res.* 99, 723-730.
- Davis NA**, Majee SS, Kahn JD. (1999) TATA box DNA deformation with and without the TATA box-binding protein. *J Mol Biol.* 291, 249-265.

- Davuluri RV**, Suzuki Y, Sugano S, Plass C, Huang TH-M. (2008) The functional consequence of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends Genet.* 24, 167-177.
- Dördelmann C**, Telgmann R, Brand E, Hagedorn C, Schröer B, Hasenkamp S, Baumgart P, Kleine-Katthöfer P, Paul M, Brand-Herrmann SM. (2008) Functional and structural profiling of the human thrombopoitin gene promoter. *J Biol Chem.* 283, 24382-24391.
- Edgell CJ**, Haizlip JE, Bagnell CR, Packerham JP, Harrison P, Wilbourn B, Madden VJ. (1990) Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. *In Vitro Cell Dev Biol.* 26, 1167-1172.
- Ellerbroek SM**, Wennerberg K, Burridge K. (2003) Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem.* 278, 19023-19031.
- Etienne-Manneville S**, Hall A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 420, 629-635.
- Falk E.** (2006) Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 47, C7-C12.
- Forget MA**, Desrosiers RR, Gingras D, Béliveau R. (2002) Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *Biochem J.* 361, 243-254.
- Genomatix-Homepage:** <http://www.genomatix.de/download/download4.html>; "MatInspector: Too Many Matches".
- Goldstein JL**, Brown MS. (1977) Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism.* 26, 1257-1275.
- Goto K**, Chiba Y, Matsusue K, Hattori Y, Maitani Y, Sakai H, Kimura S, Misawa M. (2010) The proximal STAT6 and NF-kappaB sites are responsible for IL-13- and TNF-alpha-induced RhoA transcriptions in human bronchial smooth muscle cells. *Pharmacol Res.* 61, 466-472.
- Grabe N.** (2002) AliBaba2: context specific identification of transcriptional factor binding sites. *In Silico Biol.* 2, S1-15.
- Hagedorn C**, Telgmann R, Dördelmann C, Schmitz B, Hasenkamp S, Cambien F, Paul M, Brand E, Brand-Herrmann SM. (2009) Identification and functional analyses of molecular haplotypes of the human osteoprotegerin promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29, 1638-1643.
- Hakoshima T**, Shimizu T, Maesaki R. (2003) Structural basis of the Rho GTPase signaling. *J Biochem.* 134, 327-331.
- Herrmann SM**, Paul M. (2001) The genetics of coronary heart disease. *Eur J Intern Med.* 12, 2-10.

- Herrmann SM**, Paul M. (2002) Studying genotype-phenotype relationships: cardiovascular disease as an example. *J Mol Med.* 80, 282-289.
- Hinson JS**, Medlin MD, Lockman K, Taylor JM, Mack CP. (2006) Smooth muscle cell-specific transcription is regulated by nuclear localization of the myocardin-related transcription factors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292, H1170-H1180.
- Hirschhorn JN**, Daly MJ. (2005) Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet.* 6, 95-108.
- Ikegami K**, Ohgane J, Tanaka S, Yagi S, Shiota K. (2009) Interplay between DNA methylation, histone modification and chromatin remodeling in stem cells and during development. *Int J Dev Biol.* 53, 203-214.
- Ishibashi T**, Sakamoto T, Ohkawara H, Nagata K, Sugimoto K, Sakurada S, Sugimoto N, Watanabe A, Yokoyama K, Sakamoto N, Kurabayashi M, Takuwa Y, Maruyama Y. (2003) Integral role of RhoA activation in monocyte adhesion-triggered tissue factor expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23, 681-687.
- Ito K**, Hirooka Y, Sakai K, Kishi T, Kaibuchi K, Shimokawa H, Takeshita A. (2003) Rho/Rho-kinase pathway in brain stem contributes to blood pressure regulation via sympathetic nervous system. *Circ Res.* 92, 1337-1343.
- Iyer V**, Struhl K. (1995) Mechanism of differential utilization of the his3 T_R and T_C TATA elements. *Mol Cell Biol.* 15, 7059-7066.
- Jarinova O**, Stewart AFR, Roberts R, Wells G, Lau P, Naing T, Buerki C, McLean BW, Cook RC, Parker JS, McPherson R. (2009) Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29, 1671-1677.
- Jeziorska DM**, Jordan KW, Vance KW. (2009) A systems biology approach to understanding cis-regulatory module function. *Semin Cell Dev Biol.* 20, 858-862.
- Juven-Gershon T**, Hsu JY, Theisen JWM, Kadonaga JT. (2008) The RNA polymerase II core promoter – the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol.* 20, 253-259.
- Kadonaga JT.** (2002) The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med.* 34, 259-264.
- Kadonaga JT.** (2004) Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell.* 116, 247-257.
- Kalitsis P**, Saffery R. (2009) Inherent promoter bidirectionality facilitates maintenance of sequence integrity and transcription of parasitic DNA in mammalian genomes. *BMC Genomics.* 10, 498.

