

Aus der Abt. Molekulare Zellbiologie  
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Komm. Abteilungsleiter Prof. Dr. G. Mayr

**BESTIMMUNG DER mRNA-KOPIENZAHL  
VOM RIBOSOMALEN S6-PROTEIN IN HELA-ZELLEN  
DURCH KOMPETITIVE RT-PCR**

**DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

**vorgelegt von**  
**Amil Haji-Younes**  
**aus Amouda/Syrien**

**Hamburg 2001**

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg:

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. J. Kruppa

Korreferent: Prof. Dr. G. W. Mayr

**Meinen Eltern,  
meiner Frau  
und meinen Kindern**

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	FUNKTIONELLE RNA-SPEZIES IN SÄUGETIEREN .....	1
1.1.1	CYTOPLASMATISCHE mRNA-POPULATIONEN .....	1
1.1.2	STABILITÄT DER MRNAS IM CYTOPLASMA .....	3
1.2	ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON CYTOPLASMATISCHEN RNAS .....	5
1.3	STRATEGIEN ZUR QUANTIFIZIERUNG VON mRNA .....	8
1.3.1	NORTHERN-BLOT .....	8
1.3.2	RIBONUCLEASE-PROTEKTIONSANALYSE .....	9
1.3.3	POLYMERASE-KETTENREAKTION .....	10
1.3.4	RT-PCR .....	10
1.3.5	QUANTITATIVE KOMPETITIVE RT-PCR .....	11
1.3.6	ANWENDUNGEN DER RT-PCR IN DER MEDIZIN .....	13
1.3.7	ANALYSE VON mRNA-POPULATIONEN .....	13
1.4	KONTROLLE DER RIBOSOMALEN PROTEIN-GEN-EXPRESSION .....	14
1.5	DAS HUMANE RIBOSOMALE PROTEIN S6 .....	18
1.6	DAS HUMANE CYCLOPHILIN A .....	20
1.7	PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT .....	22
2	MATERIAL UND METHODEN .....	23
2.1	MATERIALIEN .....	23
2.2	METHODEN .....	29
2.2.1	MOLEKULARBIOLOGIE .....	29
2.2.2	DNA-QUANTIFIZIERUNG .....	29
2.2.3	ANSETZEN VON ÜBERNACHTKULTUREN .....	29
2.2.4	ANLEGEN VON DAUERKULTUREN .....	30
2.2.5	TRANSFORMATION KOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN .....	30
2.2.6	MINI-PRÄPARATION VON PLASMID-DNA .....	31
2.2.7	MIDI-PRÄPARATION VON PLASMID-DNA .....	32
2.2.8	RESTRIKTION VON DNA .....	33
2.2.9	DNA-LIGATION .....	34
2.2.10	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE ZUR TRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN .....	34
2.2.11	ISOLIERUNG VON DNA AUS AGAROSE-GELEN .....	35
2.2.12	DNA-SEQUENZIERUNG .....	36
2.2.13	STANDARD-PCR .....	37
2.2.14	REINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN .....	38
2.2.15	RT-PCR .....	39
2.2.16	IN-VITRO-TRANSKRIPTION DES LINEARISIERTEN PLASMIDS .....	42

2.2.17	ETHANOL-FÄLLUNG DER MRNA .....	42
2.2.18	HYBRIDISIERUNG VON OLIGONUCLEOTIDEN .....	43
2.2.19	REINIGUNG DER KOMPETITOR-RNA .....	43
2.2.20	POLYACRYLAMIDGEL ZUR RNA-TRENNUNG .....	45
2.2.21	SILBERNITRAT-FÄRBUNG .....	45
2.2.22	RNA-QUANTIFIZIERUNG MIT RIBOGREEN .....	46
3	ERGEBNISSE .....	48
3.1	AUSWAHL DER PCR-PRIMER FÜR S6-CDNA .....	48
3.2	DIREKTE KOMPETITIVE RT-PCR IN ZELL-LYSATEN .....	50
3.3	KONSTRUKTION EINES PLASMIDS ZUR EXPRESSION DER KOMPETITOR-RNA .....	52
3.3.1	ISOLIERUNG UND RESTRIKTION DES PLASMID PBLUESCRIPT KS(-) .....	54
3.3.2	LIGATION DES T7-PROMOTORS MIT DEM VERKÜRZTEN KS(-)-VEKTOR .....	59
3.3.3	RESTRIKTION DES PBS II KS(-) T7AMB-PLASMIDS .....	61
3.3.4	PRÄPARATION DES S6-KOMPETITOR-FRAGMENTES .....	62
3.3.5	PRÄPARATION DES KOMPETITOR-PLASMIDS .....	69
3.3.6	LINEARISIERUNG DES KOMPETITOR-PLASMIDS .....	70
3.3.7	IN-VITRO-SYNTHESE DER S6-KOMPETITOR-RNA .....	71
3.3.8	ISOLIERUNG UND REINIGUNG DER KOMPETITOR-RNA .....	73
3.4	QUANTIFIZIERUNG DER IN VITRO TRANSKRIBIERTEN KOMPETITOR-RNA .....	74
3.5	QUANTIFIZIERUNG DER S6-MRNA DURCH KOMPETITIVE RT-PCR .....	75
3.6	SOFTWARE-AUSWERTUNG DER RT-PCR-PRODUKTE .....	77
4	DISKUSSION .....	79
4.1	ZELL-LYSE UNTER HITZE-INAKTIVIERUNG VON RNASEN .....	79
4.2	AUSWAHL DER KONTROLL-MRNA FÜR DIE RT-PCR .....	80
4.3	KONSTRUKTION DES KOMPETITOR-PLASMIDS .....	80
4.4	RNA-KONZENTRATION DES IN VITRO TRANSKRIBIERTEN KOMPETITORS .....	82
4.5	QUANTIFIZIERUNG DER S6-MRNA IN HELA-ZELLEN .....	83
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	86
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	87
7	ANHANG .....	101
8	DANKSAGUNG .....	103
9	LEBENS LAUF .....	104
10	ERKLÄRUNG .....	106

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre DNA
CTP	Cytidintri-phosphat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Essential Minimal Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
FCS	fötale Kälberserum
GTP	Guanosintri-phosphat
h	Stunde
hnRNA	heterogene nucleare RNA
hnRNP	heterogenes nucleares Ribonucleoprotein
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertaini Medium
min	Minuten
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NES	nucleares Exportsignal (nuclear export signal)
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
RNase	Ribonuclease
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rpmRNA	mRNA von ribosomalen Proteinen
rRNA	ribosomale RNA

RT	reverse Transkriptase
S	Svedberg-Einheit
sec	Sekunden
snRNA	kleine nucleare RNA (small nuclear RNA)
snoRNA	kleine nucleolare RNA (small nucleolar RNA)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TOP	terminaler Oligopyrimidin- (Bereich)
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
tRNA	transfer RNA
UV	Ultraviolett
w/v	Gewicht pro Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 Funktionelle RNA-Spezies in Säugetieren

In einer typischen Säugetierzelle sind bezogen auf das Gesamtgewicht etwa 18 % Proteine, 1.1 % RNA, 0.25 % DNA und ungefähr 70 % Wasser enthalten. Anorganische Ionen, kleine Metabolite, Lipide und Polysaccharide, die jeweils 2-3 % ausmachen, bringen das Gesamtgewicht auf 100 % (Alberts, et al., 1995). Die RNA-Transkripte im Cytoplasma sind funktionell als Messenger-RNA (mRNA), Transfer-RNA (tRNA) und ribosomale RNA (rRNA) in Ribosomen an der Proteinbiosynthese beteiligt. Diese RNA-Spezies werden im Zellkern als Vorläuferstufen (Lewin, 1975; Dreyfuss et al., 1993) von der DNA durch drei verschiedene RNA-Polymerasen transkribiert. Zur Reifung und Prozessierung dieser Vorläufer ist der Zellkern mit einer Vielzahl von kleinen, nuclearen und nucleolaren RNAs, den sog snRNAs und snoRNAs ausgestattet (Lodish et al., 2000), die in der Tabelle 1 nicht berücksichtigt wurden.

Eine quantitative Isolierung und Auftrennung der zellularen Gesamt-RNA-Population ergibt folgende Zusammensetzung (Darling und Brickel, 1996):

**Tabelle 1: Verteilung der verschiedenen RNA-Spezies einer Zelle**

<b>Nucleäre mRNA-Vorläufer</b>	<b>6 %</b>
<b>Nucleäre rRNA-Vorläufer</b>	<b>4 %</b>
<b>Nucleäre tRNA-Vorläufer</b>	<b>1 %</b>
<b>Cytoplasmatische rRNA</b>	<b>71 %</b>
<b>Cytoplasmatische tRNA</b>	<b>15 %</b>
<b>Cytoplasmatische mRNA</b>	<b>3 %</b>

*Die Prozentangabe bezieht sich auf den Anteil an der Gesamt-RNA.*

### 1.1.1 Cytoplasmatische mRNA-Populationen



Die RNA-Polymerase II initiiert die RNA-Synthese an verschiedenen Startstellen mit unterschiedlicher Effizienz, so daß einige Gene sehr oft und andere weniger häufig abgelesen werden. Mit Hilfe von Reassoziationsanalysen kann man die Komplexität einer mRNA Population messen (Lewin, 2000). Durch Sättigungsanalysen wird typischerweise ~ 1% der DNA als Matrize für mRNA identifiziert. Kinetische Hybridisierungsanalysen ergeben mehrere mRNA-Komponenten in eukaryotischen Zellen, die unterschiedlich schnell hybridisieren (Hastie und Bishop, 1976). Die Tabelle 2 zeigt die Unterteilung der mRNAs in drei diskrete Häufigkeitsklassen. Diese Einteilung ist etwas willkürlich, da es in vielen Zellen eine kontinuierliche, breitere Verteilung der Häufigkeiten gibt. Normalerweise werden in jeder Zelle 10.000 bis 20.000 unterschiedliche mRNA-Spezies beobachtet, von denen die meisten recht selten (5 bis 15 Moleküle pro Zelle) sind (Alberts et al., 1995).

**Tabelle 2: Zusammensetzung der mRNA-Population in einer typischen Säugetierzelle**

	Kopien jeder mRNA Sequenz pro Zelle - jeder Klasse	Anzahl der verschiedenen mRNA-Sequenzen in jeder Klasse	Gesamtzahl der mRNA-Moleküle
1. Häufigste Klasse	12.000	4	48.000
2. Mittlere Klasse	300	500	150.000
3. Seltene Klasse	15	11.000	165.000

*Der hier behandelte Zelltyp enthält ungefähr 360.000 mRNA-Moleküle im Cytoplasma.*

Spezialisierte Zellen, z.B. im Hühner-Ovidukt, besitzen etwa 100.000 Kopien von Ovalbumin-mRNA in der häufigsten mRNA-Klasse, je 4000 Kopien von 7-8 mRNAs in der mittleren Klasse, aber nur ~ 5 Kopien von jeder der 12.000 mRNA-Spezies in der seltenen, dritten Klasse. Im allgemeinen besteht die häufigste mRNA-Klasse aus wenigen verschiedenen mRNAs, die in bis zu 12.000 Kopien pro Zelle vorkommen. Sie stellen die größte mRNA-Menge einer Zelle und können im Extremfall wie z.B. bei der Ovalbumin-mRNA bis zu 50 % der gesamten mRNA ausmachen (Lewin, 2000).

Viele somatische Gewebe von höheren Eukaryonten exprimieren 10.000 bis 20.000 Gene (Davidson, 1986; Brookfield, 2000; Ewing und Green, 2000; Penninsi, 2000). Wieviel Überlappung gibt es zwischen den exprimierten Genen verschiedener Gewebe? Wie viele

dieser Gene in den Geweben sind identisch? Wieviele sind spezifisch für das entsprechende Gewebe?

Die Anzahl der exprimierten Gene in der Hühnerleber liegt bei ~11.000-17.000 verglichen mit ~13.000-15000 im Ovidukt. Ein Vergleich von verschiedenen Geweben zeigt z.B., daß ~75 % der Sequenzen, die bei den Hühnern in der Leber und im Ovidukt exprimiert werden, identisch sind, d.h. ~12.000 Gene werden in beiden Geweben exprimiert, ~5000 zusätzliche Sequenzen gibt es nur in der Leber und ~3000 zusätzliche Gene werden nur im Ovidukt exprimiert. Die seltene mRNA-Klasse überlappt in diesen beiden Geweben sehr stark. Bei Mäusen sind in der Leber und der Niere etwa 90 % der seltenen mRNA-Klasse identisch, so daß zwischen beiden Geweben nur eine Differenz von 1000-2000 mRNA-Genen besteht. Aus verschiedenen, ähnlichen Vergleichen geht hervor, daß nur ~10 % der mRNA Sequenzen in einer Zelle für diese Zelle einzigartig und spezifisch sind. Die größte Anzahl von Sequenzen ist vielen, vielleicht sogar allen Zelltypen gemeinsam. Dies deutet daraufhin, daß ein gemeinsamer Satz von exprimierten Gen-Funktionen (etwa 10.000 in Säugetieren) existiert, der von allen Zellen benötigt wird. Manchmal werden diese Funktionen als konstitutive bzw. *Housekeeping* Aktivitäten bezeichnet. Im Gegensatz dazu gibt es Aktivitäten, die mit spezialisierten Funktionen (wie z.B. Ovalbumin und Globin) verbunden sind, die nur von bestimmten Zellen benötigt werden. Diese Gene werden als Luxus-Gene bezeichnet (Lewin, 2000).

### 1.1.2 Stabilität der mRNAs im Cytoplasma

Die polysomalen und nichtpolysomalen mRNAs existieren im Cytoplasma als Messenger Ribonucleoprotein Komplexe (mRNP). Die Mehrzahl der Polysomen ist an das Cytoskelett gebunden (Lenk et al., 1977; Howe and Hershey, 1984). Es ist jedoch nicht gezeigt worden, daß diese Bindung für die Translation absolut notwendig ist. Die Lebensdauer, die ein mRNA-Molekül in der Zelle besitzt, beeinflußt die Proteinmenge, die nach seiner Anweisung produziert wird. Sie unterscheidet sich je nach Nucleotidzusammensetzung und Zelltyp beträchtlich. Die Poly(A)-Sequenz spielt eine wichtige Rolle für die mRNA-Stabilität. Wird die Poly(A)-Sequenz enzymatisch entfernt, verliert die Globin-mRNA ihre Translationsfähigkeit in *Xenopus* Oozyten, weil sie sehr rasch abgebaut wird (Huez et al., 1974; Marbaix et al., 1975). Das  $\beta$ -Globin hat in erythroiden Zellen normalerweise eine Lebensdauer von 20 Stunden. Etwa 50 % der mRNAs in Säugetierzellen haben eine Halbwertszeit von ~6 Stunden. Auf der anderen Seite gibt es mRNA-Spezies, wie z.B. die

c-Fos- und c-Myc-mRNAs, die nur Halbwertszeiten von 10-20 Minuten besitzen (Decker und Parker, 1994). Die kurzlebige Fos-spezifische mRNA und andere mRNAs, die sehr früh nach Serumstimulation ruhender Zellen gebildet werden, zeichnen sich durch Adenin- und Uracil-reiche Sequenzen in ihrem 3'-Nichtcodierungsbereich aus (Sachs, 1993; Ross, 1996). Auffällig ist das Vorkommen eines AUUUA-Sequenzmotivs, das als Destabilisierungselement aufgefaßt werden kann.

Diese unterschiedlichen Halbwertszeiten werden zum Teil von den Nucleotidsequenzen in der mRNA festgelegt; meistens ist dafür der Bereich der mRNA zwischen dem 3'-Ende und dem Poly(A)-Schwanz, die sog. 3'-nichttranslatierte Region verantwortlich. Die Abbaurrate von mRNA ist ein wichtiger Prozeß zur Regulation der genetischen Aktivität. Die zugrunde liegenden Mechanismen werden erst in jüngster Zeit intensiv erforscht (Tollervey und Caceres, 2000; Mitchell und Tollervey, 2000).

**c-Fos:** GUUUUUA**AUUUAUUUA**UUAAGAUGGAUUCUCAGAU**AUUUA**UAUUUU

**c-Sis:** UUUCUUUUUAUUUUUUAAAUGUAAA**AUUUA**UJUUAUUUCGU**AUUUAA**

**c-Myc:** UAAUUUUUUUU**AUUUA**AGUACAUUUUGCUUUUUUAAAGUUGAUUUUU

**c-Myb:** AUUUUUUAAAAAAAAAUAUUUU**AUUUA**UUUGUAUUUA

#### **Besonderheiten in der 3'-Nichtcodierungsregion kurzlebiger mRNAs (Knippers, 1995).**

Das Sequenzmotiv **AUUUA** stellt ein Destabilisierungselement dar.

Im allgemeinen werden Proteine mit hohen Syntheseraten, wie etwa das  $\beta$ -Globin, von mRNAs mit langer Lebensdauer translatiert, während solche mit niedriger Syntheserate oder solche, deren Konzentration als Antwort auf ein Signal schnell angepaßt werden muß, von kurzlebigen mRNAs synthetisiert werden. Der Abbau von mRNAs beginnt fast immer mit einer Verkürzung des Poly(A)-Endes, bevor die weitere Degradation erfolgt. Dieser kann vom 3'-Ende, vom 5'-Ende oder von internen Schnittstellen ausgehen, je nach der beteiligten mRNA und nach der Lage der Destabilisierungselemente (Knippers, 1993, Bousquet-Anatolli et al., 2000).

Wird die Proteinsynthese durch Verbindungen wie Cycloheximid blockiert, so kommt es zu einer Beladung der mRNA mit Ribosomen und die mRNA bleibt stabil. Bisher hat man nur in wenigen Fällen RNA-Bindungsproteine, die bei der Regulation der mRNA-Degradation beteiligt sind, nachweisen können. Ein Beispiel für diese Regulation stellt die Expression der mRNA des Transferrin-Rezeptors dar. Die Transferrin-Rezeptor-mRNA ist

bei Eisenmangel stabil, wird aber bei Eisenüberschuß rasch abgebaut (Melefors und Hentze, 1993). Die Regulation wird über 5 hintereinanderliegende RNA-Doppelschleifen in der 3'-Nichtcodierungsregion der Transferrin-Rezeptor-mRNA vermittelt. Diese RNA-Sekundärstruktur wird als eisenempfindliches Element (IRE, iron response element) bezeichnet. Ein IRE-Bindungsprotein bindet an diese Destabilisierungssequenzen und blockiert dadurch den Abbau der Transferrin-Rezeptor-mRNA. Das Ergebnis ist eine Zunahme an mRNA-Molekülen und eine vermehrte Synthese von Transferrin-Rezeptoren. Ein weiteres, bekanntes Beispiel ist die unterschiedliche Stabilität der Histon-mRNAs in verschiedenen Phasen des Zellzyklus (Schümperli, 1988). Die Menge an Histon-mRNA-Molekülen nimmt mit dem Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus um den Faktor 30-50 zu und sinkt rasch nach dem Ende der DNA-Replikation wieder ab. Die Halbwertszeit der Histon-mRNA verlängert sich mit dem Eintritt in die S-Phase von etwa 10 min auf über eine Stunde. Verfügbare Daten weisen daraufhin, daß mit der Beendigung der Replikation eine Ribosomen-gebundene Nuclease aktiviert wird. Dieses Enzym greift das 3'-Ende der mRNA an und leitet einen exonucleolytischen Abbau ein. Es wird angenommen, daß sich überschüssiges Histon an die RNA-Schleife in der 3'-Nichtcodierungsregion bindet und dadurch das Signal für den Abbau auslöst (Schümperli, 1988).

## 1.2 Isolierung und Reinigung von cytoplasmatischen RNAs

In der Nucleinsäureanalytik braucht man als Grundvoraussetzung fast aller experimenteller Ansätze einwandfreie Präparationen von Nucleinsäuren (Lottspeich und Zorbas, 1998). Viele experimentelle Methoden sind zum Scheitern verurteilt, wenn die Ausgangsverbindungen nicht in einem sauberen und kontaminationsfreiem Zustand sind. Als Kontaminationen kommen Nucleasen, Nucleinsäuren anderer Art, Makromoleküle oder Salze, sowie Lösungsmittel, z.B. Ethanol in Betracht (Farrell, 1993; Krieg, 1996). Die Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren muß daher sehr sorgfältig durchgeführt werden.

Ebenso groß wie die Vielfalt der Nucleinsäuren sind deren Extraktionsmethoden aus verschiedenen Organismen. Hochmolekulare hnRNA muss unterschiedlich isoliert und behandelt werden als kleine, einzelsträngige RNA-Moleküle oder zirkulare Plasmide. Auch der Ausgangsorganismus spielt eine große Rolle; Bakterienwände müssen anders aufgeschlossen werden als die Zellwände von Hefen oder die Zellmembranen von Säugetierzellen (Sambrook et al., 1989).

Das Arbeiten mit RNA erfordert eine sehr große Sorgfalt, da RNasen äußerst stabil sind, keine Kofaktoren für ihre Aktivität benötigen und durch Autoklavieren nicht vollständig inaktiviert werden. Zur Isolierung von RNA können daher nur hochreine, autoklavierte Puffer verwendet werden. Vorhandene RNasen können auch durch Behandlung der Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) inaktiviert werden, wobei es zur kovalenten Modifikation von Histidinresten der RNasen kommt. Überschüssiges DEPC muß aus den Lösungen vollständig entfernt werden, da sonst die RNA durch Carboxyethylierung der Adenine und seltener der Guanine modifiziert wird. In vielen Experimenten, die mit RNA durchgeführt werden, können RNase-Inhibitoren eingesetzt werden, die meistens nur einen Teil der RNasen hemmen können.

Im Gegensatz zur DNA ist der größte Teil der RNA im Cytoplasma lokalisiert. Die cytoplasmatische RNA besteht hauptsächlich aus ribosomaler RNA, Transfer-RNA und zu einem geringen Anteil aus Messenger-RNA (Tabelle 1). Für viele Anwendungen, z.B. Northern-Blot-Analyse (1.3.1), RT-PCR (1.3.4) oder Ribonuclease-Protektionsanalysen (1.3.2), ist die Isolierung von cytoplasmatischer Gesamt-RNA meist ausreichend. Geringe Verunreinigungen mit genomischer DNA können eliminiert werden. So werden z.B. RT-PCR-Kontrollen ohne vorherige DNase-I-Behandlung der RNA durchgeführt. Ist die anschließende PCR positiv, d.h. treten außer der erwarteten cDNA-Bande mehrere zusätzliche DNA-Banden auf, so muß von einer Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA ausgegangen werden. Bei Verwendung von Primern, die über Exon/Intron-Grenzen hinausgehen, kann aus der Größe des PCR-Produktes auf eine DNA-Kontamination zurückgeschlossen werden. Gespleißte mRNAs ergeben kürzere RT-PCR-Produkte als genomische DNA, die Intronsequenzen enthält.

Untersucht man mRNAs, die nur in sehr geringer Konzentration exprimiert werden, muß sehr oft eine Anreicherung der zellularen mRNA-Fraktion durchgeführt werden. Die Isolierung von RNA aus Geweben und kultivierten Zellen erfolgt durch Resuspension in Guanidinium-Isothiocyanat-Puffer (Chomczynski und Sacchi, 1987), wobei die Zellen sofort vollständig denaturiert und die Nucleasen inaktiviert werden (Chirgwin et al., 1979). Eine hohe Konzentration an  $\beta$ -Mercaptoethanol und der Zusatz spezieller Detergenzien im Extraktionspuffer inhibieren die Degradation von RNA während der Extraktion. Fast alle cytoplasmatischen mRNAs besitzen eine lange adeninreiche Region an ihrem 3'-Ende (Lewin, 2000). Diese Poly(A)-Sequenz wird zur Isolierung der mRNA aus cytoplasmatischer RNA ausgenutzt, wobei die RNA-Lösung über eine Oligo-dT-Affinitätssäule aufgetrennt wird (Aviv und Leder, 1972).



### 1.3 Strategien zur Quantifizierung von mRNA

Die molekulare Charakterisierung eines Gens schließt normalerweise die genaue Analyse der zeitlichen und räumlichen Verteilung der Gen-Expression ein. Es gibt eine große Anzahl von Methoden für die Detektion und Bestimmung der Häufigkeit von spezifischen mRNAs in einer Gesamt-RNA- oder Poly(A)-Probe. Im folgenden werden häufig verwendete Techniken beschrieben (Krieg, 1996; Lottspeich und Zorbas, 1998; Martin et al., 1999).