- Kapranov P**, Willingham AT, Gingeras TR. (2007) Genome-wide transcription and the implication for genomic organization. *Nat Rev Genet.* 8, 413-423.
- Karlsson R**, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C. (2009) Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1796, 91-98.
- Kazushi K**, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science.* 237, 245-248.
- Kher N**, Marsh JD. (2004) Pathobiology of atherosclerosis - a brief review. *Semin Thromb Hemost.* 30, 665-672.
- Kim JK**, Samaranyake M, Pradhan S. (2009) Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 66, 596-612.
- Kornberg RD.** (2007) The molecular basis of eukaryotic transcription. *Cell Death Differ.* 14, 1989-1997.
- ¹**Kotake S**, Nanke Y, Kawamoto M, Yago T, Udagawa N, Ichikawa N, Kobashigawa T, Saito S, Momohara S, Kamatari N, Yamanaka H. (2009) T-cell leukemia translocation-associated gene (TCTA) protein is required for human osteoclastogenesis. *Bone.* 45, 627-639.
- ²**Kotake S**, Yago T, Kawamoto M, Nanke Y. (2009) The role of T-cell leukemia translocation-associated gene (TCTA) protein in human osteoclastogenesis. *Jpn J Clin Immunol.* 32, 466-471.
- Kotseva K**, Wood D, De Backer G, De Bacquer D, Pyörälä K, Keil U; EUROASPIRE Study Group. (2009) Cardiovascular prevention guidelines in daily practice: a comparison of EUROASPIRE I, II, and III surveys in eight European countries. *Lancet.* 373, 929-940.
- Kureishi Y**, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M. (1997) Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem.* 272, 12257-12260.
- Laufs U**, Liao JK. (2000) Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Cardiovasc Med.* 10, 143-148.
- Laufs U**, Adam O. (2008) Antioxidative effects of statins. *Arch Toxicol.* 82, 885-892.
- Lin JM**, Collins PJ, Trinklein ND. (2007) Transcription factor binding and modified histones in human bidirectional promoters. *Genome Res.* 17, 818-827.

Liu HW, Halayko AJ, Fernandes DJ, Harmon GS, McCauley JA, Kocieniewski P, McConville J, Fu Y, Forsythe SM, Kogut P, Bellam S, Dowell M, Churchill J, Lesso H, Kassiri K, Mitchell RW, Hershenson MB, Camoretti-Mercado B, Soway J. (2003) The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29, 39-47.

Lloyd-Jones DM, Nam BH, D'Agostino RB Sr, Levy D, Murabito JM, Wang TJ, Wilson PW, O'Donnell CJ. (2004) Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA.* 291, 2204-2211.

Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. (2009) Heart disease and stroke statistics - 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* 119, 480-486.

Loirand G, Guérin P, Pacaud P. (2006) Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res.* 98, 322-334.

Madaule P, Axel R. (1985) A novel ras-related gene family. *Cell.* 41, 31-40.

Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. (1994) Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med.* 220, 1041-1046.

Maston GA, Evans SK, Green MR. (2006) Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genom Human Genet.* 7, 29-59.

Meisinger C, Prokisch H, Gieger C, Soranzo N, Mehta D, Roskopf D, Lichtner P, Klopp N, Stephens J, Watkins NA, Deloukas P, Greinacher A, Koenig W, Nauck M, Rimbach C, Völzke H, Peters A, Illig T, Ouwehand WH, Meitinger T, Wichmann HE, Döring A. (2009) A genome-wide association study identifies three loci associated with mean platelet volume. *Am J Hum Genet.* 84, 66-71.

Mencía M, Moqtaderi Z, Geisberg JV, Kuras L, Struhl K. (2002) Activator-specific recruitment of TFIID and regulation of ribosomal protein genes in yeast. *Mol Cell.* 9, 823-833.

Moriki N, Ito M, Seko T, Kureishi Y, Okamoto R, Nakakuki T, Kongo M, Isaka N, Kaibuchi K, Nakano T. (2004) RhoA activation in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 27, 263-270.

- Murabito JM**, Pencina MJ, Nam BH, D'Agostino RB Sr, Wang TJ, Lloyd-Jones D, Wilson PW, O'Donnell CJ. (2005) Sibling cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults. *JAMA*. 294, 3117-3123.
- Noda M**, Yasuda-Fukazawa C, Moriishi K, Kato T, Okuda T, Kurokawa K, Takuwa Y. (1995) Involvement of *rho* in GTPγS-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett*. 367, 246-250.
- Nohria A**, Prsic A, Liu PY, Okamoto R, Creager MA, Selwyn A, Liao JK, Ganz P. (2009) Statins inhibit Rho kinase activity in patients with atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 205, 517-521.
- Numaguchi K**, Eguchi S, Yamakawa T, Motley ED, Inagami T. (1999) Mechanotransduction of rat aortic smooth muscle cells requires RhoA and intact actin filaments. *Circ Res*. 85, 5-11.
- Orphanides G**, Lagrange T, Reinberg D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*. 10, 2657-2683.
- Orphanides G**, Reinberg D. (2002) A unified theory of gene expression. *Cell*. 108, 439-451.
- Ovcharenko I**, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. (2004) ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res*. 32(Web Server issue), W280-286.
- Portin P**. (2009) The elusive concept of the gene. *Hereditas*. 146, 112-117.
- Preker P**, Nielsen J, Schierup MH, Jensen TH. (2009) RNA polymerase plays both sides: vivid and bidirectional transcription around and upstream of active promoters. *Cell Cycle*. 8, 1106-1107.
- Ridley AJ**. (1997) The GTP-binding protein Rho. *Int J Biochem Cell Biol*. 29,1225-1229.
- Roberts PJ**, Mitin N, Keller PJ, Chenette EJ, Madigan JP, Currin RO, Cox AD, Wilson O, Kirschmeier P, Der CJ. (2008) Rho family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J Biol Chem*. 283, 25150-25163.
- Rolli-Derkinderen M**, Sauzeau V, Boyer L, Lemichez E, Baron C, Henrion D, Loirand G, Pacaud P. (2005) Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 96, 1152-1160.
- Ross R**. (1979) The arterial wall and atherosclerosis. *Annu Rev Med*. 30, 1-15.