**Tabelle 3: Quantitative Bestimmungsmethoden von mRNAs**

	<b>RPA</b>	<b>Northern Blot</b>	<b>RT-PCR</b>
<b>Relative u. absolute Quantif.</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>
<b>Detektionsgrenze</b>	<b>4000-5000</b>	<b>10.000</b>	<b>1 (theor.)</b>
<b>Probengröße</b>	<b>100 µg</b>	<b>30 µg</b>	<b>nicht kritisch</b>
<b>Detektion</b> <b>multipler</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>
<b>Transkripte</b>			
<b>mRNA-Größenbestimmung</b>	<b>nein</b>	<b>ja</b>	<b>nein</b>
<b>Alternative Spleißvarianten</b>	<b>nein</b>	<b>ja</b>	<b>nein</b>
<b>Toleriert degradierte RNA</b>	<b>ja</b>	<b>nein</b>	<b>ja</b>

#### 1.3.1 Northern-Blot

Die Northern-Blot-Analyse bleibt die Standard-Methode zur Detektion und quantitativen Bestimmung von mRNA-Konzentrationen trotz neuer, sensitiverer Techniken (Krieg, 1996). Der Northern-Blot besitzt mehrere Vorzüge gegenüber den anderen Methoden. Der überzeugendste Vorteil ist, daß es die einfachste Prozedur ist, um die Größe des Transkripts zu bestimmen. Zusätzlich erlaubt er, alternativ gespleißte Transkripte und Mitglieder von Multigen-Familien zu identifizieren. Er kann auch dazu verwendet werden, um die relative Häufigkeit der mRNA mit allen auf dem Blot vorhandenen Proben zu vergleichen (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Beim Northern-Blot werden RNA-Proben zuerst nach ihrer Größe in einem Agarosegel durch Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen getrennt. Die RNA wird dann auf eine Membran transferiert, quervernetzt und mit einer markierten Sonde hybridisiert. Isotopenfreie oder radioaktiv markierte Sonden, die durch Random-Primer, Nick-

Translation oder durch PCR produziert wurden, können verwendet werden (Krieg, 1996). Zusätzlich können Sonden mit nur partieller Homologie benutzt werden (Ausubel et al., 1995; Sambrook et al., 1989).

Neben diesen Vorteilen gibt es jedoch auch gravierende Nachteile. Schon bei geringer Degradation der RNA, werden die Resultate und die Möglichkeit der Quantifizierung einer Expression stark eingeschränkt. Die Nachweis-Empfindlichkeit der Northern-Analyse ist nicht besonders groß. Ein weiterer Nachteil der Methode liegt in der Unmöglichkeit mehrere mRNAs gleichzeitig zu detektieren. In einem solchen Fall ist es dann notwendig, die erste Sonde von dem Blot herunterzuwaschen, bevor mit der zweiten Sonde hybridisiert werden kann. Dieser Prozess ist sehr zeitaufwendig und kann zur Zerstörung bzw. Ablösung der geblotteten mRNA führen (Krieg, 1996).

### **1.3.2 Ribonuclease-Protektionsanalyse**

Die Ribonuclease-Protektionsanalyse (RPA) ist eine extrem sensitive Methode für die Detektion und Quantifizierung von spezifischen RNAs (Krieg, 1996; Lottspeich und Zorbas, 1998). In der RPA wird eine Antisense-Sonde mit einer RNA-Probe hybridisiert. Nach der Hybridisierung werden die einzelsträngigen Bereiche, die nicht hybridisierte Sonde und die überschüssige, nicht hybridisierte RNA mit Nucleasen abgebaut. Die zurückbleibenden, geschützten Fragmente werden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Hybridisierung bei der RPA, die in der Lösung stattfindet, ist effizienter als die Hybridisierung auf Membranen beim Northern-Blot. Man kann in der RPA bis zu 100 µg RNA einsetzen, gegenüber etwa 20 µg bei Northern-Blot-Hybridisierungen. Die RPA ist auch nicht so empfindlich gegenüber der Degradation der RNA-Probe, denn Spaltungen werden nur detektiert, wenn sie zufällig in der Region der Sonde erfolgt sind. Die Sonden sind normalerweise etwa 100 - 400 Basen lang (Krieg, 1996).

Der RPA ist die Methode der Wahl für die gleichzeitige Bestimmung mehrerer RNA-Spezies. Während der Hybridisierung in der Lösung und der anschließenden Analyse sind die individuellen Sonde/Ziel-RNA-Interaktionen vollständig unabhängig voneinander. Die RPA wird auch zur Bestimmung der mRNA-Termini und Intron/Exon-Grenzen benutzt (Krieg, 1996). Mit der RPA erhält man leider keine Information über die Molekülgröße der Transkripte. Ein weiterer Nachteil der RPA ist, daß man RNA-Sonden einsetzen muß. Die



einzelsträngige, Antisense-Sonde muß vollständig homolog zur Ziel-RNA sein, andernfalls kommt es zur Spaltung des Hybrids durch die Nuclease-Behandlung (Ausubel et al., 1995).

### 1.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Kary B. Mullis (1987, 1990) entwickelte die Polymerase-Kettenreaktion, die im Englischen als Polymerase Chain Reaction (PCR) bezeichnet wird. Diese vielfach anwendbare Methode hat die molekularbiologische und medizinische Nucleinsäureanalytik regelrecht revolutioniert (White, 1993; Lottspeich und Zorbas, 1998). Denn dank dieser Methode ist es möglich, geringste Mengen an Nucleinsäure nachzuweisen, die mit anderen Nachweistechiken nicht detektierbar sind. Die PCR ist die sensitivste unter allen anderen Nucleinsäure-Detektionsmethoden, denn sie ist z.B. in der Lage, aus einem einzigen Nucleinsäure-Molekül innerhalb weniger Stunden bis zu  $10^{13}$  identische Kopien zu amplifizieren. Diese rasche Vervielfältigung ist deshalb möglich, weil die Amplifizierung exponentiell verläuft. Die PCR-Technik kann zur Beantwortung vielfältiger Fragestellungen in Molekular- und Zellbiologie eingesetzt werden.

### 1.3.4 RT-PCR

Die RT-PCR ist eine der wichtigsten Methoden zur Quantifizierung von mRNAs und somit ein nicht mehr wegzudenkender Bestandteil diagnostischer und therapeutischer Fragestellungen in der Medizin geworden, z.B. bei der Diagnostik und Therapie-Kontrolle von Virus-Erkrankungen. Die RT-PCR kann sowohl in einem als auch in 2 Reaktionsschritten durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde die Zwei-Schritt-Methode verwendet: im ersten Schritt erfolgt die Reverse Transkription und anschließend die Amplifikation der cDNA durch PCR. Bei der Reversen Transkription wird ein mRNA-Molekül in ein komplementäres DNA-Molekül umgeschrieben. Dies geschieht mit Hilfe einer retroviralen Reversen Transkriptase, die als RNA-abhängige DNA-Polymerase aus mRNA die komplementäre cDNA synthetisiert. Als Reverse-Transkriptase werden u.a. die hitzestabile Tth-Polymerase, aus dem Bakterium *Thermus thermophilus*, die ihr Temperatur-Optimum bei 60-70°C besitzt, die MMLV-RTase aus Moloney-Maus-Leukämie-Virus, deren Temperatur-Optimum bei 37°C liegt und die AMV-RTase aus dem Avian-Myoblastosis-Virus von Vögeln mit einem Temperatur-Optimum von 42°C (Lottspeich und Zorbas, 1998) verwendet.

Es können drei verschiedene Primertypen bei der Reversen Transkription eingesetzt werden (White, 1993):

1. mRNA-spezifische Oligo-dT-Primer mit einer Länge von 12-18 Basen, die spezifisch an die Poly(A)-Sequenz binden;
2. RNA-unspezifische Random-Primer, die aus einem Gemisch von Hexanucleotiden unterschiedlicher Sequenz bestehen und die zufällig an verschiedene RNA-Sequenzen hybridisieren können;
3. Sequenzspezifische Primer, die sowohl im ersten reversen Transkriptionsschritt als auch im PCR-Schritt an dieselbe Stelle der RNA und cDNA binden.

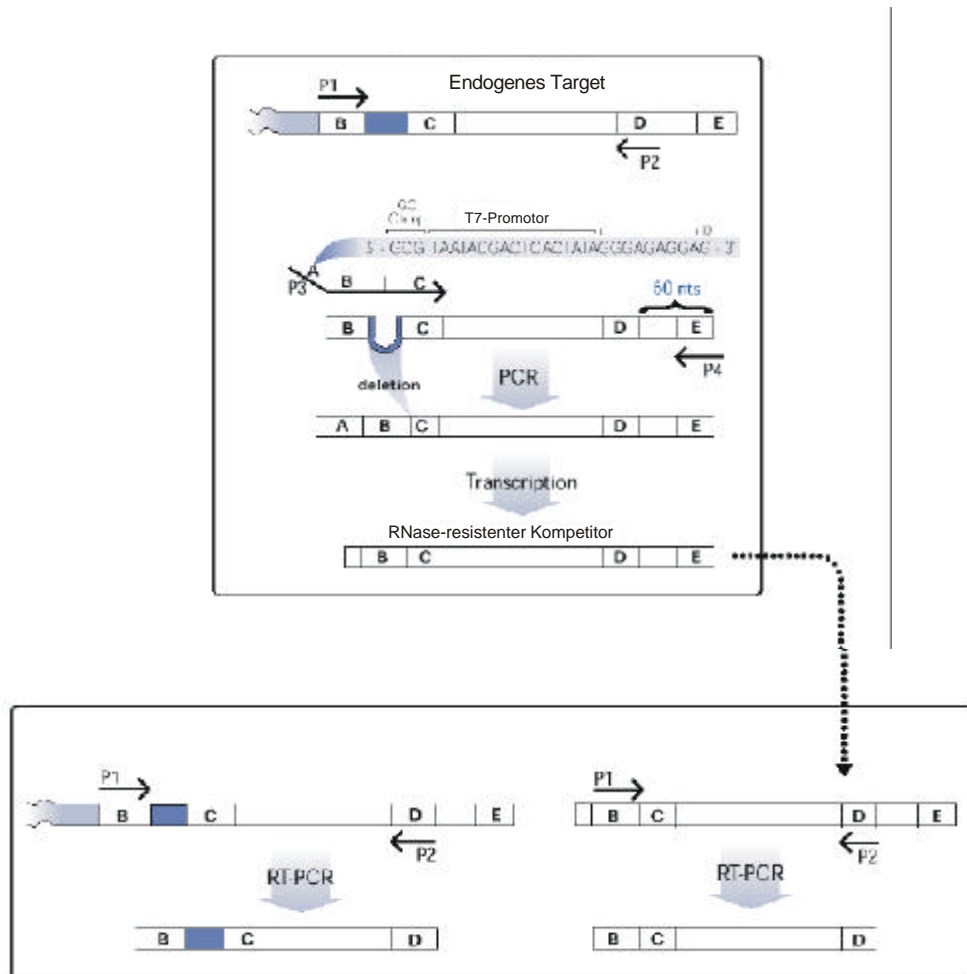
Im nachfolgenden PCR-Schritt wird die komplementäre cDNA mit Hilfe von Taq-DNA-Polymerase, einer temperaturstabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase, in Anwesenheit von sequenzspezifischen Primern effizient amplifiziert. Die exponentiell verlaufende Amplifizierung kann durch verschiedene Faktoren, wie z.B. durch die Gegenwart von Ethanol oder durch eine unterschiedliche Bindungstemperatur der beiden Primer empfindlich gestört und dadurch inhibiert werden. Deshalb müssen die Bedingungen der PCR-Reaktion optimal eingestellt werden, so dass die Prozessivität der Taq-DNA-Polymerase positiv beeinflusst wird, z.B. durch Puffer mit geeignetem pH und mit MgCl<sub>2</sub> (White, 1993; Lottspeich und Zorbas, 1998).

### **1.3.5 Quantitative kompetitive RT-PCR**

Diese Methode eignet sich zur quantitativen Bestimmung von Messenger-RNA. Sie gilt als die empfindlichste Technik. Die Grenzen der Empfindlichkeit, die Genauigkeit und Fehlermöglichkeiten wurden in zahlreichen Publikationen beschrieben (Zimmermann und Mannhalter, 1996; Souazè et al., 1996, Lottspeich und Zorbas, 1998). Die Extraktion und Isolierung der mRNAs, die Konstruktion des Kompetitors, die PCR-Strategie und die Detektion der PCR-Produkte sind wichtige Teilaspekte, die auf die jeweilige Fragestellung angepaßt werden müssen.

Bei der RT-PCR wird eine definierte Anzahl von Kompetitor-RNA-Molekülen dem RT-Ansatz exogen zugegeben und zunächst mit Hilfe von Random- oder Oligo-dT-Primern revers transkribiert. Im anschließenden PCR-Schritt wird die Kompetitor-RNA und die endogene RNA mit denselben Primern amplifiziert. Die exogene Kompetitor-RNA-Sequenz muß der endogenen sehr ähnlich sein. Sie kann sich beispielsweise durch eine Deletion vom endogenen RNA-Molekül unterscheiden. Die Konstruktion eines solchen

Kompetitors sowie die RT-PCR der endogenen RNA-Sequenz und der exogenen Kompetitor-Sequenz ist im folgenden Schema dargestellt.



**Konstruktionskizze:** P1, P2 sind die PCR-Primer für den RT-PCR-Schritt. P3 ist der Deletionsprimer mit der T7-Promotor-Sequenz zur Herstellung eines verkürzten Kompetitors. P4 ist der Primer zur Amplifizierung einer um ca. 50 Nucleotide verlängerten Kompetitor-Zusatzsequenz (verändert nach Ambion).

### **1.3.6 Anwendungen der RT-PCR in der Medizin**

Die Quantifizierung von mRNA mittels RT-PCR (Ferre et al., 1996) ist zu einer sehr wichtigen Technik medizinischer Forschung (Erlinge et al., 1998; Fickova et al., 1999; Iacone et al., 1999) und diagnostischer Fragestellungen geworden (Rolfs et al., 1992; Mensink et al., 1998; Hämäläinen et al., 1999; Death et al., 1999). Dies gilt in besonderem Maß für die Diagnose und Therapiekontrolle von Infektionskrankheiten (Persing et al., 1993; Rolfs et al., 1992). Auch in der Virologie (Menzo et al., 1992) und Oncologie ist man an der quantitativen Bestimmung Tumor-relevanter mRNAs interessiert (Kawasaki et al., 1988; Okamoto et al., 1995). Die Methode eignet sich z.B., um Unterschiede der Expression spezifischer mRNAs während des Zellzyklus zu studieren. Auch der Einfluß von spezifischen chemischen Verbindungen (Sumida et al., 1999) oder Medikamenten (Su et al., 1997) auf die mRNA-Konzentration kann quantitativ verfolgt werden.

### **1.3.7 Analyse von mRNA-Populationen**

Nachdem die Genom-Sequenzen mehrerer Organismen in den letzten Jahren fertig gestellt worden sind, ist das Interesse an der Erfassung der gesamten mRNA-Population ständig gewachsen (Brookfield, 2000; Ewing und Green, 2000; Pennisi, 2000). Unterschiede in der Transkription von Kulturzellen und Geweben können bereits analytisch erfaßt werden. Eine differentielle Gen-Expression beobachtet man in komplexen Prozessen, wie z.B. bei der bakteriellen Sporulation, beim Tumorwachstum und bei der embryonalen Entwicklung. Ein besseres Verständnis dieser Vorgänge erfordert das Studium der zeitlichen und räumlichen Gen-Transkription.

Für diese Aufgabenstellung wurden das Differential-Display-System entwickelt (Martin et al., 1999). In dieser Prozedur werden die RNA-Profile mehrerer Zellpopulationen nach Amplifikation mittels Gelelektrophorese verglichen (Lottspeich und Zorbas, 1998). Banden, die sich in der Intensität unterscheiden, deuten auf eine differentielle Expression hin (Martin et al., 1999). Die Methode gibt jedoch sehr oft falsch positive Banden, die durch irreversible Bindung der kurzen Primer während der PCR-Reaktion erfolgt (Matz et al., 1998). Obwohl die klassische Differential-Display-Methode eine sehr leistungsstarke

Technik darstellt, wird in zunehmendem Maß die DNA-Microchip-Analyse bevorzugt (Matz et al., 1998).

Ein weiteres System, das für die Analyse der Gen-Expression benutzt wird, ist die serielle Analyse der Gen-Expression (SAGE). Diese innovative Methode ermöglicht es, die Intensität und die relative Frequenz der mRNA-Transkripte einer Poly(A)-mRNA-Präparation zu bestimmen (Stollberg et al., 2000).

Die DNA-Mikrochip-Analyse ist ein schneller und einfacher Weg, das Expressionsmuster von tausenden mRNA-Spezies gleichzeitig zu vergleichen, z.B. von normalen und Tumorzellen, behandelten und unbehandelten Kulturzellen und von verschiedenen Entwicklungsstufen eines Organismus oder Gewebes. Bei diesem Analyse-System wird eine Nucleinsäure-Probe markiert und anschließend mit dem Gen-spezifischen Target auf dem DNA-Mikrochip zur Hybridisation gebracht (Lewin, 2000). Die Auswertung des komplexen Hybridisationsmusters erfordert eine spezielle Software (Lewin, 2000).

#### 1.4 Kontrolle der ribosomalen Protein-Gen-Expression

Über die Regulation der Ribosomen-Biosynthese werden viele komplexe Prozesse, die sich während des normalen Wachstums, der Differenzierung, der Entwicklung oder malignen Transformation in Eukaryonten ereignen, beeinflußt. Ribosomen sind essentiell für das Wachstum von Zellen, da sie die Synthese von Proteinen katalysieren (Albert et al., 1995). Eine Hefezelle z.B. besitzt 200.000 Ribosomen, die sie nach einer Generationszeit von ~100 min verdoppeln muß, d.h. es werden 2000 Ribosomen pro min produziert (Warner, 1999).

**Tabelle 4: Ribosomen in Eukaryonten-Zellen**

Untereinheit	RNA	Nucleotide	Proteine
60S	28S rRNA	4718	47
	5.8S rRNA	160	
	5S rRNA	120	
40S	18S rRNA	1874	33

Diese Werte stammen von Ribosomen aus Säugetierzellen (Knippers, 1995). Das Molgewicht der rRNA beträgt 2.2 MDa.

Eukaryontische Ribosomen mit einem nominalen Sedimentationskoeffizienten von 80S besitzen ein Molekulargewicht von etwa 4.22 MDa und setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen. Die große ribosomale 60S-Untereinheit mit einer Masse von 2.82 MDa enthält einen RNA-Anteil von ungefähr 65 %. Die kleine ribosomale 40S-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 1.40 MDa enthält einen RNA-Anteil von etwa 50 %. (Wool et al., 1996). Die Rekonstitution von Ribosomen konnte bei Eukaryonten bisher nicht *in vitro* experimentell durchgeführt werden, dies gelang jedoch bei Prokaryonten (Nomura, 1973). Bei der eukaryontischen Ribosomenbiogenese werden offenbar neben den ribosomalen Proteinen und den rRNAs weitere Faktoren für den Zusammenbau der Untereinheiten, z. B. snoRNAs (Tollervey und Kiss, 1997) benötigt. Die Biogenese der ribosomalen Untereinheiten setzt sich aus folgenden Schritten zusammen (Shaw und Jordan, 1995):

1. Transkription der rRNA-Gene im Nucleolus
2. Prozessierung und Modifizierung der 45S Prä-rRNA im Nucleolus
3. Transkription der 5S rRNA und deren Kernexport
4. Transport der 5S rRNA aus dem Cytoplasma in den Nucleolus
5. Kern-Import der snoRNAs aus dem Cytoplasma
6. Transkription der mRNAs von ribosomalen Proteinen und deren Kernexport
7. Translation ribosomaler Proteine, deren Kernimport und Einbau in die präribosomalen Vorläufer im Nucleolus
8. Export der ribosomalen Untereinheiten in das Cytoplasma.-

Die Biogenese der ribosomalen Untereinheiten im Nucleolus wird durch die Bereitstellung äquimolarer Mengen von ribosomalen Proteinen und rRNAs gewährleistet. Dies wiederum setzt die koordinierte Regulation auf verschiedenen Ebenen der Translation bzw. Transkription und des nuclearen Transports der einzelnen ribosomalen Komponenten voraus (Mager, 1988; Warner, 1989).

Bei vielen physiologischen Bedingungen in Eukaryonten und Prokaryonten ist der vorherrschende Regulationsmechanismus die Kontrolle der ribosomalen Protein-Gen-Expression auf der Translationsebene. Die Änderung in der Translationseffizienz der rpmRNAs erscheint sehr selektiv zu sein. Sie wird coreguliert mit der rRNA-Akkumulation und schließt die Beteiligung der 5' nichttranslatierbaren Region (5' UTR) als cis-regulatorisches Element ein (Meyuhas et al., 1996).

Die Translation von rpmRNAs bei Vertebraten wird hauptsächlich in Abhängigkeit vom Wachstum reguliert. Bei einem Wachstumsstillstand kommt es zu einer Abnahme der rpmRNAs aus Polysomen in den wachsenden Zellen und einer Zunahme von Messenger-Ribonucleotid- (mRNP) Partikeln (subpolysomale Fraktion) in den ruhenden Zellen. Diese spezifische Fluktuation ist nach verschiedenen physiologischen Stimuli (Avni et al., 1994; Shame et al., 1995) und auch beim Übergang von der schnell wachsenden fötalen zur adulten Leber bzw nach Hepatektomie zur regenerierenden Leber (Aloni et al., 1992) beobachtet worden. Im allgemeinen sind etwa 66 % der rpmRNAs und etwa 90% der anderen *Housekeeping*-mRNAs in der Polysomenfraktion. Diese selektive Translationsrepression der rpmRNAs wird in wachstumsarretierten Zellen größer, in denen nur ~26% der rpmRNAs gegenüber 84 % der anderen *Housekeeping*-mRNAs in Polysomen zu finden sind.

Eine selektive Translationsrepression von rpmRNAs wurde während der Differenzierung und Entwicklung in verschiedenen Organismen festgestellt. Die große Menge an mütterlichen rpmRNAs, die während der *Drosophila*-Oogenese produziert wird, um eine schnelle Ribosomensynthese zu ermöglichen, wird in 0-5 h alten Embryos selektiv reprimiert (Kay und Jacobs-Lorena 1985). Während der Embryogenese von *Xenopus laevis* erscheint die neusynthetisierte rpmRNA schon auf der Stufe der Gastrulation; der Start der Synthese ribosomaler Proteine beginnt jedoch erst in einem späteren Stadium (Pierandrei-Amaldi et al., 1982; Baum und Wormington, 1985). Auch bei der Differenzierung von *Dictostelium discoideum* in der Hungerperiode kommt es zu einer selektiven Repression der rpmRNAs (Steel und Jacobson, 1991).

Eine genaue Analyse der rpmRNA-Mengen in Polysomenprofilen von wachsenden und ruhenden Zellen zeigt eine bimodale Verteilung der rpmRNAs, d.h. zwei diskrete mRNA-Populationen: translationsaktive (Polysomen assoziierte) und translationsinaktive (maskiert in RNP-Partikeln). Translationsaktive rpmRNAs sind vollständig mit Ribosomen beladen wie die Abstandsmessung von 31 Codons pro Ribosom in der Polysomenfraktion zeigte (Meyuhas et al., 1990), d.h. die rpmRNAs werden im aktiven Zustand mit maximaler Effizienz translatiert. Wird der Initiationsschritt der Translation blockiert, kommt es zur Repression und einem Anstieg der mRNP-Fraktion (Meyuhas et al., 1996). Ob die Umverteilung der rpmRNAs in die RNP-Partikel mit einer Modifikation verbunden ist, die ihre Translation unmöglich macht, ist eine ungeklärte Frage.

Die Selektivität der Translationskontrolle von rpmRNAs deutet darauf hin, daß sie eine spezifische Eigenschaft besitzen, die von der Translationsmaschinerie und/oder von den Proteinen der RNP-Partikel erkannt wird. Dieses gemeinsame cis-Regulationselement ist eine Sequenz von 4-13 Pyrimidinen in der 5'-terminalen Region der rpmRNAs, die als 5'-terminale Oligopyrimidinsequenz bezeichnet wird (5'-TOP). Dieses Motiv wird auch bei anderen mRNAs gefunden, die mit den rpmRNAs coreguliert werden, z.B. bei den Elongations-faktoren eEF1A und eEF2, sowie bei der Ubiquitin A-mRNA (Meyuhas et al., 1996).