- Ross R.** (1999) Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340, 115-126.
- Sandelin A,** Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume DA. (2007) Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet.* 8, 424-436.
- Savinkova LK,** Ponomareko MP, Ponomarenko PM, Drachkova IA, Lysova MV, Arshinova TV, Kolchanov NA. (2009) TATA box polymorphisms in human gene promoters and associated hereditary pathologies. *Biochemistry (Mosc.).* 74, 117-129.
- Schmidt-Petersen K,** Brand E, Telgmann R, Nicaud V, Hagedorn C, Labreuche J, Dördelmann C, Elbaz A, Gautier-Bertrand M, Fischer JW, Evans A, Morrison C, Arveiler D, Stoll M, Amarenco P, Cambien F, Paul M, Brand-Herrmann SM. (2009) Osteopontin gene variation and cardio/cerebrovascular disease phenotypes. *Atherosclerosis.* 206, 209-215.
- Schreiber E,** Matthias P, Muller MM, Schaffner W. (1989) Rapid detection of octamer binding G proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17, 6419.
- Seasholtz TM,** Zhang T, Morissette MR, Howes AL, Yang AH, Brown JH. (2001) Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27(Kip1) expression in vasculatur of hypertensive rats. *Circ Res.* 89, 488-495.
- Seila AC,** Calabrese JM, Levine SS, Yeo GW, Rahl PB, Flynn RA, Young RA, Sharp PA. (2008) Divergent transcription from active promoters. *Science.* 322, 1849-1851.
- Seko T,** Ito M, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Onishi K, Isaka N, Hartshorne DJ, Nakano T. (2003) Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 92, 411-418.
- Smale ST,** Kadonaga JT. (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem.* 72, 449-479.
- Stewart JJ,** Fischbeck JA, Chen X, Stargell LA. (2006) Non-optimal TATA elements exhibit diverse mechanistic consequences. *J Biol Chem.* 281, 22665-22673.
- Takai D,** Jones PA. (2004) Origins of bidirectional promoters: computational analyses of intergenic distance in the human genome. *Mol Biol Evol.* 21, 463-467.
- Telgmann R,** Dördelmann C, Brand E, Nicaud V, Hagedorn C, Pavenstädt H, Cambien F, Tiret L, Paul M, Brand-Herrmann SM. (2009) Molecular genetic analysis of a human insulin-like growth factor 1 promoter P1 variation. *FASEB J.* 23, 1303-1313.
- Tjian R,** <http://www.hhmi.org/research/investigators/tjian.html>.

- Trinklein ND**, Aldred SF, Hartman SJ, Schroeder DI, Otilar RP, Myers RM. (2004) An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res.* 14, 62-66.
- Uehata M**, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 389, 990-994.
- Uwanogho DA**, Yasin SA, Starling B, Price J. (2010) The intergenic region between the Mouse *Recql4* and *Lrrc14* genes functions as an evolutionary conserved bidirectional promoter. *Gene.* 449, 103-117.
- Vischer P**, Telgmann R, Schmitz B, Hasenkamp S, Schmidt-Petersen K, Beining K, Hüge A, Paul M, Amarenco P, Cambien F, Brand E, Brand-Herrmann SM. (2008) Molecular investigation of the functional relevance of missense variants of ICAM-1. *Pharmacogenet Genomics.* 18, 1017-1019.
- Wefald FC**, Devlin BH, Williams S. (1990) Functional heterogeneity of mammalian TATA-box sequences revealed by interaction with a cell-specific enhancer. *Nature.* 344, 260-262.
- Wennerberg K**, Der CJ. (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci.* 117, 1301-1312.
- Whitehead J**, Pandey GK, Kanduri C. (2009) Regulation of the mammalian epigenome by long noncoding RNAs. *Biochim Biophys Acta.* 1790, 936-947.
- Whitehouse I**, Rando OJ, Delrow J, Tsukiyama T. (2007) Chromatin remodeling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature.* 450, 1031-1035.
- Wójciak-Stothard B**, Williams L, Ridley AJ. (1999) Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J Cell Biol.* 145, 1293-1307.
- Wójciak-Stothard B**, Potempa S, Eichholtz T, Ridley AJ. (2001) Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci.* 114, 1343-1355.
- World Health Organization**, fact sheet N°317, (updated september 2009). Cardiovascular disease (CVDs). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/print.html>.
- Yang MQ**, Elnitski LL. (2007) Diversity of core promoter elements comprising human bidirectional promoters. *BMC Genomics.* 9 (Suppl 2), S3.
- Ziegler A.** (2002) Genetische Epidemiologie – Gegenwart und Zukunft. *Dtsch Arztebl.* 36, A2342-A2346.

8. Anhang

8.1 Sequenz der verwendeten Primer

Tabelle 1: Sequenz der diagnostischen Primer

Name	Sequenz 5'-3'	Position	Accession #
DPrhoA-1+	GTT CTC TCG TTA GTC CAC GG	159	NM_001664.2
DPrhoA-4-	CAC GTC TAG CTT GCA GAG C	807	NM_001664.2
DP-TCTA5SS	GTT GGT GTT AAG TCT CCT GG	356	NM_022171.2
DP-TCTA6AS (B10)	CAA TCT CTC TCC TTA AGG CAC	749	NM_022171.2
hRP27 SS	CCA GGA TAA GGA AGG AAT TCC TCC TG	128	NM_002954.3
hRP27 AS	CCA GCA CCA CAT TCA TCA GAA GG	424	NM_002954.3

Tabelle 2: Sequenzen der 5'-RACE Primer

Name	Sequenz 5'-3'	Position	Accession #
RhoA RACE1	CAT ACA CCT CTG GGA ACT G	361	NM_001664.2
RhoA RACE2	CGA GTC CAG CCT CTT CG	243	NM_001664.2
TCTA RACE1	GTC ACT GTA TTC CCG TAG AAC	394	NM_022171.2
TCTA RACE2	CTC CCG CAA GAA CTC GCT G	286	NM_022171.2

Tabelle 3: Sequenzen der Primer für die diakritische PCR

Name	Sequenz 5'-3'	Position	Accession #
DPrhoA-3+	GTG GAT GAG CTG TGA GTG C	1	NM_001664.2
DPrhoA-4+	CTC TCG CGC TAC CCT CC	121	NM_001664.2
DPrhoA-5+	GGT TCT CTC GTT AGT CCA CG	159	NM_001664.2
DPrhoA-4-	CAC GTC TAG CTT GCA GAG C	807	NM_001664.2
DP-TCTA2+	TAC TCC CGG AGT CAC TCA TC	1	NM_022171.2
DP-TCTA3+	CCC GGA AGA CCA CAC GC	152	NM_022171.2
DP-TCTA4+	CAC GCG TGC GTG GTG G	164	NM_022171.2
DP-TCTA5+	CCA GTC ATG GCG GAG TCC	215	NM_022171.2
DP-TCTA6AS (B10)	CAA TCT CTC TCC TTA AGG CAC	749	NM_022171.2

Tabelle 4: Sequenzen der Primer für die Identifizierung genetischer Varianten

Name	Sequenz 5'-3'	Chromosom 3p21 Position
rhoA-0+	CTG ACC CTG TGG CAT TTG	49.451.168
rhoA-0-	CAC CAG CTT AAT GGC CTT TG	49.450.657
rhoA-1+	AAG CTA GCT TGC AGA AGA GGA GGC TGA C	49.450.898
1L	CCT CAC CAG ACT TCA CC	49.450.392
2U	AGG TCA GGT TAG AGA CCA CTG G	49.450.418
2L	CAG AAC TTA ACA TTG GTT CAC G	49.450.192
3U	TCC GAG GTC AGA TGC GTT CAG G	49.450.224
3L	CAT GCG CGT GAC CCT CTT CAA GC	49.449.980
4U	GGA TGC CCA GGA GAC TTA ACA C	49.449.019
4L	CTT CAC GCA CGC GAA GTA G	49.449.745
5U	ACC AGG CCC GTT AGT GCG CAC G	49.449.790
5L	TCA TCC ACT ATT GCT CAG GAG CC	49.449.541
rhoA-4+SS	AAG CTA GCC AGG TCT TTT ATA GCC CCG G	49.449.626
rhoA-7-AS	CTC AGG CAA CGA ATC CGA GTC C	49.449.274
TCTA 1 for	GTG CCA AAT GCT CAA AAC AG	49.448.110
TCTA 1 rev	GAC TTG TTT GGT TCT GTC TTG	49.448.317
TCTA 2 for	CCT GCA AGA AAC GTT TAA GAC	49.448.310
TCTA 2 rev	GTC GCT GTA TTG ATT AGG AAT G	49.448.511
TCTA 4 for	CCC TAA GCG TTC AAT ACA ATC	49.448.704
TCTA 4 rev	CCG GTA GTC TCC TGT GC	49.449.042
TCTA 5 for	CTG GGA GAG GAA GCT CC	49.449.001
TCTA 5 rev	CAG CCC GGT ACT CTT CC	49.449.206
TCTA 6 for	CCA CGA GCA GCC GGT G	49.449.154
TCTA 6 rev	GTG GAT GAG CTG TGA GTG	49.449.526
TCTA 7 for	CTC CGA GTG CCC AGC G	49.449.467
TCTA 7 rev	GGT ACT GTC ACC GTA GTC	49.449.837
TCTA 8 for	CCA AAT GGA AAA TAC CCC TT	49.448.609
TCTA 8 rev	CAG TTA CAC TTT GGG TAG G	49.448.769
TCTA 9 for	GTG AAC AAA TCA ACT TGG ATG C	49.448.417
TCTA 9 rev	GTA AAT GAT TTA AGC GAT GTT GC	49.448.565