Eukaryontische rRNA-Gene liegen in 100-200 Kopien pro Zellkern vor, die tandemartig in sich wiederholenden Transkriptionseinheiten angeordnet und durch DNA-Spacersequenzen getrennt sind (Long und David, 1980). Die rRNA-Gene befinden sich auf chromosomalen Abschnitten, die als NORs bezeichnet werden und die Basis der strukturellen Organisation des Nucleolus darstellen. Die Transkription der rRNA-Gene erfolgt in den Nucleoli durch die RNA-Polymerase I unter Beteiligung mehrerer Transkriptionsfaktoren. Dabei entsteht als nucleolares Primärtranskript zunächst die 45S Prä-rRNA. Eukaryonten besitzen externe Transkriptionsspacer (ETSS), die die codierenden rRNAs flankieren und zwei interne Transkriptionsspacer (ITSs) zwischen den codierenden rRNA-Sequenzen. Sowohl die ETSS als auch die ITSs werden während der Prozessierung endo- und exonucleolytisch entfernt (Mélèse und Xue, 1995; Shaw und Jordan, 1995; Allmang et al., 2000). In Hefe konnten die beiden Endonucleasen Xrn1 und Rat1 identifiziert werden, die an der Prozessierung der 5.8S rRNA involviert sind (Henry et al., 1994). Durch die Prozessierung des Prä-rRNA Transkripts entstehen die 18S, 5.8S und die 28S (Mammalia) bzw. 25S (Hefe) rRNA (Allmang et al., 1999; Allmang et al., 2000).

Die Gene der 5S rRNA werden im Nucleoplasma durch die RNA Polymerase III transkribiert (Hadjilov, 1985). Anschließend erfolgt der nucleare Export der 5S rRNA als RNP ins Cytoplasma. Nach der Synthese der ribosomalen Proteine assoziiert die 5S rRNA schließlich mit dem ribosomalen Protein L5 zum 5S-RNP und wird in den Zellkern re-importiert. Die nucleolare Akkumulation des 5S RNP initiiert die Bildung der ribosomalen 60S-Untereinheit (Michael und Dreyfuss, 1996; Rudt und Pieler, 1996).

An der Prozessierung und Modifizierung der Prä-rRNA sind snoRNAs beteiligt, die mit nucleolaren Proteinen assoziiert sind und RNPs bilden (Fournier und Maxwell, 1993). In höheren Eukaryonten bildet die U3 snoRNA mit Fibrillarin einen Komplex. Dieser RNP-



Komplex bindet die 5'-Enden der Prä-rRNA und ist für die Entfernung der 5'-ETS verantwortlich (Kass et al., 1990).

In schnell wachsenden Hefe-Zellen sind 50 % der Transkriptionsrate von der RNA-Polymerase II und 90 % der mRNA-Spleißosomen der Produktion ribosomaler Proteine gewidmet (Warner, 1999). Die Gene der ribosomalen Proteine zeigen einen gemeinsamen Aufbau. In der Region des 5'-Endes besitzen sie eine terminale Oligopyrimidin-Sequenz (TOP), die an der Koordination der Translation ribosomaler Proteine beteiligt ist (Meyuhas et al., 1996).

Ribosomale Proteine werden sequenziell auf verschiedenen Stufen der Ribosomenbiogenese addiert. Die ersten Proteine (S3a, S6, S7, S8, S11, S13, S14, S18, S20, S34/24 und S25) lagern sich bereits an die 45S Prä-rRNA an. S3 und S21 werden dagegen erst bei der Bildung der prä-ribosomalen 40S-Untereinheit addiert. S2, S19, S26 und S29 konnten bislang lediglich in der funktionsfähigen cytoplasmatischen 40S-Untereinheit nachgewiesen werden und assoziieren daher vermutlich extranucleolar (Todorov et al., 1983). Nucleolare Proteine (Nopp140, B23 und Nucleolin), die am Transport von NLS-Proteinen in den Zellkern involviert sind, tragen wahrscheinlich entscheidend zur Assoziation ihrer Transportsubstrate mit der rRNA und/oder anderen ribosomalen Proteinen bei (Xue und Mèlèse, 1994).

## 1.5 Das humane ribosomale Protein S6

Die Isolierung und Sequenzierung eines S6-spezifischen cDNA-Klons führten zur vollständigen Aufklärung der Primärstruktur des humanen ribosomalen Proteins S6 (Heinze et al., 1988; Pata et al., 1992). Das Protein besteht aus 249 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 28,7 kDa.

Das funktionelle humane S6-Gen (3,6 kB) setzt sich aus 6 Exons und 5 Introns zusammen und befindet sich auf Chromosom 9 (Pata et al., 1992; Antoine und Fried, 1992). Der 5'-Bereich des S6-Gens zeigt die typischen Merkmale ribosomaler Proteingene von Säugern, wie das Fehlen einer TATA-Box und das Vorhandensein einer CpG-reichen Region (Pata et al., 1992).

Das in der 40S-Untereinheit integrierte ribosomale Protein S6 ist das einzige basische Phosphoprotein in Säuger-Ribosomen (Wool et al., 1996). Als Phosphorylierungsstellen dienen die Aminosäurereste Ser236, Ser235, Ser240, Ser244 und Ser247 (s. Sequenz), wobei die sequentielle Phosphorylierung in der angegebenen Reihenfolge der Serinreste

erfolgt (Jeffries und Thomas, 1996). Eine Reihe verschiedener Faktoren, z.B. Hormone, Mitogene, Wachstumsfaktoren, Serum, Virusinfektionen, Zell-Transformation und Phorbolster stimulieren die S6-Phosphorylierung (Thraugh und Pendergast, 1986). Hypertoner Schock (Kruppa und Clemens, 1984) oder Hitzeschock (Kennedy et al., 1984) führen zur Dephosphorylierung von S6.

Die biologische Bedeutung der S6-Phosphorylierung ist bisher nicht aufgeklärt. Bereits aus frühen Experimenten ging hervor, daß die mitogenstimulierte Phosphorylierung von S6 mit der Bildung von Polysomen und einem Anstieg der Proteinbiosynthese einherging (Duncan und McConkey, 1982; Thomas et al., 1982). Kruppa und Clemens (1984) zeigten, daß der Phosphorylierungsgrad des S6-Proteins weder mit dem Ausmaß der Polysomen-Aggregation noch mit der Proteinsyntheserate eng korreliert ist.

Interessanterweise bildet S6 einen Bestandteil der mRNA-Bindungsstelle innerhalb der ribosomalen 40S-Untereinheit (Wool et al., 1996). Es wird vermutet, daß die S6-Phosphorylierung die Bindungsaffinität der Ribosomen für 5' TOP-haltige mRNAs erhöht und dadurch die Initiation der Translation erleichtert (Meyuhas et al., 1996; Jeffries und Thomas, 1996; Brown und Schreiber, 1996). Tatsächlich kann als Folge einer Insulinbehandlung ruhender Zellen sowohl die Phosphorylierung von S6 als auch eine gesteigerte Translation von mRNAs ribosomaler Proteine beobachtet werden (Meyuhas et al., 1996). Rapamycin, ein hochselektiver Inhibitor der 70-kDa S6-Kinase und der S6-Phosphorylierung, unterdrückt die Translation von 5' TOP-haltigen mRNAs (Price et al., 1992; Jeffries et al., 1994). Dieser Befund spricht für eine regulatorische Funktion der S6-Phosphorylierung bei der Translation.

```

1      MKLNISFPAT GCQKLVVDD ERKLRTFYEK RMATEVAADA LGEEWKGYVW
51     RISGGNDKQG FPMKQGVLTG GRVRLLLSKG HSCYRPRRTG ERKRKSVRGC
101    IVDANLSVLN LVIVKKGEKD IPGLTDTTVP RRLGPKRASR IRKLFNLSKE
151    DDVRQYVVRK PLNKEGKKPR TKAPKIQLV TPRVLQHKRR RIALKKQRTK
201    KNKEEAAEYA KLLAKRMKEA KEKRQEQIAK RRRLSSLRAS TSKSESQK

```

#### **Aminosäuresequenz des humanen ribosomalen Protein S6 (Heinze et al., 1988)**

Die 3 Kernlokalisationssequenzen sind grün und die 5 Phosphorylierungsstellen sind rot dargestellt.

Eine besondere Funktion als Tumorsuppressor nimmt das S6-Protein in der Larvalentwicklung von *Drosophila melanogaster* ein (Watson et al., 1992). Letale Mutationen des

Gens *air8*, welches das *Drosophila* Homologe des humanen S6-Protein codiert, äußern sich phänotypisch in einer Hypertrophie der Lymphdrüsen und einer erhöhten Proliferation hämatopoetischer Zellen.

Das ribosomale Protein S6 wird im Nucleolus bereits an den 45S-rRNA-Vorläufer angelagert (Todorov et al., 1983). Das humane S6 Protein enthält drei Kernsignale (s. Sequenz), mit deren Hilfe das Protein nach seiner cytosolischen Synthese in den Zellkern gelangt (Schmidt, 1992; Schmidt et al, 1995). Für die nachfolgende Akkumulation im Nucleolus konnten bisher zwei nucleolusbindende Domänen identifiziert werden (Kundu-Michalik, 1997; Lipsius 1998).

## 1.6 Das humane Cyclophilin A

Cyclophilin ist ein konstitutiv exprimiertes *Housekeeping*-Gen, das ein in vielen Zellen vorkommendes Protein des endoplasmatischen Retikulums codiert (Haendler und Hofer, 1990; Danielson et al., 1988). Cyclophilin ist eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase. Es spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Faltung von neusynthetisierten Membran- und Sekretionsproteinen im Lumen des ER, indem es die Isomerisierung von Peptid-Bindungen katalysiert. Es bindet außerdem Cyclosporin und vermittelt dadurch die immunsuppressiven Effekte des Medikamentes.

```

1  GTTTTGCAGA CGCCACCGCC GAGGAAAACC GTGTACTATT AGCCATGGTC AACCCCACCG
61  TGTTCCTTCGA CATTGCCGTC GACGGCGAGC CCTTGGGCCG CGTCTCCTTT GAGCTGTTTTG
121 CAGACAAGGT CCCAAAGACA GCAGAAAATT TTCGTGCTCT GAGCACTGGA GAGAAAGGAT
181 TTGGTTATAA GGGTTCCTGC TTCACAGAA TTATTCCAGG GTTTATGTGT CAGGGTGGTG
241 ACTTCACACG CCATAATGGC ACTGGTGGCA AGTCCATCTA TGGGGAGAAA TTTGAAGATG
301 AGAACTTCAT CCTAAAGCAT ACGGGTCCTG GCATCTTGTC CATGGCAAAT GCTGGACCCA
361 ACACAAATGG TTCCCAGTTT TTCATCTGCA CTGCCAAGAC TGAGTGGTTG GATGGCAAGC
421 ATGTGGTGTT TGGCAAAGTG AAAGAAGGCA TGAATATTGT GGAGGCCATG GAGCGCTTTG
481 GGTCCAGGAA TGGCAAGACC AGCAAGAAGA TCACCATTGC TGA CTGTGGA CAACTCGAAT
541 AAGTTTGACT TGTGTTTTAT CTTAACCACC AGATCATTC CTTCTGTAGCT CAGGAGAGCA
601 CCCCTCCACC CCATTTGCTC GCAGTATCCT AGAATCTTTG TGCTCTCGCT GCAGTTCCTT
661 TTGGGTTC CA TGTTCCTT GTTCCCTCC ATGCCTAGCT GGATTGCAGA GTTAAGTTTA
721 TGATTATGAA ATAAAAACTA AATAACAATT GTC

```

DNA-Sequenz des menschlichen Cyclophilins A ( Genbank accessionNr.: XM\_004890)

Die Cyclophilin-mRNA wird in vielen Zellen in hohen Konzentrationen exprimiert. Sie macht etwa 0.1 % der cytoplasmatischen mRNA aus und ist außerdem hoch konserviert. Die Cyclophilin-mRNA wird in großen Mengen in folgenden Rattengeweben exprimiert: Milz, Thymus, Nebennieren, Ovar und Testes. Eine niedrigere Expression findet man in der Rattenleber, Lunge und Hypophyse (Danielson et al., 1988). Cyclophilin-mRNA wird auch in relativ hohen Konzentrationen in vielen Affengeweben mit Ausnahme des Skelettmuskels gefunden.

Einige Tumorzell-Linien zeigen eine höhere Konzentration von Cyclophilin als das entsprechende normale Gewebe (Haendler und Hofer, 1990). Stimulation von T-Lymphocyten mit Mitogenen und Tumorpromotoren führt zu keiner Veränderung der Cyclophilin-Expression (Haendler und Hofer, 1990).

## 1.7 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Säugetierzellen besitzen etwa 20.000 Gene, die in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad und vom Zellzyklus exprimiert werden (Pennisi, 2000). Durch unterschiedliche Spleiß-Varianten der mRNAs ist die Anzahl der entstehenden Proteine höher anzusetzen. Die Proteine werden in den einzelnen Geweben in unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert. Die Höhe der Expression ist für die spezifischen Funktionen differenzierter Zellen von großer Bedeutung. Neben spezifischen Zellproteinen, die in nur einigen Organen anzutreffen sind, gibt es sog. *Housekeeping*-Gene; das sind Gene, die in allen Zellen und Geweben zu jeder Zeit und in gleichem Ausmaß exprimiert werden.

Zu diesen *Housekeeping*-Genen gehören die Gene für die ribosomalen Proteine. Das Hauptziel meiner Arbeit war, die genaue Kopienzahl der mRNA des ribosomalen Proteins S6 in der menschlichen Hela-Zelllinie zu bestimmen.

Zur Lösung dieser Aufgabe mußte zunächst eine Zell-Extraktionsmethode gewählt werden, bei der mRNA-Verluste durch langwierige Manipulationen und zahlreiche Fällungsschritte ausgeschlossen waren. Es sollte ein direkter, schneller Zellaufschluß von Kulturzellen unter gleichzeitiger Inaktivierung von RNasen benutzt werden. Die Reverse Transkription der mRNAs sollte, um Verluste während der mRNA-Isolierung zu vermeiden, direkt mit dem Zellextrakt durchgeführt werden.

Weiterhin mußte ein Expressionsplasmid mit einem speziellen T7-Promotor konstruiert werden von dem die Kompetitor-RNA für die RT-PCR transkribiert werden konnte. Diese Kompetitor-RNA sollte möglichst RNase-resistent sein. Da eine nicht radioaktiv markierte Kompetitor-RNA synthetisiert werden sollte, mußten die geringen Konzentrationen der in vitro Transkripte durch Verwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen quantifiziert werden.

Zur Kontrolle der mRNA-Quantifizierung sollte eine intrazelluläre mRNA-Spezies ausgewählt werden, die zur gleichen Häufigkeit-Klasse gehört wie die mRNA des ribosomalen Proteins S6. Die Auswertung der auf Agarosegelen getrennten RT-PCR-Produkte sollte auf optischem Wege erfolgen. Schließlich sollten die Reaktionsbedingungen für die kompetitive RT-PCR optimiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Difco-Laboratories (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Merck AG (Darmstadt), Pharmacia AG (Freiburg) und Sigma (Deisenhofen) in p.a. oder mikro- bzw. molekularbiologischer Qualität bezogen.

#### Enzyme

Restriktionsendonucleasen, DNA-Polymerasen, DNA-modifizierende Enzyme sowie die entsprechenden Puffer wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs - NEB (Schwalbach), Oncor/Appligene (Heidelberg) und Promega GmbH (Mannheim) bezogen.

#### Oligonucleotide

Als Bezugsquelle für Oligonucleotide diente die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg).

### Biologisches Material

#### Escherichia coli

Der Escherichia coli-Stamm XL1-Blue weist folgenden Genotyp auf: endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, (lac-); F<sup>+</sup>[proAB, lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15, Tn10(tet<sup>R</sup>)].

#### Hela-Zellen

Bei den Hela-Zellen handelt es sich um eine klonierte, menschliche Cervix-Karzinom-Zell-Linie, die seit 1951 in Kultur gehalten wird.

**pBluescript II KS(-) Phagemid**

Das pBluescript II KS(-) Phagemid ist ein 2961 Bp großes Phagemid, das vom pUC19 abstammt. Die KS-Bezeichnung zeigt an, daß der Polylinker so orientiert ist, daß die LacZ Transkription von Kpn I nach Sac I verläuft.

**Geräte**

Sterilwerkbänke:

Bioguard Hood (Baker Company)

HeraSafe (Heraeus)

Zentrifugen:

Biofuge pico (Heraeus)

Minifuge GL (Heraeus)

TJ-6 Zentrifuge (Beckmann)

J-21C Zentrifuge (Beckmann)

Brutschrank:

HeraCell (Heraeus)

Luftschüttler:

G25 Schüttel-Inkubator (New Brunswick Scientific)

Photometer:

UV (Schimadzu)

Fluoreszenz-Spectrophotometer (Perkin Elmer)

Powersupply:

PHERO-stab. 200 (Biotec Fischer)

Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur

GNA-100 (Pharmacia)

UV-Transilluminator:

C61 (UV Products)

Geldokumentationssystem:

UVP Image Store 7500 (UV Products)

Photoimager

PCR-Thermocycler:

Personal Cycler (Biometra)

Heizblock:

Thermomixer comfort (Eppendorf)

Mikroskope:

Diavert (Leitz)

Axiovert 135 (Zeiss)

## **Reagenzien**

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch in der Molekularbiologie wurden nach dem von Sambrook et al. (1989) herausgegebenen Standardwerk *Molecular Cloning* angesetzt. Dabei wurde für sämtliche Lösungen entionisiertes bidestilliertes Wasser verwendet. Sterile Lösungen wurden durch Autoklavieren oder bei Hitzeempfindlichkeit durch Sterilfiltrieren (Satorius Membranfilter, Porengröße 0.2  $\mu\text{m}$ ) hergestellt. Die entsprechenden Versuche wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

### **Agarose-Gellösung**

1.0-2.0 % (w/v) Agarose (Seakem) wurden durch kurzes Aufkochen in 0.5 $\times$  TAE-Puffer gelöst und bei einer Temperatur von etwa 50°C mit 0.5  $\mu\text{g}$  Ethidiumbromid pro ml Agarose-Gellösung versetzt.



**Ampicillin-Standardlösung**

50 mg/ml Ampicillin

sterilfiltrieren

**BSA-Stammlösung**

10 mg/ml BSA

**CB 1-Puffer** (Competency Buffer 1)

100 mM KCl

20 mM KAc

60 mM CaCl<sub>2</sub>

15 % (v/v) Glycerol

pH 5.8 mit HAc einstellen, sterilfiltrieren

**CB 2-Puffer** (Competency Buffer 2)

10 mM KCl

75 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM MOPS

15 % (v/v) Glycerol,

pH 6.8

**6 × DNA-Probenpuffer**

0.25 % (w/v) Bromphenolblau

0.25 % (w/v) Xylencyanol

30 % (v/v) Glycerol

**Dulbecco modifiziertes Minimal Essential Medium (DMEM)**

Das DMEM-Trockenpulver (Seromed) wurde laut Angaben des Herstellers mit Wasser versetzt, mit 1 N NaOH auf pH 7.2 eingestellt und sterilfiltriert.

**dNTP-Mix**

je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP

**DEPC-Wasser:** 0.1 %iges (v/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat) in Wasser geben, 1 Std. bei 37°C inkubieren und anschließend 30 min bei 120°C autoklavieren.

**LB-Agar**

1 % (w/v) Bacto-Trypton

0.5 % (w/v) Hefeextrakt

1.5 % (w/v) Agar

1 % (w/v) NaCl

pH 7.4 mit HCl einstellen, autoklavieren

**LB-Medium**

1 % (w/v) Bacto-Trypton

0.5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) NaCl

pH 7.4 mit HCl einstellen, autoklavieren

**PBS (phosphate buffered saline)**

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7.4 mit HCl einstellen, autoklavieren

**Puffer 2 (+ BSA)= NEB II**

50 mM NaCl

10 mM Tris-HCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM DTT

(+ 0.025 % (w/v) BSA)

pH 7.9

**Tetrazyklin:** 12.5 mg/ml in 70 %igem (v/v) Ethanol

**KAc, pH 4.8:** 3 M Kaliumacetat, mit Essigsäure auf pH 4.8 eingestellt.

**Ethidiumbromid:** 10 mg/ml (Serva)

**PCR-Reaktionspuffer**

50 mM KCl

10 mM Tris-HCl

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

0.1 % Triton X-100

0.02 % (w/v) BSA

pH 9.0

**TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)**

40 mM Tris-Acetat, pH 8.5

1 mM EDTA

**Trypsin-EDTA-Lösung**

0.05 % (w/v) Trypsin

5 mM Na<sub>2</sub>EDTA

PBS, pH 7.4

sterilfiltrieren

**T4-DNA-Ligase-Puffer**

50 mM Tris-HCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM DTT

1 mM ATP

0.025 % (w/v) BSA

pH 7.5

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologie

Gentechnologische Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 wurden unter Beachtung der entsprechenden Sicherheitsvorschriften (Gentechnikgesetz) durchgeführt. Der Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) erfolgte ausschließlich in den dafür ausgewiesenen Räumlichkeiten.

Sofern nicht näher erwähnt, wurde DNA in autoklaviertem, entionisiertem Wasser und nicht in TE-Puffer (EDTA komplexiert zweiwertige Ionen) aufgenommen, um die Aktivität von DNA-modifizierenden Enzymen in Folgereaktionen zu gewährleisten.

### 2.2.2 DNA-Quantifizierung

DNA unbekannter Konzentration wurde photometrisch oder gelelektrophoretisch quantifiziert.

#### Quantifizierung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Referenz: Sambrook. et al. (1989), Ausubel et al. (1995)

#### Durchführung:

Die Konzentration der zu bestimmenden DNA-Probe wurde anhand einer Agarose-Gelelektrophorese mit DNA-Fragmenten (DNA-Molekulargewichtsmarker) bekannter Konzentration ermittelt.

### 2.2.3 Ansetzen von Übernachtskulturen

Referenz: Sambrook et al. (1989)

#### Lösungen:

LB-Medium

Ampicillin-Standardlösung (50 mg/ml)

**Durchführung:**

3 ml LB-Selektivmedium (50 µg/ml Ampicillin) wurden mit einer Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Klones inokuliert und bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden am folgenden Tag für Plasmidminipräparationen oder zum Animpfen großer Kulturansätze (ab 100 ml) verwendet.

**2.2.4 Anlegen von Dauerkulturen**

Referenz: Sambrook et al. (1989)

**Lösungen:**

LB-Medium

Ampicillin-Standardlösung (50 mg/ml)

87 %ige Glycerol-Lösung

**Durchführung:**

3 ml LB-Selektivmedium (50 µg/ml Ampicillin) wurden mit dem entsprechenden Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 500 µl der Bakterienkultur mit 400 µl 87 %iger Glycerol-Lösung versetzt und bei -80°C gelagert.

**2.2.5 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen**

Referenz: Ausubel et al. (1995)

**Lösungen und Materialien:**

kompetente *E. coli*-Zellen (XL1-Blue)

LB-Medium

LB-Agarplatten (50 µg/ml Ampicillin)

**Durchführung:**

Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig resuspendiert. Je 150 µl kompetente Zellen wurden mit 15 µl des entsprechenden Ligationsansatzes (entspricht 200 ng Plasmid-DNA) versetzt, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis

inkubiert. Die Transformationsansätze wurden 90 s bei 42°C und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Je Transformationsansatz wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt und 1 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden für 1 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Selektivagarplatten (50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Die Agarplatten wurden für 16 bis 20 h bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der Transformationskompetenz erfolgte die Transformation sowohl mit ungeschnittener als auch mit restringierter und dephosphorylierter Plasmid-DNA. Als Negativkontrolle dienten kompetente Zellen ohne Plasmid-DNA.

### 2.2.6 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Referenz: Protokoll des *Silica Spin Kits* (Biometra)

#### Lösungen und Materialien:

P1-Puffer (enthält RNase A)

P2-Puffer

P3-Puffer

W1-Puffer

W2-Puffer

Silica Spin Säule

#### Durchführung:

3 ml LB-Selektivmedium (100 µg/ml Ampicillin) wurden mit der entsprechenden plasmidtragenden *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. 2 ml der ÜNK wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und das Zellsediment in 200 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl P2-Puffer wurde das Gefäß mehrfach invertiert. Nachdem die Suspension mit 200 µl P3-Puffer versetzt und das Sediment durch mehrfaches Invertieren verteilt wurde, wurde 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf eine zuvor in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß plazierte *Silica Spin Säule* gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Durchfluß entfernt und die Membran nacheinander mit je 500 µl W1- und W2-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde für jeweils 1 min zentrifugiert und der Durchfluß entfernt. Zur vollständigen Entfernung des W2-Puffers (W2-Puffer enthält Ethanol) wurde erneut zentrifugiert und die *Silica Spin Säule* in ein

neues 1.5 ml Eppendorfgefäß transferiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl auf 50°C vorgewärmtem Wasser durch Zentrifugation von der Säule eluiert und bei -20°C gelagert.