Tabelle 5: Sequenz der Primer für die Amplifikation der Deletionskonstrukte

Name	Sequenz 5'-3'	Chromosom 3p21 Position
rhoA-1+	AAG CTA GCT TGC AGA AGA GGA GGC TGA C	49.450.898
rhoA-2+	AAG CTA GCA CAT CCA GAG CTG CAG AAG G	49.450.474
rhoA-3+	AAG CTA GCT GCC CAG GAG ACT TAA CAC C	49.450.016
rhoA-4+	AAG CTA GCC AGG TCT TTT ATA GCC CCG G	49.449.626
rhoA-5-	AAA GAT CTT ATT GCT CAG GAG CCC GTC C	49.449.546
TCTA-1+	CAA GAC AGA ACC AAA CAA GTC	49.448.317
TCTA-2+	GCG TTC AAT ACA ATC TTT TAC TTA C	49.448.710
TCTA-3+	GAA GAG TAC CGG GCT GGC	49.449.208
TCTA-4+	GCC CGT CCA CGC CCT AAA A	49.449.557
TCTA-5-	CAA AAT AGC AAC CAG GTC TTT TAT A	49.449.639
TCTA-5- (-112)	TAA AAT AGC AAC CAG GTC TTT TAT A	49.449.639

Tabelle 6: Sequenz der Mutageneseprimer**a) Primer für die Deletion der TATA-Boxen**

Name	Sequenz 5'-3'	Chromosom 3p21 Position
Del TATA1 SS	AGT GAC TCC GGG AGT AGC AAC CAG GTC T	49.449.654
Del TATA1 AS	AGA CCT GGT TGC TAC TCC CGG AGT CAC T	49.449.654
Del TATA1 comp SS	GGA TGA GTG ACT CCC AAC CAG GTC TTT T	49.449.659
Del TATA1 comp AS	AAA AGA CCT GGT TGG GAG TCA CTC ATC C	49.449.659
Del TATA2 SS	AAT AGC AAC CAG GTC GCC CCG GAG TTC CCG	49.449.635
Del TATA2 AS	CGG GAA CTC CGG GGC GAC CTG GTT GCT ATT	49.449.635
Del TATA2 compSS	ACA AAA TAG CAA CCA CGG AGT TCC CGT GAT	49.449.639
Del TATA2 comp AS	ATC ACG GGA ACT CCG TGG TTG CTA TTT TGT	49.449.639
Del TATA1/2 SS	GAG TGA CTC CGG GAG TAG CAA CCA GGT CGC	49.449.655
Del TATA1/2 AS	GCG ACC TGG TTG CTA CTC CCG GAG TCA CTC	49.449.655
Del TATA1/2 comp SS	GGG ATG AGT GAC TCC CAA CCA CGG AGT TCC	49.449.660
Del TATA1/2 comp AS	GGA ACT CCG TGG TTG GGA GTC ACT CAT CCC	49.449.660
TCTA Del TATA1 comp SS H1	ATC ACG GGA ACT CCG TGG TTG CTA TTT TG	49.449.638
TCTA Del TATA1 comp AS H1	CAA AAT AGC AAC CAC GGA GTT CCC GTG AT	49.449.638
TCTA Del TATA1 comp SS H2	ATC ACG GGA ACT CCG TGG TTG CTA TTT TA	49.449.638
TCTA Del TATA1 comp AS H2	TAA AAT AGC AAC CAC GGA GTT CCC GTG AT	49.449.638
TCTA Del TATA2 SS	AGA CCT GGT TGC TAA GGG CGA ATT CG	49.449.632
TCTA Del TATA2 AS	CGA ATT CGC CCT TAG CAA CCA GGT CT	49.449.632
TCTA Del TATA2 comp SS	AAA AGA CCT GGT TGA AGG GCG AAT TCG A	49.449.630
TCTA Del TATA2 comp SS	TCG AAT TCG CCC TTC AAC CAG GTC TTT T	49.449.630
TCTA Del TATA1/2 SS	GGG AAC TCC GGG GCG ACC TGG TTG CT	49.449.600
TCTA Del TATA1/2 AS	AGC AAC CAG GTC GCC CCG GAG TTC CC	49.449.600
TCTA Del TATA1/2 comp SS	TCA CGG GAA CTC CGT GGT TGA AGG GCG A	49.449.596
TCTA Del TATA1/2 comp AS	TCG CCC TTC AAC CAC GGA GTT CCC GTG A	49.449.596

b) Primer für das Einbringen des -112C Allels

Name	Sequenz 5'-3'	Chromosom 3p21 Position
RhoAmut6 SS	GCA ACC AGG TCT TTT GTA GCC CCG GAG TTC C	49.449.631
RhoAmut8 SS	GTG ACT CCG GGA GTA CAA AAT AGC AAC CAG GTC	49.449.653