### 2.2.7 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Referenz: Protokoll des *Jet Star 2.0 Kits* (Genomed)

#### Lösungen und Materialien:

E1-Lösung: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0  
10 mM EDTA  
(enthält 100 mg/ml RNase A)

E2-Lösung: 200 mM NaOH  
1.0 % SDS

E3-Lösung: 3.1 M KAc, pH 5.5

E4-Lösung: 600 mM NaCl  
100 mM NaAc, pH 5.0  
0.15 % Triton-X100

E5-Lösung: 800 mM NaCl  
100 mM NaAc, pH 5.0

E6-Lösung: 1250 mM NaCl  
100 mM Tris-HCl, pH 8.5

Jet Star Säule

2-Propanol

70 %iger Ethanol

#### Durchführung:

100 ml LB-Selektivmedium (100 µl/ml Ampicillin) wurden mit der entsprechenden Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gelagert. Danach wurde die Zellsuspension 10 min bei 2.000 rpm und 4°C zentrifugiert, das Zellsediment in 4 ml E1-Lösung resuspendiert und in 15 ml Corex-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml E2-Lösung wurde das Lysat durch vorsichtiges Invertieren bis zur Homogenität gemischt und 5 min bei RT inkubiert.

Anschließend wurden 4 ml E3-Lösung hinzugefügt, das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert und 30 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine zuvor mit 10 ml E4-Lösung equilibrierte *Jet Star Säule* gegeben und zweimal mit je 10 ml E5-Lösung gewaschen. Nachdem die Plasmid-DNA mit 5 ml E6-Lösung eluiert wurde, wurde das Eluat mit 3.5 ml eiskaltem 2-Propanol versetzt, 30 min bei RT inkubiert und 30 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 8 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut 30 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 10 min an der Luft getrocknet, die Plasmid-DNA in 100 µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### 2.2.8 Restriktion von DNA

Referenz: Sambrook et al.(1989), Ausubel et al. (1995),  
Produktbeschreibung von NEB bzw Promega

#### Lösungen und Enzyme:

Restriktionsenzym (Firma)	Puffer (Firma)
Nae I (NEB)	10 × Puffer 1 + BSA (NEB)
Sac I (NEB)	10 × Puffer 1 + BSA (NEB)
BamHI (NEB)	10 × Puffer 2 + BSA (NEB)
EcoRI (NEB)	10 × Puffer 2 + BSA (NEB)

#### Durchführung:

Die zu restringierende DNA wurde mit 2 U des entsprechenden Restriktionsenzym pro µg DNA 4-16 h bei 37°C inkubiert. Um unspezifische DNA-Hydrolysen zu vermeiden, betrug das Volumen der eingesetzten Restriktionsendonucleasen maximal 1/10 des Gesamtvolumens.

Beim Doppelverdau mit Nae I und Sac I wurde die Reaktion in Puffer 1 (+ 100 µg/ml BSA) durchgeführt. Der Doppelverdau mit BamHI und Eco RI erfolgte in Puffer 2, der 50 µg/ml BSA enthielt.



### 2.2.9 DNA-Ligation

Referenz: Sambrook et al. (1989), Ausubel et al. (1995), Produktbeschreibung der Firma „NEB“ mit geringfügiger Modifikation.

#### **Lösungen und Materialien:**

10x T4-DNA-Ligase-Puffer (NEB)

T4-DNA-Ligase, 400.000 U/ml (NEB)

DNA-Vektor

DNA-Insert

#### **Durchführung:**

In einem 20 µl Ligationsansatz-Gesamtvolumen wurde restringierter DNA-Vektor mit einem cDNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1: 50 in T4-DNA-Ligasepuffer auf Eis angesetzt und nach Zugabe von T4-Ligase kurz gemischt, zentrifugiert und bei 16°C im Eppendorf-Heizblock unter Schütteln über Nacht (ca. 16 Std.) inkubiert. Nach der Inkubation kann der Ansatz bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt werden.

### 2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten

Referenz: Sambrook et al. (1989), Ausubel et al. (1995)

#### **Lösungen:**

1× TAE-Puffer

Agarose-Gellösung

6× DNA-Probenpuffer

#### **Molekulargewichtsmarker (s. Anhang):**

MWM III: λ-DNA geschnitten mit *EcoRI* und *HindIII*, 500 ng/µl (Appligene)

100 bp-DNA-Leiter: 500 ng/µl (NEB)

pUC19/Hpa II: 0.5mg/ml (Ambion)

**Durchführung:**

Die Charakterisierung und Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur mit  $5 \times 50 \times 75$  mm bzw.  $5 \times 100 \times 75$  mm 1-2 %igen (w/v) Agarose-Gelen bei Spannungen zwischen 80 und 100 V in  $1\times$  TAE-Puffer. Dazu wurde die zu untersuchende DNA-Probe mit  $6\times$  DNA-Probenpuffer versetzt und das ethidiumbromidhaltige Agarose-Gel mit dieser Probe beladen. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators. Die Größe der einzelnen DNA-Banden konnte durch den Vergleich mit verschiedenen DNA-Molekulargewichtsmarkern (500 ng) abgeschätzt werden. Die Dokumentation der Agarose-Gele erfolgte mittels eines Geldokumentationssystems.

**2.2.11 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen**

Referenz: Protokoll des *QIAquick Gel Extraction Kits* (QIAGEN)

**Lösungen und Materialien:**

QX1-Puffer

PE-Puffer

QIAquick Säule

2-Propanol

**Durchführung:**

Die zu isolierende DNA-Bande wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators lokalisiert und mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten. Zur Bestimmung des Gewichts wurde das extrahierte Gelstück in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß bekannten Leergewichts überführt. Dabei wurde davon ausgegangen, daß das Gewicht in mg etwa dem Volumen in  $\mu$ l entspricht. Anschließend wurde das Gelstück mit dem dreifachen Volumen QX1-Puffer versetzt und 10 min bei  $50^{\circ}\text{C}$  und 500 rpm inkubiert. Nachdem sich das Gelstück vollständig gelöst hatte, wurde bei DNA-Fragmenten, die kleiner als 500 bp und größer als 4 kb waren, die Lösung mit einem Volumen 2-Propanol versetzt. Bei DNA-Fragmenten, die nicht in diesem Bereich lagen, konnte auf die Zugabe von 2-Propanol verzichtet werden.

Die Lösung wurde auf eine in einem 2 ml Mikro-zentrifugengefäß platzierte *QIAquick Säule* gegeben, 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die DNA mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Zur vollständigen Entfernung des PE-Puffers (PE-Puffer enthält Ethanol) wurde erneut 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach der Überführung der *QIAquick Säule* in ein neues 1.5 ml Eppendorfgefäß, wurde die DNA mit 30 µl auf 50°C vorgewärmtem Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm eluiert. Die DNA-Fragmente wurden bei -20°C gelagert.

### 2.2.12 DNA-Sequenzierung

Referenz: Protokoll des *BigDye Terminator Kits* (ABI)

#### Lösungen und Enzyme:

BigDye-Reaktionslösung (ABI)

halfTERM-Puffer (Genpak, Brighton, UK)

#### Durchführung:

50 ng Plasmid-DNA und 15 pmol Sequenzier-Primer wurden mit 2 µl BigDye-Reaktionslösung und 6 µl halfTERM-Puffer versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht.

Die Sequenzierung erfolgte in einem PCR-Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	96°C	10 s	
2	50°C	5 s	
3	60°C	4 min	→ Schritt 1 / 25 Zyklen
4	4°C	∞	

Zur Reinigung der Sequenzierprobe wurde der Reaktionsansatz mit 45 µl absolutem Ethanol versetzt und 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde die DNA 10 bis 20 min an der Luft getrocknet.

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch Mitarbeiter des Servicelabors am Institut für Zellbiologie und klinische Neurobiologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf (UKE) auf einem ABI Prism™377 DNA-Sequencer der Firma Applied Biosystems. Die DNA-Sequenz wurde in Form eines Vier-Farben-Elektropherogramms dokumentiert.

### **2.2.13 Standard-PCR**

Referenz: Ausubel et al. (1995)

Powell (1990)

#### **Lösungen und Enzyme:**

10 × PCR-Puffer (MBI)

2 mM dNTP-Mix (MBI)

Taq-DNA-Polymerase, 5.000 U/ml (Appligene)

#### **Durchführung:**

Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Zu 10 pg Template-DNA wurde folgender Standard-PCR-Mix gegeben:

Standard-PCR-Reaktionsgemisch (Endkonzentrationen sind angegeben)

5'-Primer (sense)	1 µM
3'-Primer (antisense)	1 µM
dNTP-Mix	0.2 mM
10 × PCR-Reaktionspuffer	1x
Taq-DNA-Polymerase	2.5 U

Die PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Thermocycler mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	93°C	3 min	
2	93°C	1 min	
3	44°C	1 min	→ 5 Zyklen 2.-4.
4	72°C	1 min	
5	93°C	1 min	
6	44°C	1 min	→ 5 Zyklen 5.-7. ( $\Delta T = + 3^\circ\text{C}$ pro Zyklus)
7	72°C	1 min	
8	93°C	1 min	
9	64°C	1 min	→ 20 Zyklen 8.-10.
10	72°C	1 min	
11	72°C	5 min	
12	4°C	72 h	

### 2.2.14 Reinigung von PCR-Produkten

Referenz: Protokoll des *QIAquick PCR Purification Kits* (QIAGEN)

#### Lösungen:

PB-Puffer

PE-Puffer

#### Durchführung:

Der PCR-Reaktionsansatz wurde mit 250  $\mu\text{l}$  PB-Puffer versetzt und auf eine in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäß platzierte *QIAquick spin Säule* gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Durchlauf entfernt und die Membran mit 750  $\mu\text{l}$  PE-Puffer gewaschen. Zur vollständigen Entfernung von PE-Pufferresten (PE-Puffer enthält Ethanol) wurde nochmals 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Überführung der *QIAquick spin Säule* in ein neues 1.5 ml Eppendorfgefäß, wurde das PCR-Produkt mit 30  $\mu\text{l}$  auf 50°C vorgewärmtem Wasser eluiert. Die PCR-Produkte wurden bei -20°C gelagert.

## 2.2.15 RT-PCR

Referenz: Protokoll des Cell-to-DNA Kits (Ambion)

### Lösungen und Materialien:

1x PBS (PH 7.4)

Zell-Lyse-Puffer

DNase I, 2 U/ $\mu$ l (RNase-frei)

10x RT-Puffer

MMLV Reverse Transkriptase

RNase-Inhibitor, 10 U/ $\mu$ l

dNTP-Gemisch, 2.5 mM

Random Decamer, 50  $\mu$ M in TE

RNase-freies Wasser

Taq DNA-Polymerase, 5 U/ $\mu$ l

10x PCR-Puffer mit MgCl<sub>2</sub>

Kontroll Primer Paar, jeder Primer 10 mM

96-Lochplatte

### Durchführung:

#### Anzucht der Zellen:

Hela-Zellen wurden in einer 96-Lochplatte ausgesät und am nächsten Tag oder/und in 2 Tagen kontrolliert. Der Zellrasen muß die gesamte Oberfläche der Löcher lückenlos besetzen, da sonst die genaue Zellzahl im betreffenden Loch nicht eindeutig festgelegt ist. Unter diesen Bedingungen entsprach die Zellzahl in einem Loch dann ca. 40.000 Zellen.

#### Zell-Lyse:

Das Medium wurde aus dem ausgewähltem Loch abgesaugt und 2x mit 200  $\mu$ l eis-kaltem und sterilem 1x PBS gewaschen.

100  $\mu$ l vom Zell-Lyse-Puffer wurde auf die Zellen pipettiert, wobei der Puffer die gesamte Zellschicht im Loch bedecken mußten.

Die Zellen wurden bei 75°C für 5 min wie folgt inkubiert: eine Metallplatte wurde in das Wasserbad gelegt, das vorher auf 75°C erwärmt wurde. In der Platte selbst sollte sich eine

geringe Menge an Wasser befinden, damit die Wärmeleitung zur 96-Lochplatte besser erfolgt.

### **DNase I-Behandlung :**

2 µl DNase I wurden zu dem Zell-Lysat zugegeben (1 µl DNase/ 50µl Zell-Lyse-Puffer) und vorsichtig mit der Pipette gemischt und anschließend im Wasserbad bei 37°C für 30-60 min inkubiert.

Zur DNase-Inaktivierung wurde das Lysat dann im Wasserbad bei 75°C für 5 min inkubiert.

Das Zell-Lysat wurde in einen 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt werden.

### **Reverse Transkription:**

Folgende Ansätze wurden zusammengestellt:

	Probe	Minus-RT-Kontr.	Minus-Template Kontr.
Zell-Lysat	5 µl	5 µl	-----
dNTP-Mix	4 µl	4 µl	4 µl
Random-Primer	2 µl	2 µl	2 µl
Kompetitor*	1 µl	-----	-----
H <sub>2</sub> O	4 µl	5 µl	10 µl

Kompetitorzugabe\* in absteigenden Konzentrationen/Kopienzahl

Die Proben wurden kurz gemischt, zentrifugiert und anschließend bei 80°C für 3-4 Minuten im Eppendorf-Heizblock unter Schütteln inkubiert.

Für 1 min wurden die Proben dann auf Eis gestellt, kurz zentrifugiert und die Inkubationsansätze wurden wie folgt vervollständigt:

	Probe	Minus-RT-Kontr.	Minus-Matrize Kontr..
10x RT-Puffer	2 µl	2 µl	2 µl
MMLV-Rtase	1 µl	-----	1 µl
RNase-Inhibitor	1 µl	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O	-----	1 µl	-----

Die Proben wurden kurz gemischt, zentrifugiert und anschließend bei 42°C für ca. 1-2 Stunden im Eppendorf-Heizblock unter Schütteln inkubiert.

Die Proben konnten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt werden.

**PCR-Amplifikation:** Aus der Reversen Transkription wurden 5 µl entnommen und folgende Ansätze wurden zusammengestellt.

Die verwendete Menge des RT-Ansatzes erwies sich als optimal. Die Menge des eingesetzten RT-Ansatzes wurde durch Variation zwischen 1 µl und 10 µl experimentell bestimmt.

	Probe	Minus-RT-Kontr.	Minus-Matrize-Kontr.
RT-Ansatz	5 µl	5 µl	5 µl
10x PCR-Puffer+MgCl <sub>2</sub>	5 µl	5 µl	5 µl
dNTP-Mix	4 µl	4 µl	4 µl
PCR-Primer-1, 20 pm/µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
PCR-Primer-2, 20 pm/µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
H <sub>2</sub> O	30 µl	30 µl	30 µl
Taq-Polymerase	1 µl	1 µl	1 µl

Diese Ansätze wurden mit folgendem Programm im Cycler mit 30 Schritten amplifiziert, so daß die PCR-Reaktion im linearen Bereich lag.

#### PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit
1	94°C	3 min
2 *	94°C	1 min
3 *	56°C	1 min
4 *	72°C	1 min
5	72°C	5 min

\* = ein vollständiger Cyclus, Cyclus-Zahl = 30

#### Analyse der PCR-Produkte:

Die PCR-Produkte wurden auf 1,5-2 %igen Agarose-Gelen analysiert, ein Aliquot von 10-20 µl wird auf das Ethiumbromid-haltige Gel (0.5 µg/ml) geladen.



Die Gelelektrophorese wurde bei 80-100 V ausgeführt bis die DNA-Fragmente eine eindeutige Trennung zeigten.

### **2.2.16 In-Vitro-Transkription des linearisierten Plasmids**

Referenz: Protokoll des RT-PCR Kompetitor-Konstruktions-Kits (Ambion)

#### **Lösungen und Materialien:**

10x Transkriptionspuffer

5x NTP-Mix (2.5 mM GTP, ATP, 2`modifizierte CTP und UTP)

T7-RNA-Polymerase, 20 U/ $\mu$ l

Nuclease-freies Wasser

MnCl<sub>2</sub>, 60 mM

#### **Durchführung:**

Folgender Ansatz wird zusammengestellt:

10x Transkriptionspuffer : 2  $\mu$ l

5x NTP-Mix : 0.5 mM

MnCl<sub>2</sub> : 2 mM

DNA-Template : 0.5-1.5  $\mu$ g

T7-DNA-Polymerase : 40 U

H<sub>2</sub>O : bis zu 20  $\mu$ l Gesamtmenge

Der Reaktionsansatz wurde kurz gemischt und zentrifugiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht (ca. 16 Std.).

### **2.2.17 Ethanol-Fällung der mRNA**

#### **Lösungen und Materialien:**

Elutionspuffer

100 %iges Ethanol

70 %iges Ethanol

**Durchführung:**

40 µl Elutionspuffer und 200 µl 100 %iges Ethanol wurden zu der Transkriptionsreaktion zugegeben, kurz gemischt und zentrifugiert.

Das Gemisch wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 20-60 min inkubiert und anschließend bei RT und bei 13.000 rpm für 15 min zentrifugiert.

Das Pellet wurde mit 200 µl 70 %igem eiskaltem Ethanol gewaschen.

Das Pellet wurde dann mit Hilfe des Vacuum-Trockners (Speed-Vac) nur ganz kurz getrocknet. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**2.2.18 Hybridisierung von Oligonucleotiden**

Referenz: Ausubel et al. (1995)

**Lösungen:**

Primer-1 = 100 pmol/µl

Primer 2 = 100 pmol/µl

**Durchführung:**

Zur Generierung doppelsträngiger DNA durch Hybridisierung komplementärer Oligonucleotide wurden die entsprechenden DNA-Einzelstränge jeweils auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt, in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß vereinigt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 90 µl gebracht. Nach Zugabe von 10 µl Puffer 2 wurde der Reaktionsansatz in einem Heizblock auf  $88^{\circ}\text{C}$  für 10 min erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Die so gebildete doppelsträngige DNA wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**2.2.19 Reinigung der Kompetitor-RNA**

Referenz: Protokoll des RT-PCR Kompetitor-Konstruktions-Kits (Ambion)

**Lösungen und Materialien:**

DNase I, 5 U/µl (RNase-frei)

1x Transkriptionspuffer

Gel-Beladungspuffer II

Elutionspuffer

**Durchführung:**

20 µl 1x Transkriptionspuffer und 2 µl RNase-freie DNase I wurden zu dem mRNA-Pellet (Kompetitor) zugegeben, kurz gemischt, zentrifugiert und anschließend bei 37°C für 1 Std. inkubiert.

Nun wurden 22 µl Gel-Beladungspuffer zu der Probe pipettiert, kurz gemischt, zentrifugiert und 2 min bei 95°C inkubiert.

Das Gemisch wurde dann auf ein frisch vorbereitetes 5 %iges Polyacrylamid-Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung zwischen 250-500 Volt bei einer Temperatur von ca. 50°C durchgeführt und wurde beendet, sobald das blaue Bromphenol den Boden des Geles erreicht hatte.

Der Teil des Geles mit dem Marker und dem Aliquot der Probe wurde abgetrennt, mit Silbernitrat gefärbt und anschließend an den präparativen Teil des Geles angelegt.

Dadurch wurde die Höhe der gesuchten Bande bestimmt, mit dem Skalpell markiert und herausgeschnitten.

**Elution der RNA:**

Das herausgeschnittene Gelstück wurde in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß transferiert, 300 µl Elutionspuffer zugegeben und bei 37°C im Eppendorfheizblock unter leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Dadurch konnte ca. 95 % der Probe eluiert werden.

**Präzipitation der Kompetitor-RNA:**

Das Gel von der Übernachteletion wurde mit einem Spatel aus dem Reaktionsgefäß vorsichtig entfernt. Die Kompetitor-RNA wurde durch Zugabe von 600 µl eiskaltem Ethanol (100 %) bei -80°C für 20-30 min gefällt und anschließend zentrifugiert: 13.000 rpm, Raumtemperatur, 20 min .

Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt und das Pellet mit 200 µl 70 %igem eiskalten Ethanol gewaschen.

Das Pellet wurde nur kurz an der Speed-Vac von EtOH-Resten befreit und in 15 µl RNase-freien Wasser gelöst.

Die Kompetitor-RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.20 Polyacrylamidgel zur RNA-Trennung

Referenz: Sambrook et al., 1989

#### Lösungen und Materialien:

8 M Harnstoff

10x TBE

40 % Acrylamid (Acrylamid: bis Acrylamid= 19:1)

DEPC-Wasser

10 %iges AmmoniumPerSulfat (APS)

TEMED

Laufpuffer 1x TBE

#### Durchführung:

Zur Trennung der Kompetitor-RNA wurde ein 5 %iges Polyacrylamid-Gel hergestellt.

Folgender Ansatz wird zusammengestellt:

Harnstoff : 7,2 g

10x TBE : 1,5 ml

40 % AA : 1,88 ml

DEPC-Wasser bis 15 ml Gesamtmenge

Der Ansatz wurde mit Hilfe des Magnet-Rührers solange gemischt bis sich der Harnstoff vollständig gelöst hat. Nach Zugabe von 120 µl 10 %igem Ammonium-persulfat und 8 µl TEMED muß das Gel sofort gegossen werden.

### 2.2.21 Silbernitrat-Färbung

Referenz: Sambrook et al., 1989 mit Modifikationen

#### Lösungen und Materialien:

Fixier-Lösung: 40 % EtOH, 10 % AcOH

Silbernitrat-Lösung: 0.1 % AgNO<sub>3</sub>

DEPC-Wasser

Entwicklungslösung: 1.5 %ige NaOH plus 0.15 % Formaldehyd

Na-Carbonat-Lösung: 0.75 % NaCO<sub>3</sub>

### **Durchführung:**

Das betreffende Gel wurde zuerst unter leichtem Schütteln in der Fixier-Lösung für 30 min. fixiert und dann zum Färben für weitere 30 min. in die Silbernitrat-Lösung gelegt. Nach der Inkubation wurde die Geloberfläche 2x für ca. 5 Sekunden mit DEPC-Wasser gespült und anschließend in der Entwickler-Lösung für 1-5 min entwickelt. Nach erfolgter Entwicklung wird das Gel in der Na-Carbonat-Lösung für ein paar Minuten unter leichtem Schütteln gewaschen. Das Gel kann dann fotografiert werden.

## **2.2.22 RNA-Quantifizierung mit Ribogreen**

Referenz: Schneeberger et al. (1995), Protokoll der Firma „Molecular Probes“

### **Lösungen und Materialien:**

RiboGreen-RNA-Quantifizierungsreagent

20x TE-Puffer, RNase-frei

Ribosomale RNA-Standard-Lösung (16S und 23S rRNA von E. Coli): 100 µg/ml in TE-Puffer

### **Durchführung:**

Aus der RNA-Standard-Lösung (100 µl/ml) wurde eine Verdünnungsreihe (Doppelwerte) zwischen 0 ng und 100 ng in 500 µl TE erstellt. Die RNA-Proben der Kompetitor-RNA (Doppelwerte) wurden in verschiedener Konzentrationen in 500 µl TE gelöst.

Unmittelbar vor der Fluoreszenzmessung wurde das Ribogreen-RNA-Reagenz 1:2000 verdünnt. Je 500 µl von der Verdünnung wurden zu den RNA-Proben pipettiert. Diese wurden gemischt und für 5 min im Dunkeln inkubiert.

Die Fluoreszenz der Proben wurde mit dem Fluoreszenz-Photometer von Perkin Elmer (Modell 650-40) bei der Excitation von 480 nm und einer Emission von 520 nm gemessen.