c) Primer für die Veränderung des TATA-Box Spacings

Name	Sequenz 5'-3'	Chromosom 3p21 Position
TATASpacingI1 SS	GGA GTA TAA AAT AGC AAC CCA GGT CTT TTA TAG CCC CG	49.449.644
TATASpacingI1 AS	CGG GGC TAT AAA AGA CCT GGG TTG CTA TTT TAT ACT CC	49.449.644
TATASpacingI2 SS	GGA GTA TAA AAT AGC AAC AGC AAC CAG GTC TTT TAT AGC CCC G	49.449.644
TATASpacingI2 AS	CGG GGC TAT AAA AGA CCT GGT TGC TGT TGC TAT TTT ATA CTC C	49.449.644
TATASpacingI3 SS	GAG TAT AAA ATA GCA ACA GCA ACC AGG TCA GGT CTT TTA TAG CCC C	49.449.643
TATASpacingI3 AS	GGG GCT ATA AAA GAC CTG ACC TGG TTG CTG TTG CTA TTT TAT ACT C	49.449.643
TATASpacingD4 SS	CGG GAG TAT AAA ATA GCA ACA GGT CTT TTA TAG CCC CG	49.449.646
TATASpacingD4 AS	CGG GGC TAT AAA AGA CCT GTT GCT ATT TTA TAC TCC CG	49.449.646
TATASpacingD5 SS	CTC CGG GAG TAT AAA ATA GCG GTC TTT TAT AGC CCC GGA G	49.449.649
TATASpacingD5 AS	CTC CGG GGC TAT AAA AGA CCG CTA TTT TAT ACT CCC GGA G	49.449.649
TATASpacingD6 SS	CTC CGG GAG TAT AAA ATA TCT TTT ATA GCC CCG GAG	49.449.649
TATASpacingD6 AS	CTC CGG GGC TAT AAA AGA TAT TTT ATA CTC CCG GAG	49.449.649
TCTASpacingI1 SS	CGG GGC TAT AAA AGA CCT GGG TTG CTA TTT TAA AGG GC	49.449.638
TCTASpacingI1 AS	GCC CTT TAA AAT AGC AAC CCA GGT CTT TTA TAG CCC CG	49.449.638
TCTASpacingI2 SS	CGG GGC TAT AAA AGA CCT GGT TGC TGT TGC TAT TTT AAA GGG C	49.449.638
TCTASpacingI2 AS	GCC CTT TAA AAT AGC AAC AGC AAC CAG GTC TTT TAT AGC CCC G	49.449.638
TCTASpacingI3 SS	GGG GCT ATA AAA GAC CTG ACC TGG TTG CTG TTG CTA TTT TAA AGG G	49.449.638
TCTASpacingI3 AS	CCC TTT AAA ATA GCA ACA GCA ACC AGG TCA GGT CTT TTA TAG CCC C	49.449.638
TCTASpacingI4 SS	GGG GCT ATA AAA GAC CTG AAA AAA AAA AAG TTG CTA TTT TAA AGG G	49.449.638
TCTASpacingI4 AS	CCC TTT AAA ATA GCA ACT TTT TTT TTT TCA GGT CTT TTA TAG CCC C	49.449.638
TCTASpacingI5 SS	GGG GCT ATA AAA GAC CTG ACA TAG ATA CAG TTG CTA TTT TAA AGG G	49.449.638
TCTASpacingI5 AS	CCC TTT AAA ATA GCA ACT GTA TCT ATG TCA GGT CTT TTA TAG CCC C	49.449.638
TCTASpacingD4 SS	CGG GGC TAT AAA AGA CCT GTT GCT ATT TTA AAG GGC GA	49.449.638
TCTASpacingD4 AS	TCG CCC TTT AAA ATA GCA ACA GGT CTT TTA TAG CCC CG	49.449.638
TCTASpacingD5 SS	CTC CGG GGC TAT AAA AGA CCG CTA TTT TAA AGG GCG AAT T	49.449.638
TCTASpacingD5 AS	AAT TCG CCC TTT AAA ATA GCG GTC TTT TAT AGC CCC GGA G	49.449.638
TCTASpacingD6 SS	CTC CGG GGC TAT AAA AGA TAT TTT AAA GGG CGA ATT CG	49.449.638
TCTASpacingD6 AS	CGA ATT CGC CCT TTA AAA TAT CTT TTA TAG CCC CGG AG	49.449.638

d) Primer für den Tausch der TATA-Box flankierenden Bereiche

Name	Sequenz 5'-3'	Chromosom 3p21 Position
TAUSCHFlank Prüfer 1 SS (FT3)	CTT AAG GGA TGA GTG CCC GGA GTA GTA TAA AAT AGC AAC CAG	49.449.665
TAUSCHFlank Prüfer 1 AS (FT3)	CTG GTT GCT ATT TTA TAC TAC TCC GGG CAC TCA TCC CTT AAG	49.449.665
TAUSCHFlank Prüfer 2 SS (FT2)	CAG GTC TTT TAT AGC ACT CCG GGT CCC GTG ATG CCC	49.449.626
TAUSCHFlank Prüfer 2 AS (FT2)	GGG CAT CAC GGG ACC CGG AGT GCT ATA AAA GAC CTG	49.449.626
TAUSCHFlank Prüfer 3 SS (FT6)	CTT AAG GGA TGA GTG TGA GGC CCA GTA TAA AAT AGC AAC CAG	49.449.665
TAUSCHFlank Prüfer 3 AS (FT6)	CTG GTT GCT ATT TTA TAC TGG GCC TCA CAC TCA TCC CTT AAG	49.449.665
TAUSCHFlank Prüfer 4 SS (FT5)	CAG GTC TTT TAT AGC GGG CCT CAT CCC GTG ATG CCC	49.449.626
TAUSCHFlank Prüfer 4 AS (FT5)	GGG CAT CAC GGG ATG AGG CCC GCT ATA AAA GAC CTG	49.449.626
TAUSCHFlank1 SS (FT7)	CTT AAG GGA TGA GTG AGC CCC GGA GTA TAA AAT AGC AAC CAG	49.449.665
TAUSCHFlank1 AS (FT7)	CTG GTT GCT ATT TTA TAC TCC GGG GCT CAC TCA TCC CTT AAG	49.449.665
TAUSCHFlank2 SS (FT8)	CAG GTC TTT TAT ACT CCG GGA GTT CCC GTG ATG CCC	49.449.626
TAUSCHFlank2 AS (FT8)	GGG CAT CAC GGG AAC TCC CGG AGT ATA AAA GAC CTG	49.449.626
TAUSCHFlank3 SS (FT12)	CTT AAG GGA TGA GTG AGA GGC CCC GTA TAA AAT AGC AAC CAG	49.449.665
TAUSCHFlank3 AS (FT12)	CTG GTT GCT ATT TTA TAC GGG GCC TCT CAC TCA TCC CTT AAG	49.449.665
TAUSCHFlank4 SS (FT11)	CAG GTC TTT TAT AGA GGG CCT CTT CCC GTG ATG CCC	49.449.626
TAUSCHFlank4 AS (FT11)	GGG CAT CAC GGG AAG AGG CCC TCT ATA AAA GAC CTG	49.449.626

Tabelle 7: Sequenz der Primer für die EMSA-Analysen

Name	Sequenz 5'-3'	Chromosom 3p21 Position
E-RhoAH1 SS	GTG ACT CCG GGA GTA CAA AAT AGC AAC CAG G	49.449.653
E-RhoAH1 AS	CCT GGT TGC TAT TTT GTA CTC CCG GAG TCA C	49.449.653
E-RhoA H2 SS	GTG ACT CCG GGA GTA TAA AAT AGC AAC CAG G	49.449.653
E-RhoA H2 AS	CCT GGT TGC TAT TTT ATA CTC CCG GAG TCA C	49.449.653

Tabelle 8: Sequenz der Primer für die Methylierungsuntersuchungen

Name	Sequenz 5'-3'	Chromosom 3p21 Position
RhoAMeth1 SS	ATG GTG GTA TGA GTT AGG GTA TAA C	49.450.283
RhoAMeth1 AS	GTC CAA ATA AAA CTT CCT ACG AA	49.450.067
RhoAMeth2 SS	GGT GGT ATG AGT TAG GGT ATA ATG T	49.450.281
RhoAMeth2 AS	CAT CCA AAT AAA ACT TCC TAC AAA	49.450.066
TCTAMeth1 SS	TTC GTT TAT TTT AGG TAA CGA ATT C	49.449.244
TCTAMeth1 AS	GAT CTA ATC TTC AAC TAC CCG C	49.449.348
TCTAMeth2 SS	TGT TTA TTT TAG GTA ATG AAT TTG A	49.449.246
TCTAMeth2 AS	ACA ATC TAA TCT TCA ACT ACC CAC C	49.449.350

Tabelle 9: Sequenzierprimer

Name	Sequenz 5'-3'	Position	Accession #
pGL3 SS	AGT GCA AGT GCA GGT GCC AG	90	U47295
pGL3 AS	CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC C	4781	U47295