Die Konzentration der Kompetitor-RNA wurde anhand der linearen Regression der Standard-Kurve bestimmt (Schneeberger et al., 1995).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswahl der PCR-Primer für S6-cDNA

Der größte Teil der mRNA-Moleküle im Cytoplasma entsteht im Zellkern durch Spleißen aus hnRNA-Vorstufen (Dreyfuss et al, 1993, Lewin, 1975). Um eindeutige RT-PCR-Produkte zu erhalten, müssen die verwendeten Sequenzen der Primerpaare in benachbarten Exons liegen und mindestens ein Intron überspannen.

```

2041 tattcctgga ctgactgata ctacagtgcc tcgccgctg ggccccaaaa gagctagcag
2101 aatccgcaaa cttttcaatc tctctaaaga agatgatgtc cgccagtatg ttgtaagaaa
2161 gcccttaaat aaagaaggta ggagggatta tgcaattagg gcttgcttaa ttttggtaat
2221 ttgtctatca ttttgtgtgc atatcagaag ataaatatgt gcctttggaa ggccttagca
2281 ctattcactt ggagttttta cagaaaaata ttgggggtgg ccagcatacc cagttgggtg
2341 taatccttgc ttattatatc cagtgccttg tagagtgcag taatttcggt gaaaatctgc
2401 ttgtgaatct ttgatgtata cattatccaa aaataacctg actttaaggt cattgctatc
2461 tggtttagga gtcacatggt tgagaattct gggactatta gcaccacaca ctttgtaatt
2521 ttatatcaga tgttctaaat tattaatatt ttttaagaga tgaggtcaca ctggtgcccc
2581 ggctggctct gaacccttga gctcaagtga tgctcccact ttggcttccc aaagtgctgg
2641 gattatgggc gtgagcacca caccagccc aaaattatct tttggcttac aaaagaagtt
2701 gctttaaact tctgtttcat ctgtaggata tggataacaa tagttaagag ttgtgagaat
2761 tagaagttag agaccttact cagaatacta gggagcaggt gctagggatt ttggagcttt
2821 accttttaag aacttttgtc catatagtag acaacatact caccagtgcag gacctcaaat
2881 agcaatatct ctgtggtgaa atttggggat atttatgtta aataaacagc atgtcagtca
2941 aggttgggtt ttcctgacaa aatttgaaag aatttctctg gattttgggt ttcaggactg
3001 gtgtgactta acatacatgg catagatagt atacgtctgt taagtgcagta attacactta
3061 cttgagcaca ggtactgttc aagggtgctga gaatacagta tagacaaatt cctaccctta
3121 tgaagctgat gttgcaaaaa aaaaaaaaaa gcaattgaca aataggtggc agttgcccat
3181 aaccatagcc ctggaaataa tccgtataat acaagcgtgg tctggttgat ggggtatctt
3241 agatggttct tatgtctata gtaggaggct taacatttta gcagaactctg aacatctgag
3301 catttagcct aaggcagtta actccctaca aagtgtccat gaaacaaata catctgaaaa
3361 ggcctatnct ccaatgcaga tctgtaatcc atgagcagtt ttggagtaca gatcagatta
3421 atgaagatac ttaacaaca tcccacctaa tctgatgtta atagttaacg ttaccctga
3481 attggcagga attgtcaaag gaaatagaga tgcaagctta catcaaattt aaaagtatgg
3541 caggatgatt atgtagataa tgtgttaagt ggttttcaca gacaaattaa ctatgcacag
3601 ttatatatta acataatgcc actgtatctt agtaaaactg gaaggtagta aaagttagcc
3661 tggttatctt tcaggacttg gtttccctta tatttttata atatttaacc aatcttctag
3721 atttctgtgg agggggaaaa agcatttttag aatagttctg atttgatttt aaaggcctca
3781 ttataggttt tcatagatgc tgtaagctt acgtttatct ctgatgtttt taaagtagat
3841 gtggattcta acaaaacaaa tattgaaatg attgagtcct ttgaattttt aggtaagaaa
3901 cctaggacca aagcacccaa gattcagcgt cttgttactc cacgtgtcct gcagcacaaa
3961 cggcggcgta ttgctctgaa gaagcagcgt accaagaaaa ataaagaaga ggctgcagaa
4021 tatgctaaac ttttggtcaa gagaatgaag gttagtctaa gatgatttga gggggtggga
4081 ggagttcgac ctggcttttg atttgcgtct ttaaccaga aaggccttaa ctgtttgctg
4141 ttttgttttg tttaggaggc taaggagaag cgccaggaac aaattgcgaa gagacgcaga
4201 ctttcctctc tcgagacttc tacttctaag tctgaatcca gtcagaaata agattttttg
4261 agtaacaaat aaataagatc agactctgat ctctgttgac tttycattgc tgatagaaaa

```

Abb. 1: Teil der S6-Gensequenz mit markierten Primerbereichen

Intron: cagtgc, Exon: **cagtgc**, Primerbereich: **cagtgc**

Die PCR-Primer für die reverse Transkription der cDNAs der menschlichen ribosomalen

Proteine S6 und S3a wurden an Hand der publizierten DNA-Sequenzen (Heinze et al., 1988, Pata et al., 1992; Nolte et al., 1996) festgelegt. Die Primer wurden so gewählt, daß sie jeweils innerhalb verschiedener Exons hybridisieren (Pallansch et al., 1990).

```

3601 atgattgaag ctcacgttga tgtcaagact accgatggtt acttgcttcg tctgttctgt
3661 gttgggtttta ctaaaaaacg caacaatcag atacggaaga cctcttatgc tcagcaccaa
3721 caggctccgcc aaatccggaa gaagatgatg gaaatcatga cccgagaggt gcagacaaat
3781 gacttgaaa aagtgggtcaa taaattgtaa gtgtttcttt gcttcctcac acaacacaac
3841 cttgatgatt ggattattcc tgagatgaga gaacgcataat gagacaaggt aaaggtctgt
3901 ggaaatcctg tctgtgaatc cttctagcta tatctcttta agtgaagag tgtaagtac
3961 tcagtaaata tgattattat tactattatt atttgagtca gactcttgct ctgttgccca
4021 ggctcgagtg cagtattgtg atcctccttg gctcactgta accactgctt cctgggttca
4081 agcagttctt gagcctcagc ctctgagta tctgggaata caggggactg ccaccatacc
4141 cagctaattt ttttaaattt ttagttagaga tggggtttca tcatgttggc caggctggtc
4201 ttgaactcct gacttcaggt gatctgccag tactctgtaa atgataacag tttttctgtg
4261 tttatttatt ttgaatgaag ctgtctcaca gtagatggag ttgaaggaca ggaaatgttt
4321 ttcccctagt tggaaaatac actgaataag ttgagtgggg tgggatgtgc ctggagtccc
4381 agctactcag gaggctgagg tggtaggatt gtttgagccc aggagtgtga ggccagcctg
4441 ggcaatatag ggagaccctg tcccaaaaaa taaaaaatat acgtatatat atatacacac
4501 acaaagaaaa aatacactga atagacaaaa cttttcatga ttaatgatgc acgggaataa
4561 gtgatgaaaa aagtttcggc cccagatgat ggccagtgat aacaacattt ttctgatgtt
4621 cccatgcaat atacagttag ctaagagggg gtaatggaaa aagcataagg cttggactca
4681 gaagactcta ctaactttgc cactagctag ctatgtaatt cagatcatct atcctttaca
4741 tgtgaaaagg aaataatggc ttatcttaac aggaggattt atgcaggtta aatgaggtag
4801 gtgttatgtg taggtttatt ccaaggcttc tctactttta aaggaaatgg cttatcttat
4861 atctgagaac taggactttt agaaaaaaat ttactgttac tggtttgag gattccagac
4921 agcattggaa aagacataga aaaggcttgc caatctattt atcctctcca tgatgtcttc
4981 gttagaaaag taaaaatgct gaagaagccc aagtttgaat gtaagtgaga aatcacatga
5041 ttctgttagg gccaaataca ttgttttgg gtaggaggag agtggtgggg catatcatgg
5101 ccttcttttt cttcctgtca tgcttgcata gtagtgatga ccattatttc aagataact
5161 aacagttttt tggttttttt tttttttttt tttttttttg ccttttagtg ggaaagctca
5221 tggagcttca tgggtgaaggc agtagttctg gaaaagccac tggggacgag acaggtgcta
5281 aagttgaacg agctgatgga tatgaaccac cagtccaaga atctgtttaa agttcagact
5341 tcaaatagtg gcaaaataaaa agtgctattt gtgatgggtt gcttctgaac attctttttt

```

## Abb. 2: Teilsequenz des S3a-Gens mit markierten Primerbereichen

Intron: cagtgac, Exon: **cagtgac**, Primerbereich: **cagtgac**

Die Sequenz des Sense-Primers für S6 liegt innerhalb des vierten Exons und der Antisense-Primer bindet innerhalb des sechsten Exons, wobei zu erwähnen ist, daß die S6-DNA 6 Exons besitzt (Abb. 1). Zwischen den beiden Primersequenzen liegt eine lange Intron-Sequenz, das fünfte Exon und ein kurzes Intron, so daß bei einer nicht ausreichenden DNase-Behandlung des Zell-Lysates ein großes PCR-Produkt von über 2170 Bp entstehen würde, das vom erwarteten, kleineren PCR-Produkt mit 351 Bp deutlich unterschieden werden kann (Abb.1)

Die Nucleotidsequenz des Sense-Primers für das ribosomale Protein S3a liegt ebenfalls im



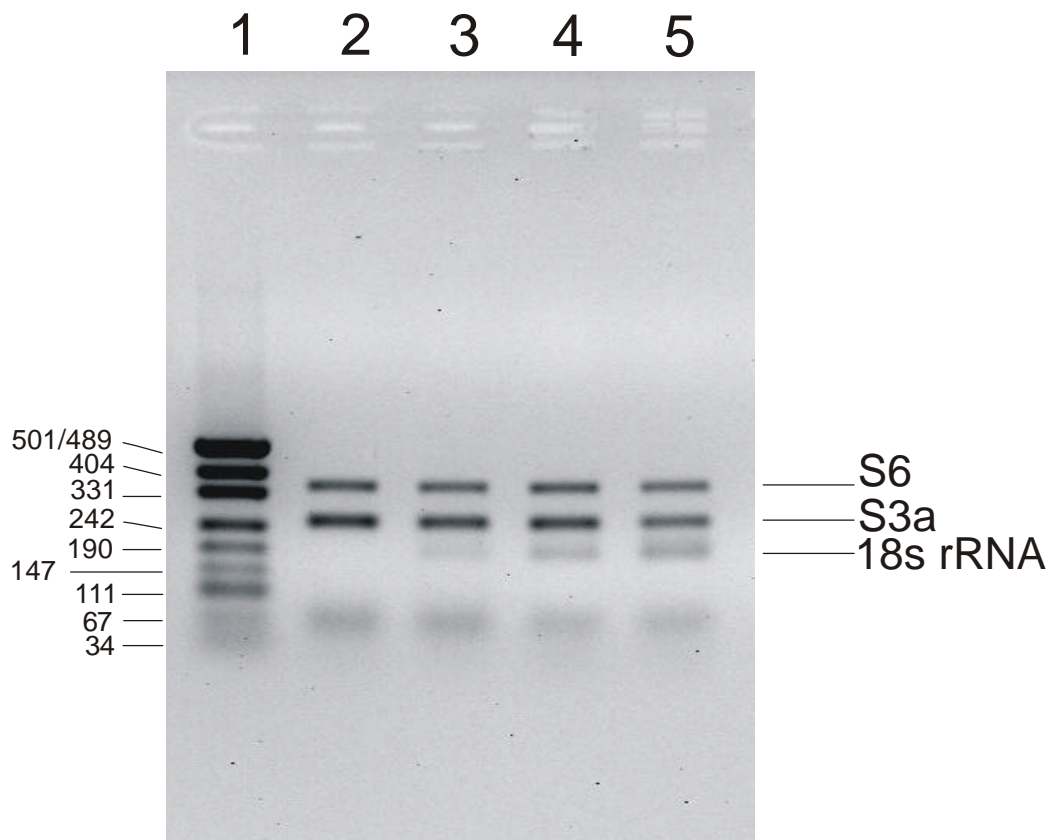
vierten Exon und der Antisense Primer bindet innerhalb des sechsten Exons. S3a besitzt ebenfalls 6 Exons (Nolte et al., 1996). Ein PCR-Produkt vom S3a-Gen würde mit diesen Primern einer Länge von 1546 Bp entsprechen (Abb. 2), während das RT-PCR-Produkt der mRNA ein 251 Bp Polynucleotid ergeben würde.

### **3.2 Direkte kompetitive RT-PCR in Zell-Lysaten**

Die Quantifizierung einer spezifischen mRNA setzt voraus, dass eine effiziente RNA-Extraktionsmethode zur Verfügung steht. Die von mir verwendete Methode verzichtet auf die Isolierung und Reinigung von RNA vor der Reversen Transkription. Statt dessen wird eine kleine definierte Zellzahl lysiert und im Lysat erfolgt ohne vorherige mRNA-Isolierung die direkte cDNA-Synthese, die sowohl mit Random-Primern als auch mit Oligo-dT erfolgreich ist.

Das RT-PCR-System wurde nach dem Protokoll der Hersteller-Firma überprüft. Es wurden 2 Primer-Paare eingesetzt (s. Anhang): das Primer-Paar des ribosomalen Proteins S6 und das des ribosomalen Proteins S3a. Außerdem haben wir für die Überprüfung der Funktionalität der RT-PCR das 18S rRNA-Primer/Kompetimer-System von Ambion verwendet.

Hela-Zellen wurden in einer 96-Lochplatte angezchtet. Die Zellkulturen konnten meistens schon am nächsten Tag für den Versuch benutzt werden, d.h. der Zellrasen bedeckte lückenlos den Boden des betreffenden Loches. Unter diesen Standard-Bedingungen beträgt die Zellzahl ca. 40.000 pro Loch, so dass man die Zellen nicht jedesmal zu zählen brauchte. Die Zellen wurden dann lysiert und mit DNase-I behandelt. Ein Aliquot der Zellen wurde für die Reverse Transkription mit Random-/Oligo-dT-Primer verwendet. Die cDNA wurde mit den ausgewählten S6- und S3a-Primern mittels PCR amplifiziert und die entstandenen DNA-Fragmente wurden mit einem 2 %igen Agarose-Gel analysiert. Die erwarteten RT-PCR-Produkte des S6 (351 Bp), S3a (251 Bp) und 18S rRNA (190 Bp) unterscheiden sich in ihrer Größe und sind deutlich in der Abbildung 3 zu erkennen.



### Abb. 3: Überprüfung des RT-PCR-Systems

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die betreffenden PCR-Primer sind so ausgewählt, dass man aus der S6-mRNA durch RT-PCR ein PCR-Produkt von 351 Bp Größe erhält. Die Länge des S3a-PCR-Produktes beträgt 251 Bp und die des 18S rRNA-Fragmentes 190 Bp.

Spur 1: DNA-Marker pUC19/Hpa II

Spur 2 - 5: obere Bande S6 und untere Bande S3a.

Spur 3- 5: 3. Bande bei 190 Bp entspricht dem 18S rRNA-Fragment; unterschiedliche 18S rRNA/Kompetimer-Konzentrationen.

Die Überprüfung des RT-PCR-Systems ergab, dass die RT-PCR-Produkte von S6 und S3a die erwartete Größe besitzen und keine durch DNA-Kontamination bedingten Zusatzbanden im Agarosegel auftraten. Das System spricht auch auf unterschiedliche 18S rRNA-Primer /Kompetimer Konzentrationen an (Abb. 3).

### 3.3 Konstruktion eines Plasmids zur Expression der Kompetitor-RNA

Durch kompetitive RT-PCR kann man die Kopienzahl spezifischer mRNAs quantitativ bestimmen (Ferre et al., 1996; Lottspeich und Zorbas, 1998). Voraussetzung für die Quantifizierung ist, daß die Kompetitor-RNA möglichst die gleiche Sequenz besitzt wie die zu quantifizierende RNA und daß sie sich durch ihr Molekulargewicht von dem endogenen PCR-Produkt unterscheidet (Souazé et al., 1996; Freeman et al., 1999). Dadurch können beide RNAs, die Kompetitor-RNA und die endogene mRNA mit dem gleichen Primer-Paar amplifiziert werden. Die von mir ausgewählte Kompetitor-Sequenz war um ca. 10 % kleiner als die endogene S6-RNA, da die zwischen den beiden ausgewählten PCR-Primern liegende S6-Sequenz durch Deletion der drei Kernlokalisationssequenzen um 36 Bp verkürzt wurde. Die gewünschte S6-cDNA-Sequenz, die die Kompetitor-Sequenz von 315 Bp enthielt, wurde aus dem Plasmid pEGFP-C1-S6 $\Delta$ I,II,III nach Amplifizierung durch PCR isoliert. Das Plasmid pEGFP-C1-S6 $\Delta$ I,II,III wurde mir von Herrn Dr. E. Lipsius aus unserem Arbeitskreis zur Verfügung gestellt.

Die ausgewählte S6-Kompetitor-Sequenz (s. 3.34) wurde am 3'-Ende um 78 Bp des betreffenden Vektors verlängert. Eine Verlängerung dieser Größenordnung ist notwendig, da dadurch das Konstrukt mit der gleichen Effizienz revers transkribiert werden kann wie die endogene RNA. Es hat sich gezeigt, wenn die Länge der 3'-Sequenz im Kompetitor-Konstrukt weniger als 25 Nucleotide beträgt, daß dann die exogene Kompetitor-RNA im Vergleich zur endogenen mRNA mit geringerer Effizienz revers transkribiert wird.

Aufgrund dieser Konstruktionsbedingungen ist das resultierende Transkriptionsprodukt länger als der in der PCR amplifizierte S6-Sequenzbereich, der zwischen den PCR-Primern liegt und der mit der endogenen S6-mRNA kompetiert.

Die Kompetitor-RNA sollte durch in vitro Transkription hergestellt werden. Deshalb wurde die Kompetitor-Sequenz hinter einen speziellen T7-Promotor inkloniert (s. 3.3.2). Auf Anraten von Ambion (s. Konstruktionsskizze in der Einleitung) wurde ein T7-Promotor mit folgender Sequenz ausgewählt:



Der Überhang und die Tatsache, daß die Verlängerung (blau) der T7-Promotor-Sequenz nur aus den Nucleotiden G und A besteht, tragen dazu bei, die Effizienz der in vitro Transkription bei Verwendung von modifizierten Nucleotiden zu steigern.

Zuerst wurde der T7-Promotor (3.3.2) und danach die verlängerte Kompetitor-Sequenz (3.3.4) in das verkürzte pBluescript KS(-)-Plasmid (3.3.1) inkloniert. Die jeweils entstandenen Konstrukte wurden durch Sequenzanalyse der entsprechenden rekombinanten Plasmide überprüft.

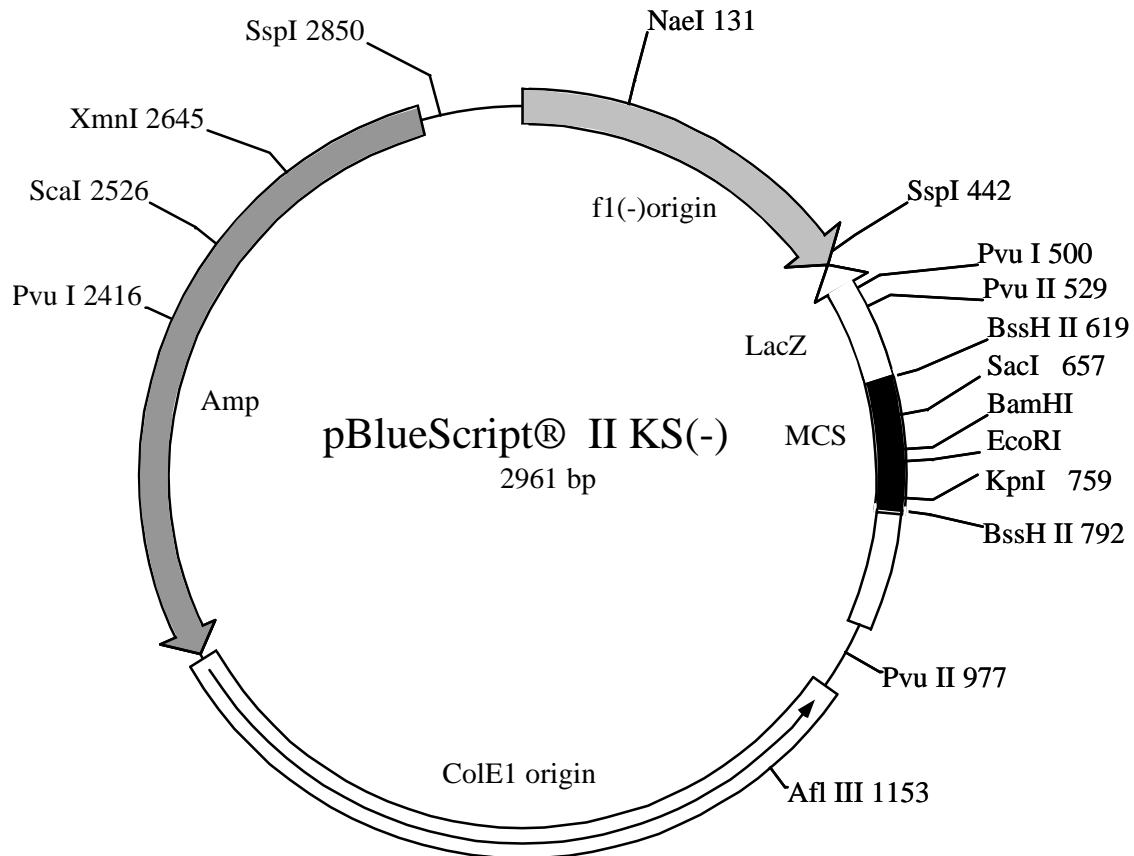
Zur Vorbereitung der Transkription mit der T7-Polymerase wurde das Plasmid mit Eco RI linearisiert (3.3.6) und die verlängerte Kompetitor-RNA (3.3.7) unter Verwendung von modifizierten Nucleotiden synthetisiert.

Die verlängerte Kompetitor-RNA wurde von den überschüssigen freien Nucleotiden und den kürzeren Transkriptionsprodukten durch Gelelektrophorese (3.3.8) gereinigt. Die Ausbeute (3.4) mußte quantitativ bestimmt werden, denn nur definierte Mengen des exogenen Transkripts können dann in den RT-PCR-Versuchen (3.5) als Kompetitor-RNA eingesetzt werden.

Im folgenden wird das experimentelle Vorgehen schrittweise dargestellt.

### 3.3.1 Isolierung und Restriktion des Plasmid pBluescript KS(-)

Als geeigneten Vektor haben wir das Plasmid pBluescript KS(-) verwendet (Abb. 4). Das Plasmid hat eine Größe von 2961 Bp, eine Nae I-Schnittstelle bei 131 und eine Sac I Schnittstelle in der MCS bei 657.

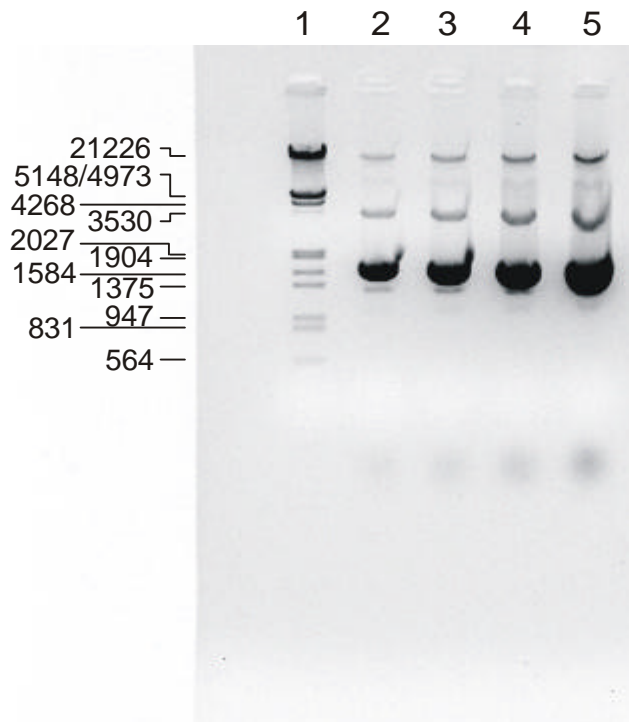


**Abb. 4: Genkarte des Plasmids pBluescript KS(-)**

Die KS(-)-Plasmid-transformierten E. coli-Zellen des Stammes XL1-Blue wurden angezüchtet und am nächsten Tag wurde das Plasmid isoliert. Ein Aliquot des erhaltenen Plasmids wurde auf ein 1 %iges Agarosegel geladen und analysiert (Abb. 5).