8.2 Homologievergleich

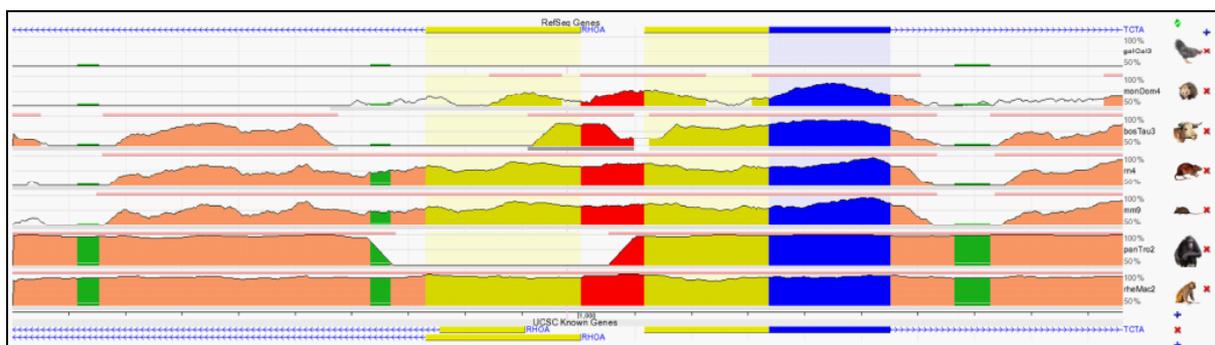


Abb. 8.2: Homologievergleich des *RhoA/TCTA*-Genlocus mit Hilfe des „ECR browsers“ [<http://ecrbrowser.dcode.org/>]. Die divergente Anordnung der Gene *RhoA* und *TCTA* ist evolutionär bis zum Opossum (*Monodelphis domestica*) konserviert. Rot dargestellt sind Promotorbereiche, gelb dargestellt sind 5'- bzw. 3'-regulatorische Regionen. In blau sind Exons, in lachsfarben Introns gekennzeichnet. Die Höhe der farblich markierten Bereiche ist ein Maß für die Homologie. Gezeigt ist die genomische Region um den von *RhoA* und *TCTA* gemeinsam genutzten bidirektionalen Promotorbereich.

8.3 Endogene RhoA und TCTA Expression

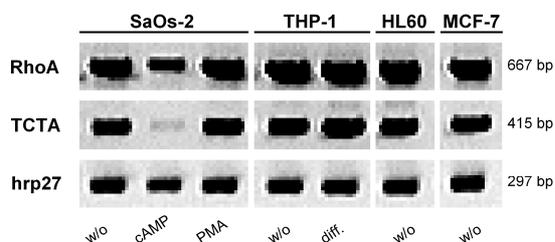


Abb. 8.3: Diagnostische PCR zum Nachweis von RhoA- und TCTA-Transkript. RhoA- und TCTA-mRNA wurde unter allen getesteten Bedingungen gleichmäßig in SaOs-2-, THP-1-, HL60- und MCF-7-Zellen exprimiert. Lediglich TCTA-mRNA wurde in SaOs-2-Zellen unter 8-Br-cAMP-Stimulation [0,5 mM] in deutlich vermindertem Maße gebildet.

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Brand danke ich für die Bereitstellung des spannenden Themas sowie für die Möglichkeit, meine Arbeit auf verschiedenen Kongressen vorstellen zu können. Gleichfalls gilt mein Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. Prüfer für seine Anregungen und Hilfestellungen sowie dem fortdauernden Interesse am Fortschritt meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen lieben KollegInnen aus dem Labor, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mit mir drei Jahre lang Tag ein Tag aus die Höhen und Tiefen (m)eines Doktorandenlebens durchlebt haben. Allen voran danke ich Friederike Bruns. Du warst mir eine wirklich große Stütze und hast mich so manches Mal davor bewahrt, allein im Sturm zu stehen! Auch Christine Fabritius danke ich für die aufbauenden und ermutigenden Worte und das Du nichts anderes als ein „Du schaffst das!“ geduldet hast.

Einen großen Dank aber auch an Karin Tegelkamp, Margit Käse, Claudia Hagedorn, Corinna Dördelmann, Anneke Rübel, Insa Buers, Alois Rötrige, Sandra Hasenkamp und Dr. Ralph Telgmann. Ihr habt mir die Zeit in Münster zu einer wirklich schönen gemacht, an die ich gerne zurückdenken werde! Ganz besonders danke ich Dr. Ralph Telgmann für Rat, Tat und Hilfestellung, die zahlreichen Diskussionen und die schier unerschöpflichen Ideen. (Insbesondere aber auch dafür, dass Du mir meine Schimpftiraden nie übel genommen hast. Danke!)

Mein Dank gilt auch Boris Schmitz, insbesondere für die „harten“ ersten Monate, Mareike Herrmann, Katrin Guske und Andrea Salomon.

Meinen Eltern, meiner Schwester Astrid und Dir, Georg, ein dickes Dankeschön für die jahrelange Unterstützung, die zahlreichen aufbauenden Telefonate und Gespräche und die manchmal wirklich notwendige Motivation. Dies hier ist auch euer Werk!

Publikationen

Dördelmann C, Telgmann R, Brand E, Hagedorn C, Schröer B, Hasenkamp S, Baumgart P, Kleine-Katthöfer P, Paul M, Brand-Herrmann SM. (2008) Functional and structural profiling of the human thrombopoitin gene promoter. *J Biol Chem.* 283, 24382-24391.

Kongressbeiträge

Schröer B, Telgmann RG, Bruns F, Brand E, Brand-Herrmann SM. RhoA und TCTA – ein „back-to-back“ Promotorsystem. 51. Jahrestagung der DGPT, Mainz 23.-25. März 2010. Vortrag.

Schröer B, Telgmann RG, Bruns F, Brand E, Brand-Herrmann SM. RhoA and TCTA – a „back-to-back“ promoter system –. 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim 08.-10. April 2010. Vortrag.

Schröer B, Telgmann R, Bruns F, Brand SM. RhoA and TCTA – a „back-to-back“ promoter system –. 78th European Atherosclerosis Society Congress, Hamburg 20.-23 Juni 2010. Posterpräsentation.