Man erkennt 4 DNA-Banden in Abb. 5, die verschiedene Konformationen, sog. Topoisomeren des Plasmids darstellen. Das zirkulare, doppelsträngige Plasmid in der superhelikalen Konformation wandert, da es sehr kompakt ist, am schnellsten. Dies entspricht der intensivsten Bande im Gel. Die entspannte Ringform des Plasmids, die durch Spaltung einer Phosphodiesterbindung entsteht, wandert langsamer (mittlere Bande), da sie

nicht so kompakt ist wie die superhelikale Konformation und sich nicht so leicht durch die Gelmatrix bewegen kann, wie ein lineares Molekül, das durch Linearisierung des Plasmids entstehen würde. Bei der obersten Bande handelt es sich sehr wahrscheinlich um Catenane. Bei der vor der superhelikalen Plasmid-DNA sichtbaren sehr schwachen Bande, scheint es sich um eine Verunreinigung zu handeln. Das linearisierte Plasmid wandert unter den Versuchsbedingungen zwischen der superhelikalen und der entspannten Ringform (Abb. 6).



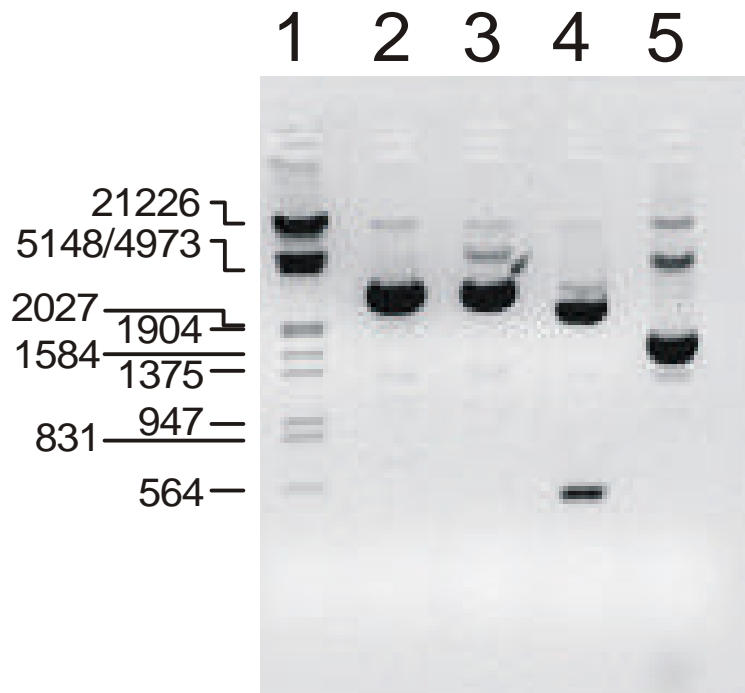
**Abb. 5 : Agarosegel des isolierten Plasmids pBluescript KS (-)**

Das isolierte Plasmid wurde in ansteigenden Konzentrationen auf das 1 %ige Agarose-Gel geladen, um die Ausbeute quantitativ zu bestimmen.

Spur 1: DNA-Marker III

Spur 2-5: Plasmid-Lösung in ansteigenden Konzentrationen.

Zunächst mußte das Ausgangsplasmid pBluescript KS(-) zweifach restringiert werden, um den vorhandenen, suboptimalen T7-Promotor zu entfernen. Die Pufferbedingungen für die gleichzeitige Inkubation mit den beiden Restriktionsnukleasen Nae I und Sac I wurden zunächst überprüft (Abb. 6). Die Spaltungen wurden mit beiden Enzymen im Puffer NEB I in Gegenwart von BSA durchgeführt. Das analytische Gel (Abb. 6) zeigt, daß beide Enzyme sowohl einzeln (Spuren 2 und 3) als auch gemeinsam im selben Puffer relativ gut das Plasmid geschnitten haben. In Spur 4, wo beide Enzyme zum Restringieren des Plasmides eingesetzt worden sind, sieht man das 526 Bp lange herausgeschnittene Oligonucleotid als unterste Bande.

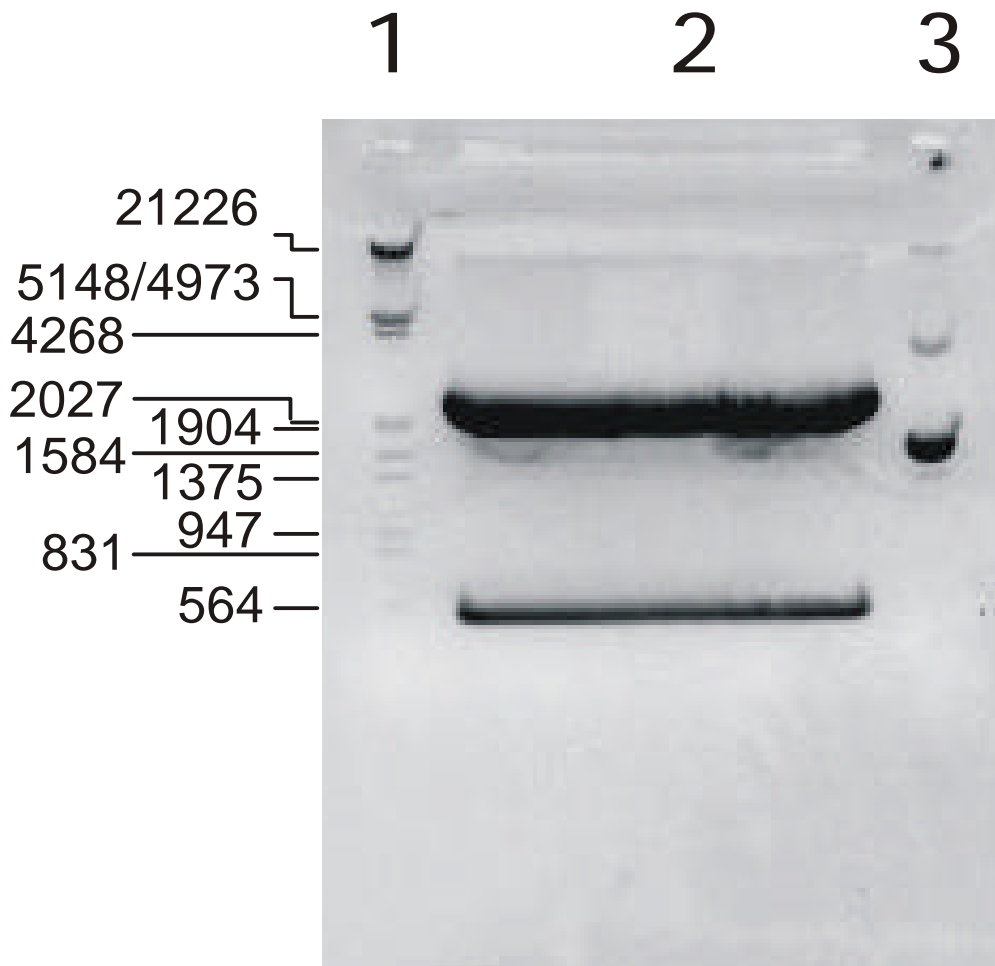


**Abb. 6: Überprüfung der Aktivität der Restriktionsenzyme Nae I und Sac I**

Restriktion von pBluescript KS(-) mit Nae I und Sac I und Auftrennung der Fragmente in einem 1.2 %igen Agarosegel.

Spur 1: DNA-Marker III, Spur 2: Bluescript KS(-)-Plasmid geschnitten mit Sac I, Spur 3: Bluescript KS(-)-Plasmid geschnitten mit Nae I, Spur 4: Bluescript KS(-)-Plasmid geschnitten mit Nae I und Sac I, Spur 5: Bluescript KS(-)-Plasmid ungeschnitten

Präparative Mengen des Plasmids wurden mit den Restriktionsenzymen Nae-I und Sac-I geschnitten und die Fragmente wurden mit Hilfe eines 1.2 %igen Agarosegels aufgetrennt. Das längere Plasmid-Fragment, das für die weitere Klonierung benötigt wurde, wurde durch Gel-Extraktion isoliert (Abb. 7). Die Länge des aus dem Vektor herausgeschnittenen Oligonucleotides betrug 526 Bp. Dies bedeutet, daß der ursprüngliche Bluescript-Vektor auf 2435 Bp verkürzt worden ist.



**Abb.7: Präparative Isolierung des Rest-Plasmids**

Das KS(-)-Plasmid wurde mit Nae I und Sac I restringiert und auf einem präparativen 1.2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die obere Bande stellt das nun 2435 Bp große Rest-Plasmid dar, während die untere Bande dem 526 Bp langen herausgeschnittenen Polynucleotid entspricht.

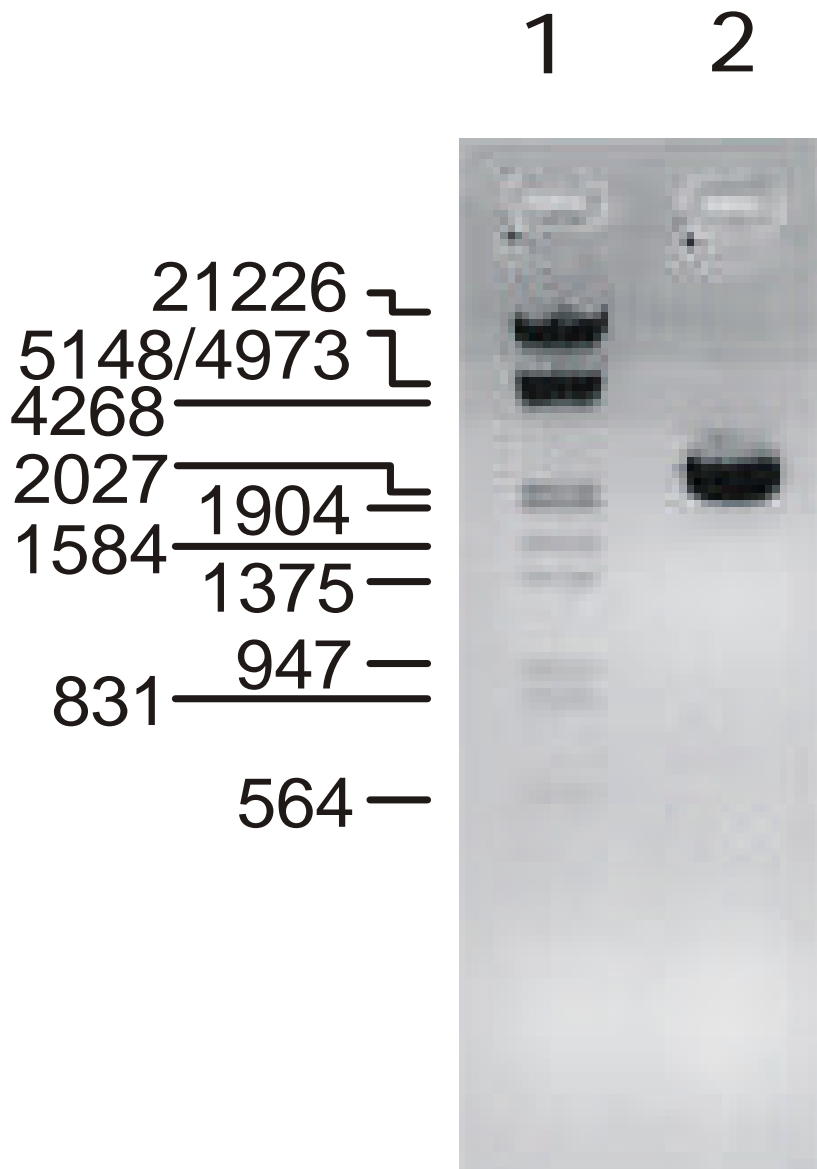
Spur 1: DNA-Marker III

Spur 2: Das restringierte KS(-)-Plasmid

Spur 3: Das ungeschnittene KS(-)-Plasmid



Die Reinheit des verkürzten Plasmids wurde mittels eines 1.2 %igen Agarosegeles überprüft und die Konzentration wurde an Hand der Marker bestimmt.



**Abb. 8: Reinheits- und Konzentrationsbestimmung des Rest-Plasmids**

Das isolierte, verkürzte KS(-)-Plasmid wurde auf ein 1.2 %iges Agarosegel geladen und die Konzentration wurde durch Vergleich mit den Markerbanden abgeschätzt.

Spur 1: DNA-Marker III, Spur 2: Das isolierte Plasmid.

### 3.3.2 Ligation des T7-Promotors mit dem verkürzten KS(-)-Vektor

Die oben beschriebene T7-Promotor-Sequenz und der entsprechende Gegenstrang wurden kommerziell synthetisch hergestellt. Nach Hybridisierung der Oligonucleotide erfolgte die Ligation in den verkürzten Bluescript-Vektor .

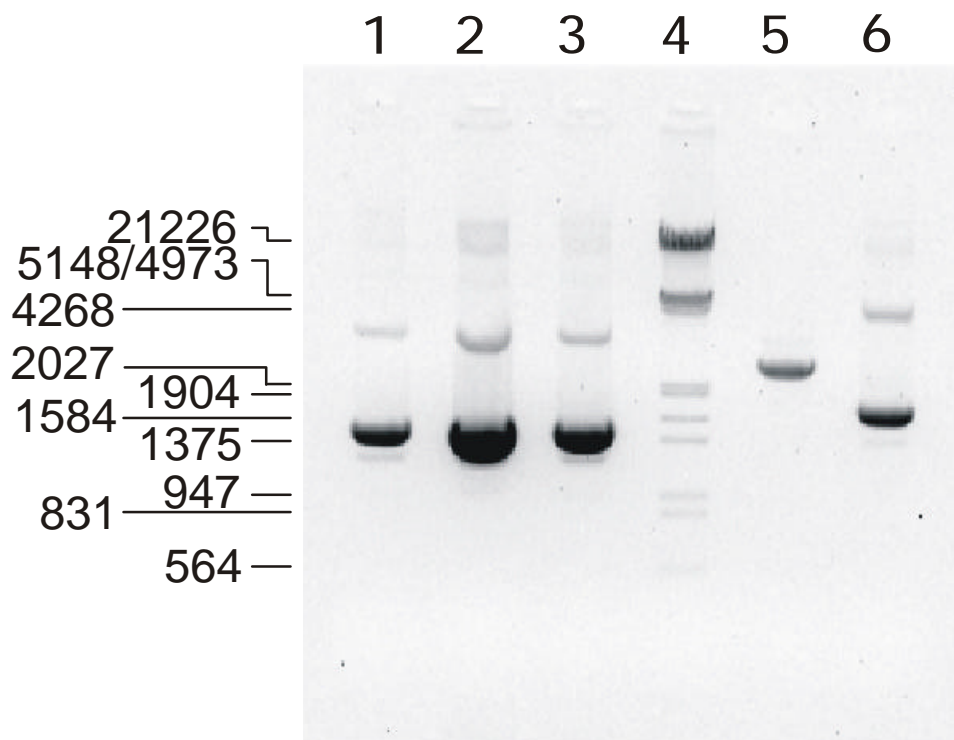
Dazu wurde der T7-Promotor mit dem verkürzten KS(-)-Plasmid in einem molaren Verhältnis von 50 : 1 mittels der T4-DNA-Ligase ligiert und anschließend in den kompetenten E. coli-Stamm XL1-Blue transformiert. Die Transformationseffizienz wurde sowohl mit einer negativen als auch mit einer positiven Kontrolle überprüft. Die transformierten Bakterien wurden auf einer LB-Selektiv-Agarplatte (Ampicillin/Tetrazyklin) ausplattiert.

Am nächsten Tag wurden von mehreren Kolonien Mini-Präparationen angefertigt. Es mußte eine größere Anzahl von Kolonien analysiert werden, da die transformierten Kolonien nicht an Hand der Farbreaktion erkannt werden konnten. Durch die vorgenommene Restriktion war ein Teil des  $\alpha$ -Fragments vom LacZ-Gen aus dem Bluescript-Vektor herausgeschnitten worden, so daß eine  $\alpha$ -Komplementation nicht möglich war.

Die Plasmide von den verschiedenen Kolonien wurden präpariert und mit Hilfe eines 1.2 %igen Agarosegels analysiert. Man konnte 2 Typen von Plasmiden unterscheiden: ein Typ entsprach dem ursprünglichen Wildtyp-KS(-)-Plasmid, der andere Typ repräsentierte das erwartete Ligationsprodukt, denn der Größe nach zu urteilen, enthielt es das verkürzte Bluescript-Plasmid und die T7-Promotorsequenz.

Um diese Annahmen zu bestätigen, wurden die Plasmide der verschiedenen Kolonien mit Nae-I und Sac-I restringiert und auf einem 1.2 %igen Agarosegel analysiert. Auf diese Weise konnte das Vorhandensein des gewünschten Klonierungsproduktes festgestellt werden.

Die korrekte Einklonierung des T7-Promotors in das Rest-Plasmid sollte im nächsten Schritt durch Sequenzanalyse verifiziert werden. Dazu wurden Klone von den transformierten Bakterien abgeimpft und für die Midi-Präparation über Nacht angezüchtet. Am nächsten Tag wurde das durch den T7-Promotor modifizierte Plasmid isoliert, die Konzentration bestimmt (Abb. 9) und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung (S. Anhang) wurde vom Servicelabor des Instituts für Zellbiologie und Klinische Neurologie durchgeführt. Das den neuen T7-Promotor enthaltende Plasmid wurde mit pBS II KS(-) T7 AMB bezeichnet (Abb. 10).



**Abb.9: Konzentrationsbestimmung des isolierten pBS II KS(-) T7AMB-Plasmids**

Das durch Midi-Präparation isolierte pBS II KS(-) T7AMB-Plasmid wurde auf einem 1.2 %igen Agarosegel überprüft. Als Kontrollen dienten neben dem DNA-Marker III sowohl das ungeschnittene als auch das geschnittene Bluescript KS(-)-Plasmid. Die Konzentration wurde auf 600-700 ng/ $\mu$ l geschätzt.

Spuren 1 - 3: unterschiedliche Mengen des pBS II KS(-) T7 AMB-Plasmids

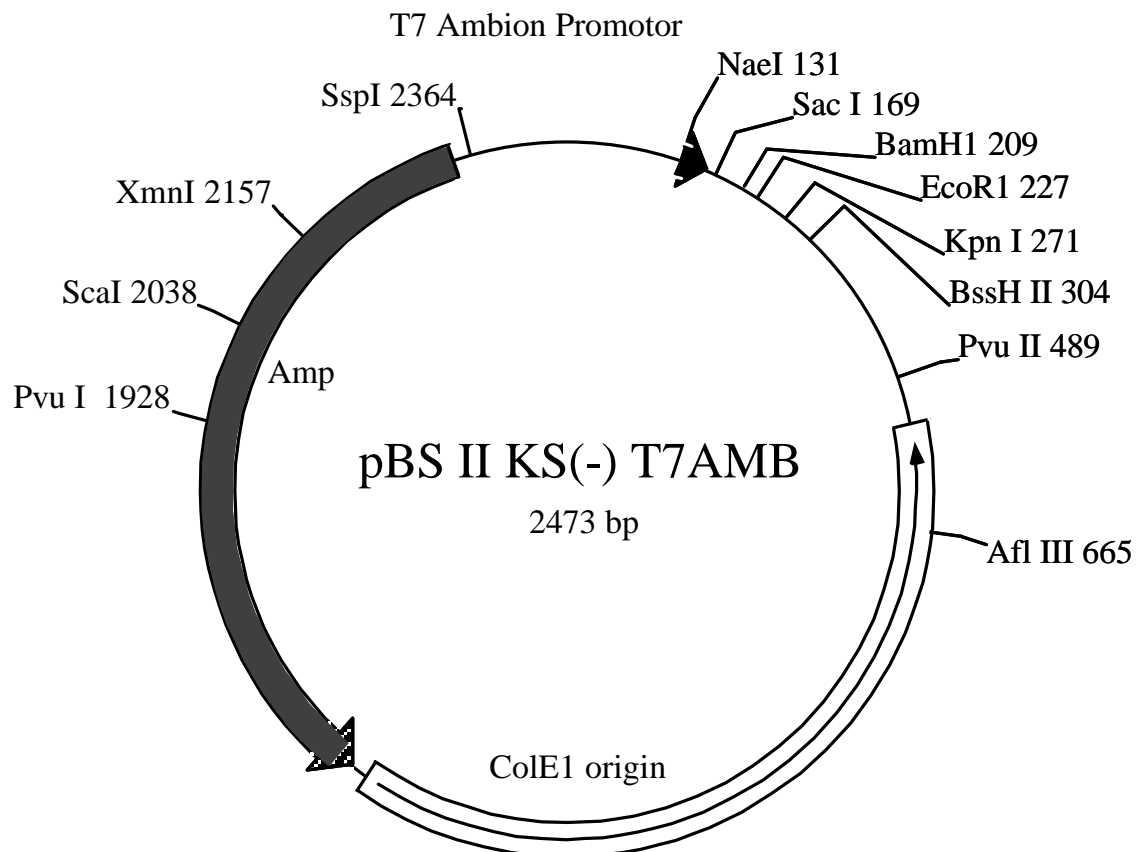
Spur 4: DNA-Marker III

Spur 5: Rest-Plasmid

Spur 6: ungeschnittenes Bluescript KS(-)-Plasmid

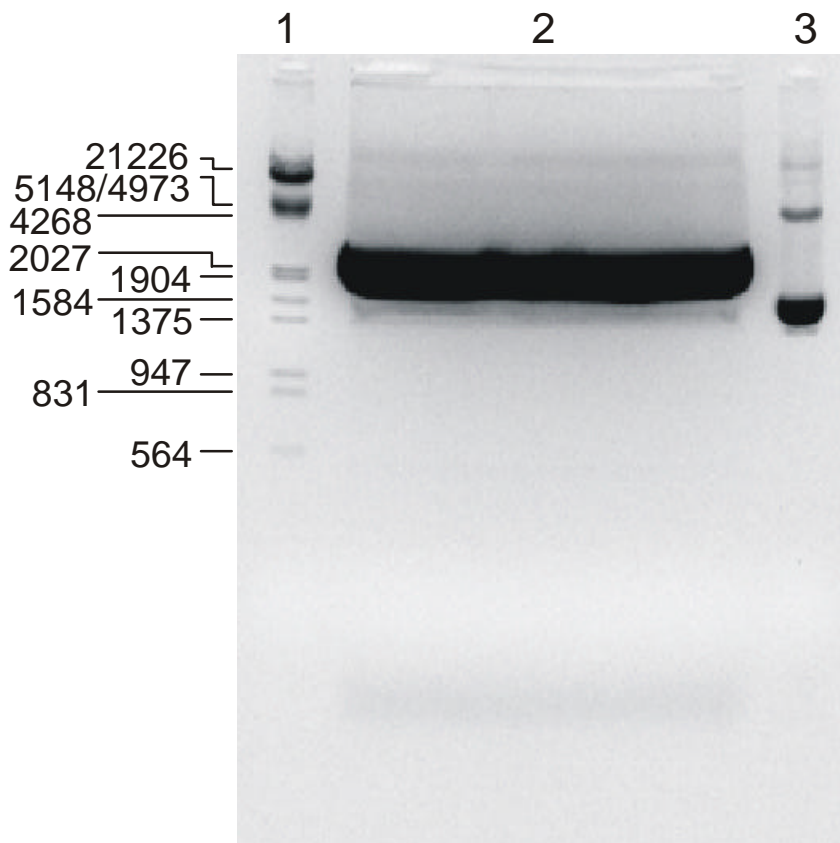
### 3.3.3 Restriktion des pBS II KS(-) T7AMB-Plasmids

Die Restriktionskarte des den T7-Promotor enthaltenden Vektors ist in Abb. 10 dargestellt. In diesen Vektor sollte die verlängerte S6-Kompetitor-Sequenz über die Bam HI- und Eco RI-Schnittstellen einkloniert werden. In einer analytischen Restriktion wurde getestet, mit welchem Restriktionspuffer die beide Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI aus dem Plasmid das 18 Bp lange Fragment effizient entfernen würden. Es zeigte sich, daß die Enzyme das Plasmid im NEB II-Puffer ( $\pm$  BSA) gut restringierten. Das stellte eine günstige Voraussetzung für die gleichzeitige präparative Restriktion mit beiden Enzymen dar. Der präparativ geschnittene Vektor wurde mittels eines 1.5 %igen Agarosegels aufgetrennt und isoliert (Abb. 11).



**Abb. 10: Aufbau des pBS II KS(-) T7AMB-Plasmids**

Die Abbildung stellt den Rest-Bluescript-Vektor nach erfolgter Ligation mit dem neuen T7-Promotor dar.



**Abb. 11: Präparative Restriktion des pBS II KS(-) T7AMB-Plasmids**

Das Plasmid wurde mit den beiden Restriktionsenzymen Eco RI und Bam HI inkubiert. Die unterste Bande in Spur 2, die nur leicht zu sehen ist, stellt das herausgeschnittene 18 Bp-lange Oligonucleotid dar.

Spur 1: DNA-Marker III,

Spur 2: Das geschnittene pBS II KS(-) T7AMB-Plasmid

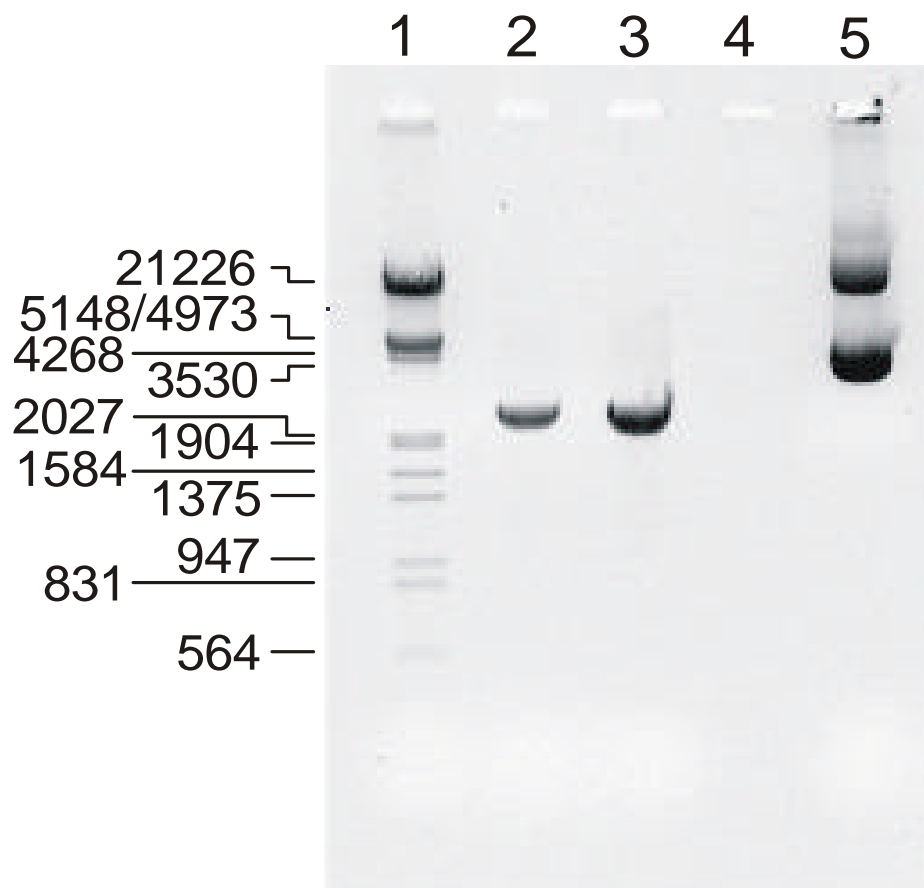
Spur 3: Das ungeschnittene pBS II KS(-) T7AMB-Plasmid

### 3.3.4 Präparation des S6-Kompetitor-Fragmentes

Für die Einklonierung der S6-Kompetitor-DNA in das neu konstruierte pBS II KS(-) T7AMB-Plasmid mußte das entsprechende S6-cDNA-Fragment zunächst aus dem Vektor pEGFP-C1-S6 $\Delta$ I,II,III (3-249) isoliert werden.

Der mir zur Verfügung gestellte Expressionsvektor pEGFP-C1-S6 $\Delta$ I,II,III (3-249) enthielt die S6-cDNA-Sequenz angefangen mit dem siebten bis zum 750. Nucleotid (Stop-Codon

eingeschlossen), wobei die drei Kernlokalisationssequenzen deletiert worden sind (Abb. 13). Von dem Expressionsvektor wurde eine präparative Isolierung durchgeführt, die auf einem Agarosegel analysiert wurde. Beide Plasmide: das pBS II KS(-) T7AMB und das pEGFP-C1-S6 $\Delta$  I,II,III(3-249) konnten mit hoher Reinheit isoliert werden (Abb. 12).



**Abb.12: Agarosegel der Plasmide pBS II KS(-) T7AMB und pEGFP-C1-S6**

**$\Delta$  I,II,III(3-249)**

Die Konzentration des isolierten pBS II KS(-) T7AMB und des Plasmids pEGFP-C1-S6 $\Delta$ I,II,III(3-249), das mir zur Verfügung gestellt worden ist, wurden bestimmt. Die Konzentration des pBS II KS(-) T7AMB -Plasmides wurde auf 100 ng/ $\mu$ l und die des Vektors auf 1  $\mu$ g/ $\mu$ l geschätzt.

Spur 1: DNA-Marker III, Spur 2, 3: geschnittenes pBS II KS(-) T7AMB-Plasmid, Spur 4: Frei, Spur 5: pEGFP-C1-Expressionsvektor

```

1 ATGAAGCTGA ACATCTCCTT CCCAGCCACT GGCTGCCAGA AACTCATTGA
51 AGTGGACGAT GAACGCAAAC TTCGTACTTT CTATGAGAAG CGTATGGCCA
101 CAGAAGTTGC TGCTGACGCT CTGGGTGAAG AATGGAAGGG TTATGTGGTC
151 CGAATCAGTG GTGGGAACGA CAAACAAGGT TTCCCATGA AGCAGGGTGT
201 CTTGACCCAT GGCCGTGTCC GCCTGCTACT GAGTAAGGGG CATTCTGTGT
251 ACAGACCAAG GAGAACTGGA GAAAGAAAGA GAAAATCAGT TCGTGGTTGC
301 ATTGTGGATG CAAATCTGAG CGTCTCAAC TTGGTTATTG TAAAAAAGG
351 AGAGAAGGAT ATTCTGGAC TGACTGATAC TACAGTGCC CGCCGCCTGG
401 GCCCAAAAAG AGCTAGCAGA ATCCGCAAAC TTTTCAATCT CTCTAAAGAA
451 GATGATGTCC GCCAGTATGT TGTAAGAAAG CCCTTAAATA AAGAAGGTA
501 GAAACCTAGG ACCAAAGCAC CCAAGATTCA GCGTCTTGT ACTCCACGTG
551 TCCTGCAGCA CAAACGGCGG CGTATTGCTC TGAAGAAGCA GCGTACCAAG
601 AAAAATAAAG AAGAGGCTGC AGAATATGCT AAACTTTTGG CCAAGAGAAT
651 GAAGGAGGCT AAGGAGAAGC GCCAGGAACA AATTGCGAAG AGACGCAGAC
701 TTTCTCTCT GCGAGCTTCT ACTTCTAAGT CTGAATCCAG TCAGAAUAA
751 ttcgaagctt aagacgtcag ctgccatggc gcccgggccc taggtggcct
800 agatctattg actagtatta gtcggtgctt aag

```

### Abb. 13: S6-cDNA-Sequenz mit Sequenzen aus dem pEGFP-Vektor

Die Kernlokalisationssequenzen sind rot, die RT-PCR-Primer sind blau markiert. Die PCR-Primer für die Isolierung der deletierten S6-DNA sind fett gedruckt und unterstrichen. Die klein geschriebene Sequenz stammt aus dem pEGFP-C1-Plasmid.

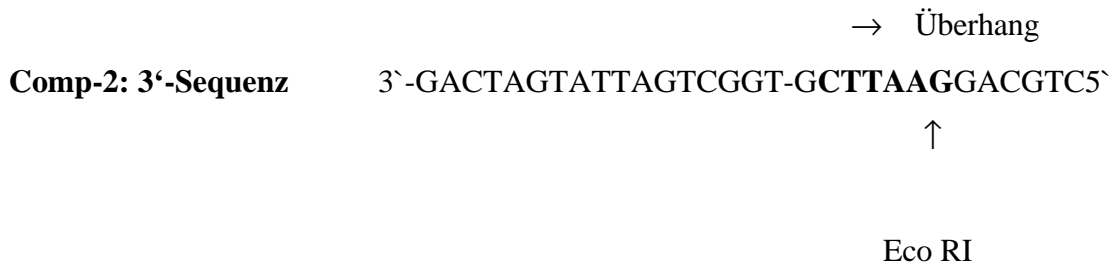
Die für die kompetitive RT-PCR benötigte Sequenz von 315 Bp liegt zwischen dem Sense Primer: **5'-CTG GGC CCA AAA AGA GCT AG -3'**

und Antisense-Primer: **5'- TTT CTG ACT GGA TTC AGA CTT AG-3'**.

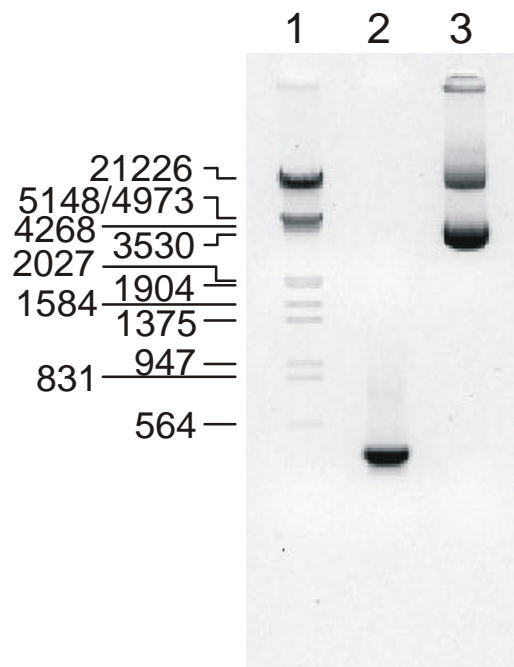
Die S6-Kompetitor-Sequenz wurde aus dem pEGFP-Expressionsvektor mit dem Sense-Primer: 5' CCC GGG GGA TCC CTG ATA CTA CAG TGC C-3', der Comp1 bezeichnet wurde, und dem Antisense-Primer 5'-CTG CAG GAA TTC GTG GCT GAT TAT GAT CAG-3', der Comp-2 genannt wurde, durch PCR amplifiziert (Abb. 13).

Der Primer Comp-1 wurde so konstruiert, daß er einige Basenpaare vor dem späteren PCR-Endprodukt hybridisiert. Der Comp-1-Primer ist mit einem nicht hybridisierenden Überhang versehen, der eine Bam HI-Schnittstelle an seinem 5'-Ende besitzt. Der zweite Antisense-Primer Comp-2 hybridisiert 59 Basenpaare von der Kompetitor-Sequenz entfernt im pEGFP-C1-Expressionsvektor (Abb. 13). Er ist ebenfalls mit einem Überhang versehen, der eine Eco RI-Schnittstelle codiert.

Überhang ←  
**Comp-1: 5'-Sequenz:** 5'-CCCGGGGGATCC-CTGATACTACAGTGCC-3'  
↑  
Bam HI



Das amplifizierte PCR-Produkt von 441 Bp wurde zuerst gereinigt (Abb. 14) und an den Überhängen mit den entsprechenden Enzymen restringiert (Abb. 18). Das restringierte PCR-Produkt (424 Bp) wurde anschließend in den vorbereiteten pBS II KS(-) T7AMB - Vektor einkloniert.



**Abb.14: Agarosegel der amplifizierten S6-Kompetitor-DNA**

Die Abbildung zeigt die amplifizierte PCR-Produkt, das die verlängerte S6-Kompetitorsequenz codiert. Die Konzentration wurde auf 100 ng/μl geschätzt. Als Kontrolle diente neben dem Marker III die DNA des Vektor pEGFP-C1-S6ΔI,II,III.

Spur 1: DNA-Marker III

Spur 2: S6-Kompetitorsequenz

Spur 3: pEGFP-C1-S6ΔI,II,III

Die ligierte T7-Promotorsequenz und die amplifizierte S6-Teilsequenz aus dem Expressionsvektor pEGFP-C1 ergeben folgende Gesamtsequenz (Abb. 15, 16).



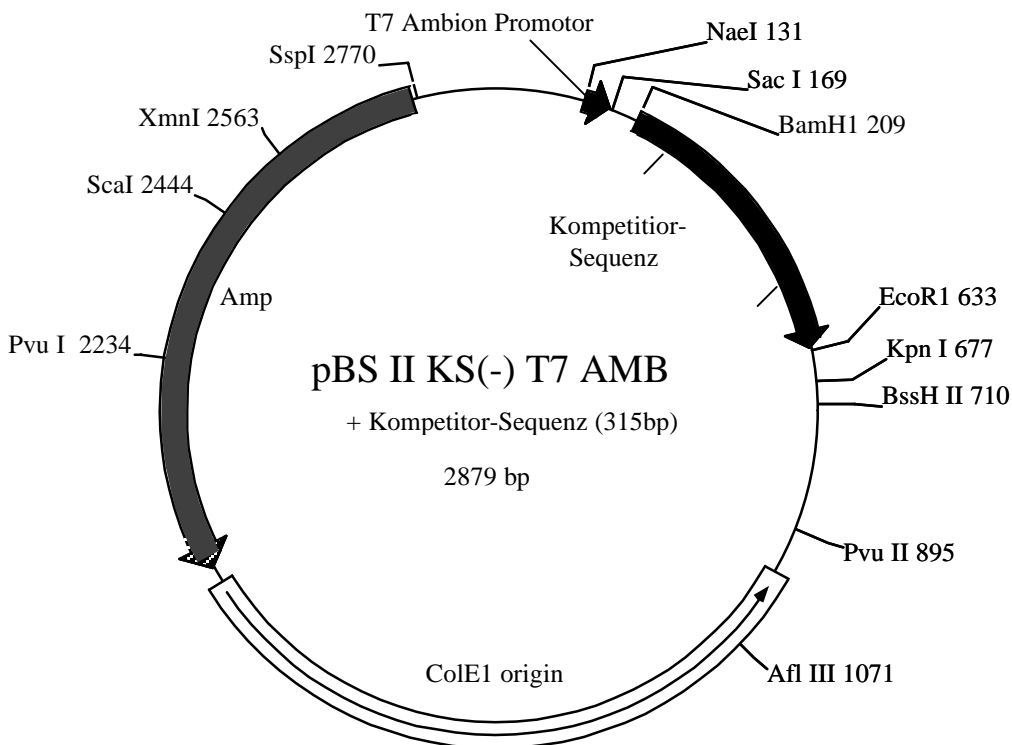
↓

```

ggccgcgcattatgctgagtgatatccctctcctcctcgaggtggcgccacccgcccggcga
gatccttgatcacctaggGACTATGATGTCACGGAGCGGCGGACCCGGGTTTTTCTCGATCG
TCTTAGGCGTTTTGAAAAGTTAGAGAGATTTCTTCTACTACAGGCGGTCATACAACATTCTT
TCGGGAATTTATTTCTTCCATGGTTTCGTGGGTTCTAAGTCGCAGAACAATGAGGTGCACA
GGACGTCGTGTAACGAGACTTCTTCGTTCGCATGGTTCTTTTTATTTCTTCTCCGACGTCTT
ATACGATTTGAAAACCGGTTCTCTTACTTCCTCCGATTCTTCTTCGCGGTCCTTGTTTAAAC
GCGAAAGGAGAGACGCTCGAAGATGAAGATTCAGACTTAGGTCAGTCTTTATTttcgaagc
ttaagacgtcagctgccatggcgcccgggcccctaggtggcctagatctattgactagatt
agtcggtgcttaag
  
```

**Abb. 15: DNA-Sequenz nach Ligation der S6-Teilsequenz aus dem Expressionsvektor pEGFP-C1 in das pBSII KS(-) T7AMB-Plasmid**

Unterstrichene Sequenz entspricht dem T7-Promotor und schwarze, fett-geschriebene Sequenzen entsprechen den Primern Comp-1 und Comp-2. Blaue Bereiche sind die Primer-Sequenzen für den Kompetitor der RT-PCR. c : Transcriptionsstart



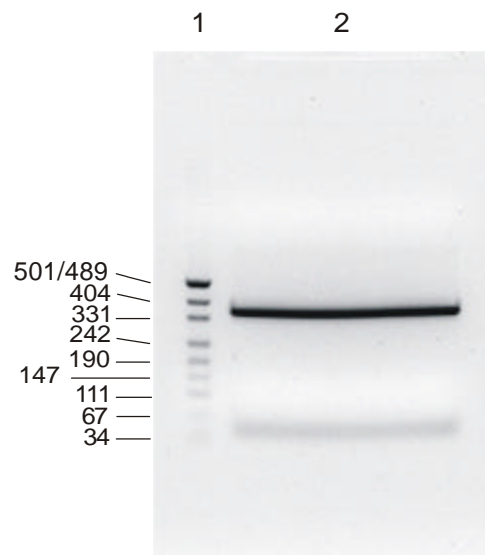
**Abb. 16: Struktur des Kompetitor-Konstruktes**

Nach Linearisierung und Transkription ist eine RNA-Sequenz von 476 Basen zu erwarten, wobei die Primer-Sequenzen für die kompetitive RT-PCR blau markiert sind (Abb. 17), die einen 315 Bp langen S6-Kompetitor in der RT-PCR spezifizieren.

GGGAGAGGAG	GAGCUCCACC	GCGGUGGGCG	GCCGCUCUAG	AACUAGUGGA
UCCCUGAUAC	UACAGUGCCU	CGCCGC <b>CU</b> GG	<b>GCCCAAAAAG</b>	<b>AGCUAG</b> CAGA
AUCCGCAAAC	UUUUCAAUCU	CUCUAAAGAA	GAUGAUGUCC	GCCAGUAUGU
UGUAAGAAAG	CCCUUAAAUA	AAGAAGGUAC	CAAAGCACCC	AAGAUUCAGC
GUCUUGUUAC	UCCACGUGUC	CUGCAGCACA	UUGCUCUGAA	GAAGCAGCGU
ACCAAGAAA	AUAAAGAAGA	GGCUGCAGAA	UAUGC UAAAC	UUUUGGCCAA
GAGAAUGAAG	GAGGCUAAGG	AGAAGCGCCA	GGAACAAAUU	GCGCUUCCU
CUCUGCGAGC	UUCUACUU <b>CU</b>	<b>AAGUCUGAAU</b>	<b>CCAGUCAGAA</b>	<b>AUAAAAGCUU</b>
CGAAUUCUGC	AGUCGACGGU	ACCGCGGGCC	CGGGAUCCAC	CGGAUCUAGA
UAACUGAUCA	UAAUCAGCCA	CGAAUU		

**Abb. 17: RNA-Sequenz des transkribierten Kompetitor-Konstruktes**

Die transkribierte RNA-Sequenz beträgt 476 Bp, wobei 315 Bp, die zwischen den PCR-Primer-Bindungsstellen (blau markiert) liegen, als Kompetitor in der RT-PCR fungieren.



**Abb. 18: Präparatives Agarosegel der doppelt restingierten S6-Kompetitor-DNA**

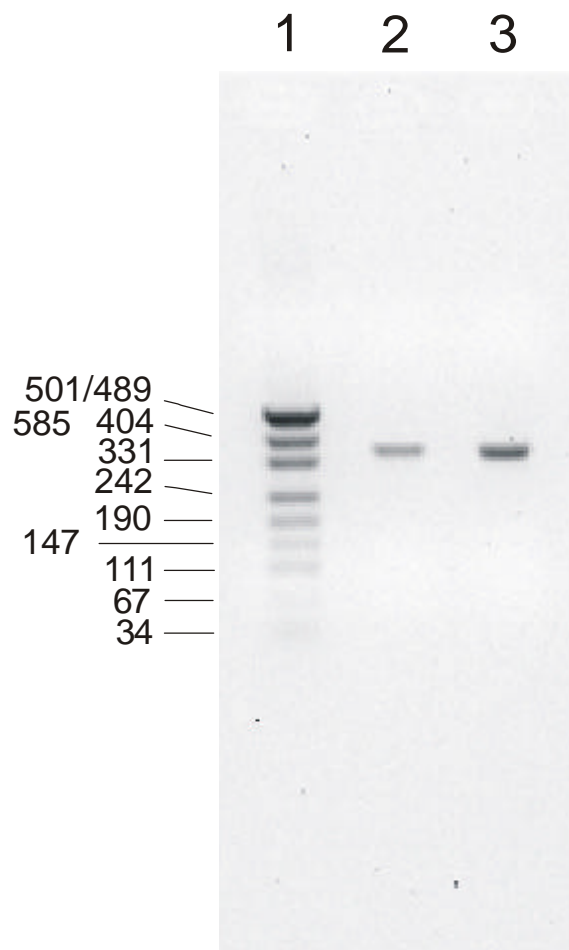
Die Abbildung zeigt das S6-Fragment dem die 3 Kernsignale fehlen nach Restriktion mit Eco RI und Bam HI. Es besitzt eine Länge von 424 Bp.

Spur 1: DNA-Marker pUG19/Hpa II, Spur 2: Geschnittenes S6-Kompetitor-Fragment

Das aus dem pEGFP-C1-Vektor amplifizierte S6-Kompetitor-Fragment wurde mit den beiden Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI gleichzeitig geschnitten und auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 18).

Aufgrund der Salzkonzentration im Restriktionsansatz wandert das S6-Fragment im präparativen Gel nicht auf der erwarteten Höhe von 424 Bp (Abb. 18). Die DNA-Konzentration des isolierten Fragmentes wurde mit einem 2 %igem Agarosegel bestimmt (Abb. 19).

Mit einem Ligationsverhältnis von 10 : 1.5 wurden das S6-Kompetitor-Fragment und der Vektor pBS II KS(-)T7AMB über Nacht bei 16°C ligiert. Am nächsten Tag wurde der Vektor in kompetente E. coli XL1-Blue transformiert. Die Transformationseffizienz wurde sowohl mit einer positiven als auch negativen Kontrolle überprüft.



**Abb. 19: Agarosegel des isolierten S6-Kompetitor-Fragmentes**

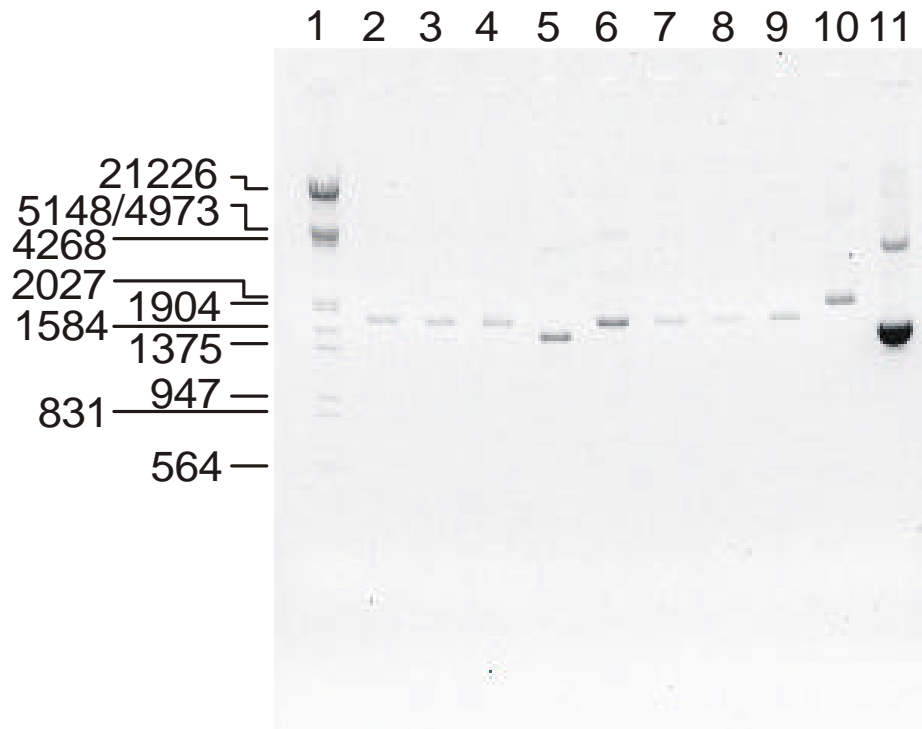
Die Konzentration des S6-Fragmentes wurde auf 100 ng/ $\mu$ l geschätzt.

Spur 1: DNA-Marker pUG19/Hpa II

Spur 2 und 3: S6-Kompetitor-Fragment.

### 3.3.5 Präparation des Kompetitor-Plasmids

Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Selektivplatten (Ampicillin, Tetrazyklin) ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden mehrere Kolonien abgeimpft, von denen Mini-Präparationen angefertigt wurden. Die Plasmid-DNA der einzelnen Kolonien wurden mit Hilfe eines 1.2 %igen Agarosegeles verglichen (Abb. 20).



**Abb. 20: Überprüfung der von verschiedenen Kolonien isolierten Plasmide**

Spur 1: DNA-Marker III

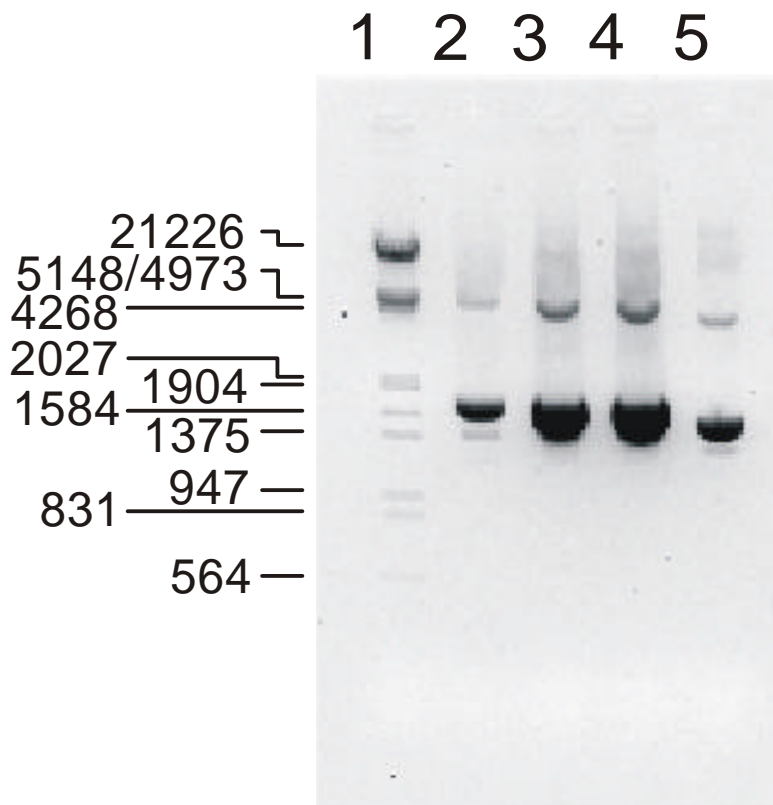
Durch Minipräparation wurden 3 Plasmid-Typen isoliert.

Spur 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9: erwartetes Kompetitor-Plasmid

Spur 5: ungeschnittenes pBS II KS(-) T7 AMB-Plasmid

Spur 10: ungeschnittenes Bluescript KS(-)-Plasmid

Die positiven Klone wurden durchnummeriert und Klon 5 wurde für die weitere Bearbeitung ausgewählt. Von diesem Klon wurde eine Midi-Präparation durchgeführt. Die Reinheit und Konzentration des Plasmids wurde durch Agarose-Gelelektrophorese bestimmt (Abb. 21). Das Plasmid besitzt die in Abb. 15 dargestellte Sequenz. Es ist im SeviceLabor des Institutes für Zellbiologie und Klinische Neurologie sequenziert worden.



**Abb. 21: Agarosegel des isolierten Kompetitor-Plasmids**

Das durch Midi-Präparation isolierte Plasmid wurde auf einem 1.2 % igen Agarosegel analysiert. Als Kontrolle diente neben dem DNA-Marker auch das pBS II KS(-) T7 AMB-Plasmid. Die Konzentration des isolierten Kompetitor-Plasmids wurde auf 600-800 ng/μl geschätzt.

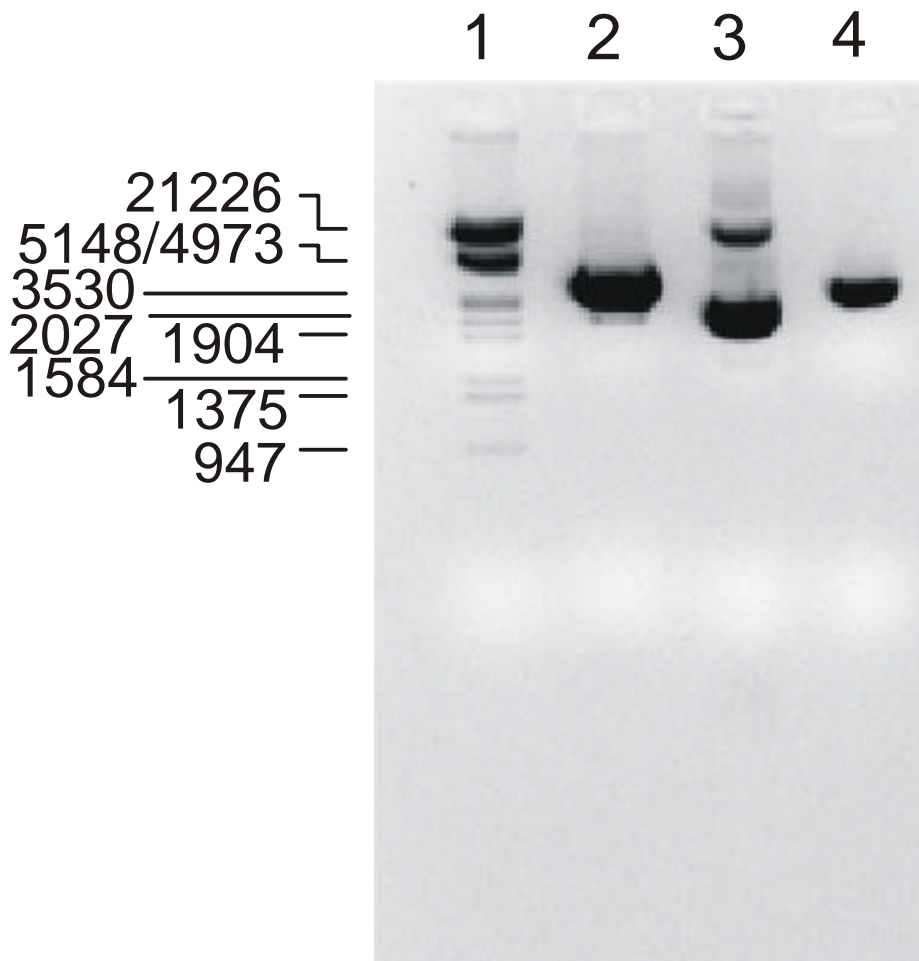
Spur 1: DNA-Marker III

Spur 2-4: Kompetitor-Plasmid

Spur 5: pBS II KS(-) T7 AMB-Plasmid

### 3.3.6 Linearisierung des Kompetitor-Plasmids

Das Kompetitor-Plasmid wurde mit EcoRI restringiert und mit Ethanol gefällt. Die Linearisierung des Plasmid wurde mittels eines 1.2 %igen Agarosegels überprüft (Abb. 22).



**Abb. 22: Linearisierung des Kompetitor-Plasmids durch Eco RI**

Das die Kompetitor-Sequenzen tragende Plasmid wurde als Vorbereitung für die *in vitro* Transkription mit EcoRI linearisiert, als Kontrolle dienten neben dem DNA-Marker ungeschnittenes Plasmid und das mit EcoRI und BamHI geschnittene pBSII KS(-)T7 AMB-Plasmid.

Spur 1: DNA-Marker III

Spur 2: geschnittenes Kompetitor-Plasmid

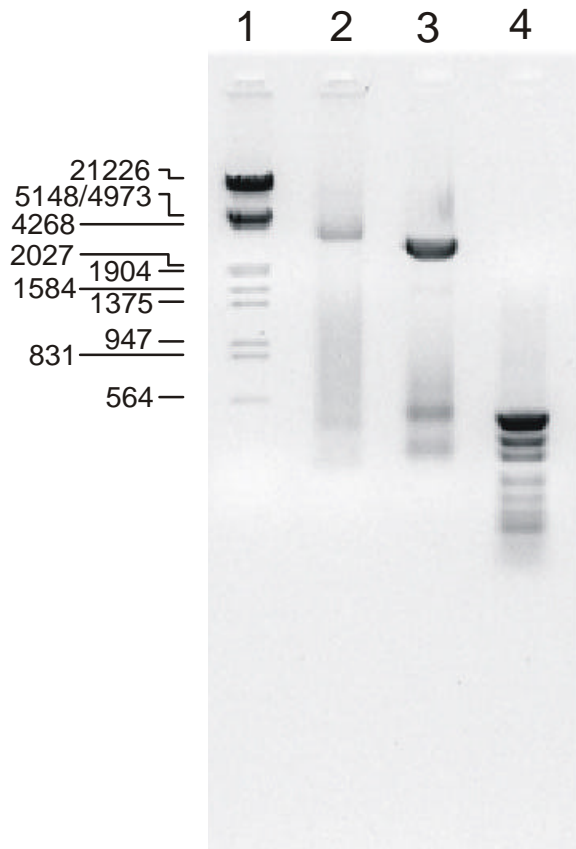
Spur 3: ungeschnittenes Kompetitor-Plasmid

Spur 4: geschnittenes pBS II KS(-) T7 AMB-Plasmid

### 3.3.7 In-Vitro-Synthese der S6-Kompetitor-RNA

Das linearisierte Plasmid wurde mit der T7-RNA-Polymerase transkribiert. Die Sequenz des Transkripts ist in Abb. 17 dargestellt. Bei dieser Transkription wurde eine Nucleotid-Mischung aus dem Kompetitor Konstruktion Kit (Ambion) verwendet. Diese NTP-Mischung enthält modifizierte Cytidin- und Uridinreste, die dem Kompetitor-RNA-Molekül RNase-Resistenz verleihen. Dieser Schutz vor RNasen ist von großer Bedeutung,

da während der folgenden Experimente durch mögliche RNase-Kontaminationen das Ergebnis erheblich verfälscht werden kann. Das Transkriptionsprodukt wurde durch ein 1.2 %iges Agarosegel überprüft.



**Abb. 23: Agarosegel der in-vitro synthetisierten RNAs**

Die Kompetitor-RNA wurde in vitro synthetisiert. Als Kontrolle diente neben den DNA-Markern eine in vitro transkribiertes DNA-Segment des Cyclophilins.

Spur 1: DNA-Marker III

Spur 2: Transkript der Kontroll-Cyclophilin-DNA

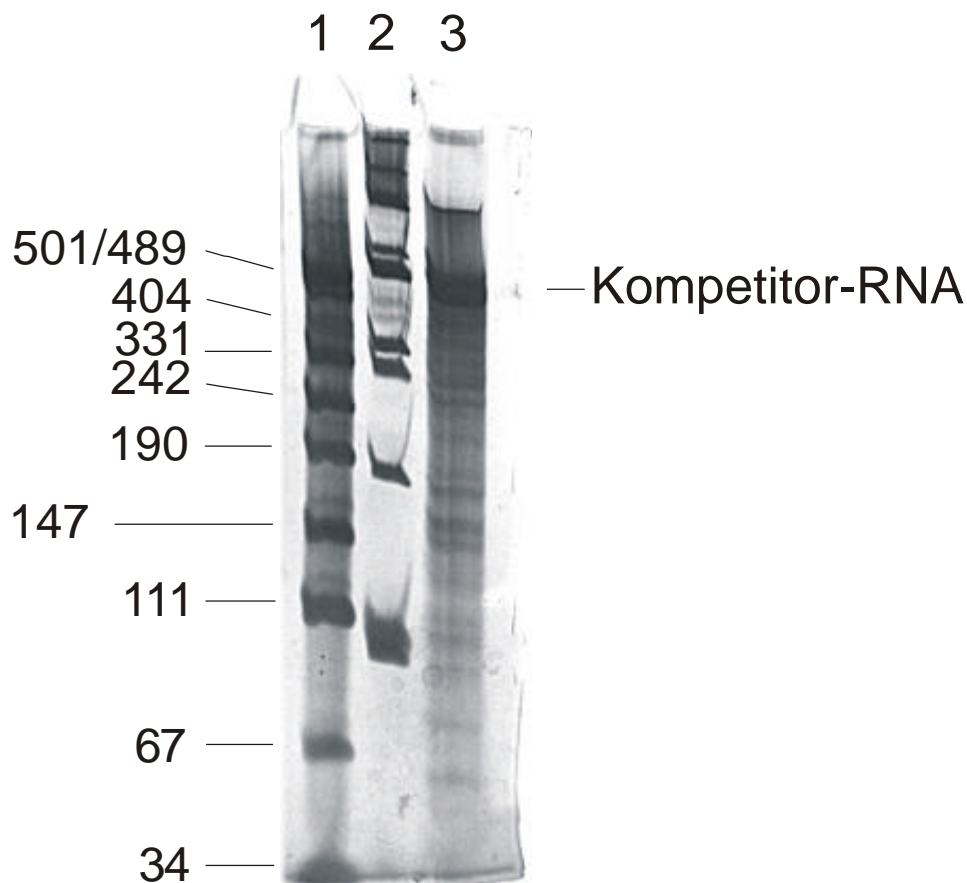
Spur 3: Transkript der S6-Kompetitor-DNA

Spur 4: DNA-Marker pUC 19/HpaII

In Spur 3 (Abb. 23) erkennt man eine weit gewanderte Doppelbande des Kompetitor-Transkripts, die durch Aggregation zustande kommt. Die sehr schwache Bande des Cyclophilin-Transkripts (Spur 2) besitzt etwa die gleiche Größe wie das S6-Transkript. In beiden Spuren ist noch das unverdaute Plasmid sichtbar.

### 3.3.8 Isolierung und Reinigung der Kompetitor-RNA

Bevor die verlängerte Kompetitor-RNA gereinigt werden konnte, mußte die Reverse-Transkriptions-reaktion mit DNase-I behandelt werden, um das linearisierte Plasmid zu zerstören. Die Kompetitor-RNA wurde auf einem 5 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 24). Um die entsprechende Kompetitor-RNA-Bande auf dem Gel zu lokalisieren, wurde wie folgt vorgegangen: Die Banden des Gels, die den Marker und das Aliquot der Probe enthielten, wurden abgetrennt, mit Silbernitrat gefärbt und anschließend an den präparativen Teil des Gels angelegt. Die Höhe der Kompetitor-RNA-Bande im präparativen Gel konnte auf diese Weise bestimmt werden. Der entsprechende Gel-Bereich wurde mit dem Skalpell herausgeschnitten, die RNA wurde aus dem Gel eluiert und durch Ethanol-fällung gereinigt. Die Kompetitor-RNA wurde in 15 µl RNase-freiem Wasser gelöst.



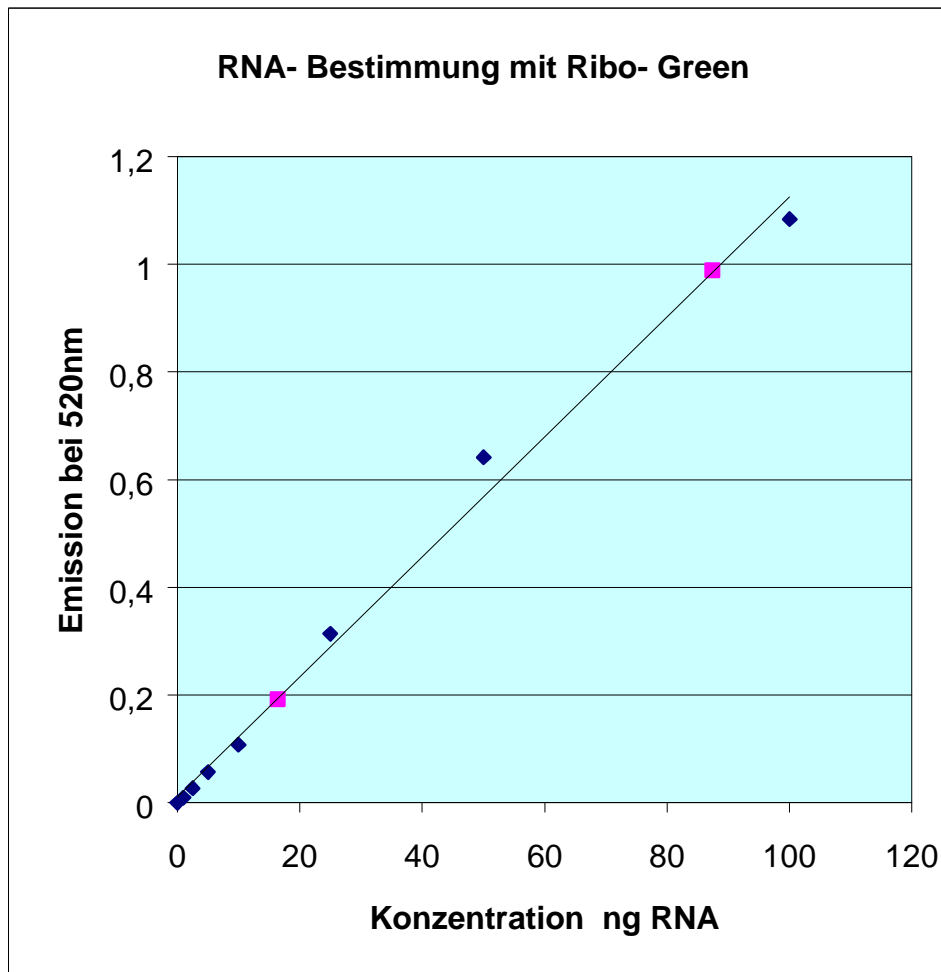
**Abb. 24: Polyacrylamid-Gel der Kompetitor-RNA**

Die elektrophoretische Auftrennung der Kompetitor-RNA erfolgte auf einem 5 %igen Polyacrylamid-Gel, das mit Silbernitrat gefärbt wurde.

Spur 1: DNA-Marker pUC19/Hpa II, Spur 2: DNA-Leiter, Spur 3: Kompetitor-RNA.



### 3.4 Quantifizierung der in vitro transkribierten Kompetitor-RNA



#### Abb. 25: Konzentrationsbestimmung der Kompetitor-RNA

Die Ausbeute der Kompetitor-RNA wurde mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Ribogreen quantitativ bestimmt. Die Emission des fluoreszierenden Farbstoff-Komplexes wurde bei 520 nm gemessen. Die Konzentration der Kompetitor-RNA betrug ca. 84 ng/ $\mu$ l.

Eichkurve; Kompetitor-RNA.

Die RNA wurde mit Ribogreen, einem fluoreszierenden Farbstoff, quantifiziert. Dieser Farbstoff ist so sensitiv, daß man RNA-Konzentrationen unter 200 pg erfassen kann (MolecularProbes). Die Linearität der RNA-Bestimmung wird durch geringe Kontaminationen von DNA, Ethanol und Salze nicht gestört. Die Messung wurde mit einem Standard Spectralfluorometer durchgeführt und anschließend mit Excell 2000 ausgewertet (Abb. 25).

### 3.5 Quantifizierung der S6-mRNA durch kompetitive RT-PCR

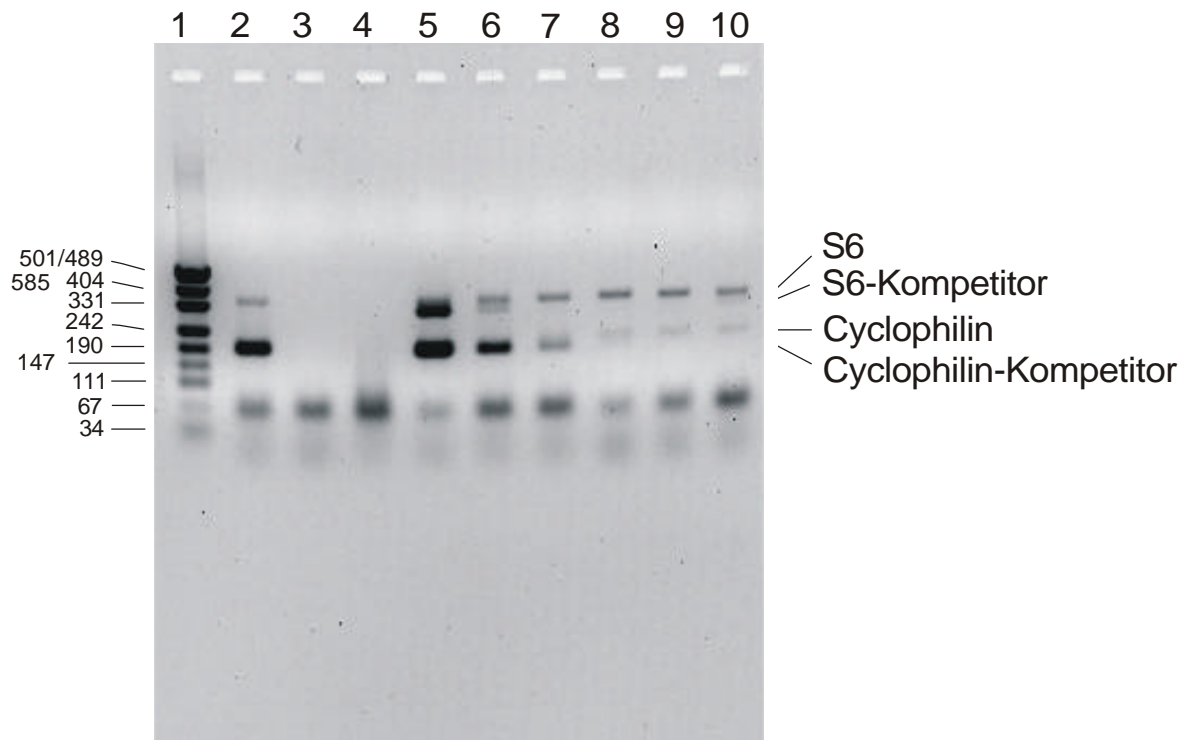
Aus der Konzentration des Kompetitors und dessen Molekulargewicht wurde die Anzahl der Kopien/ $\mu\text{l}$  errechnet. Die Kompetitor-Lösung wurde in verschiedenen Verdünnungen in der kompetitiven RT-PCR eingesetzt. Zunächst wurde die ungefähre Konzentration der S6-mRNA bestimmt. In weiteren Versuchen konnte dann die Kopienzahl genauer eingegrenzt werden. Als Vergleich wurde die Kopienzahl der Cyclophilin-mRNA in der Hela-Zelle quantifiziert. Dazu wurde die von Ambion erhaltene Kompetitor-RNA verwendet, die gegenüber dem nativen Cyclophilin-mRNA-Fragment eine Deletion von 20 Nucleotiden enthielt (s. Anhang).

Der RT-Ansatz wurde mit  $5\mu\text{l}$  Zell-Lysat durchgeführt, das entspricht ca. 2000 Hela-Zellen. In diesen Ansatz wurden je  $1\mu\text{l}$  Kompetitor-RNAs in verschiedenen Konzentrationen/Kopienzahl zugegeben. Nach der RT-PCR wurde ein Aliquot der DNA-Fragmente auf einem 2 %igen Agarosegel analysiert (Abb. 26).

Die Gelelektrophorese zeigte, daß die Kopienzahl der endogenen S6-mRNA zwischen  $3,6 \times 10^5$  und  $3,6 \times 10^6$  liegen muß, während die endogene Cyclophilin-mRNA zwischen  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Kopien liegen muß.

In einem weiteren Ansatz wurde die Anzahl der Kompetitor-RNA-Kopien so variiert, daß am Ende die PCR-Produkte der endogenen und exogenen RNAs Banden im Agarosegel annähernd die gleiche Intensität ergaben. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 1.5 %igem Agarosegel, um bei dieser relativ zum vorherigen PCR-Versuch niedrigeren Agarose-Konzentration die Doppelbanden besser trennen zu können (Abb. 27).

Die Abbildung 27 zeigt zwei Doppelbanden, die obere entspricht dem S6-Fragment und die untere dem Cyclophilin-Fragment. In den Doppelbanden stellt jeweils die obere Bande die endogene und die untere Bande die Kompetitor-RNA dar. Die Intensität der Gelbanden wurde optisch ausgewertet. Pro 2000 Hela-Zellen ergab die kompetitive RT-PCR für die S6-mRNA eine Kopienzahl von ca.  $4,3 \times 10^5$  und für die Cyclophilin-mRNA eine Kopienzahl von ca.  $1,6 \times 10^6$ .



**Abb. 26: Kompetitive RT-PCR von S6-mRNA und Cyclophilin-mRNA**

Die RT-PCR-Produkte wurden auf einem 1.2 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1: DNA-Marker pUC19/Hpa II

Spur 2: S6-PCR-Produkt ohne Kompetitor (351 Bp), Cyclophilin-Kompetitor

Spur 3: RT-Minus-Kontrolle

Spur 4: Template-Minus-Kontrolle

Spur 5: S6\* :  $3,6 \times 10^6$ ; Cyclophilin\* :  $1 \times 10^9$

Spur 6: S6\* :  $3,6 \times 10^5$ ; Cyclophilin\* :  $1 \times 10^8$

Spur 7: S6\* :  $3,6 \times 10^4$ ; Cyclophilin\* :  $1 \times 10^7$

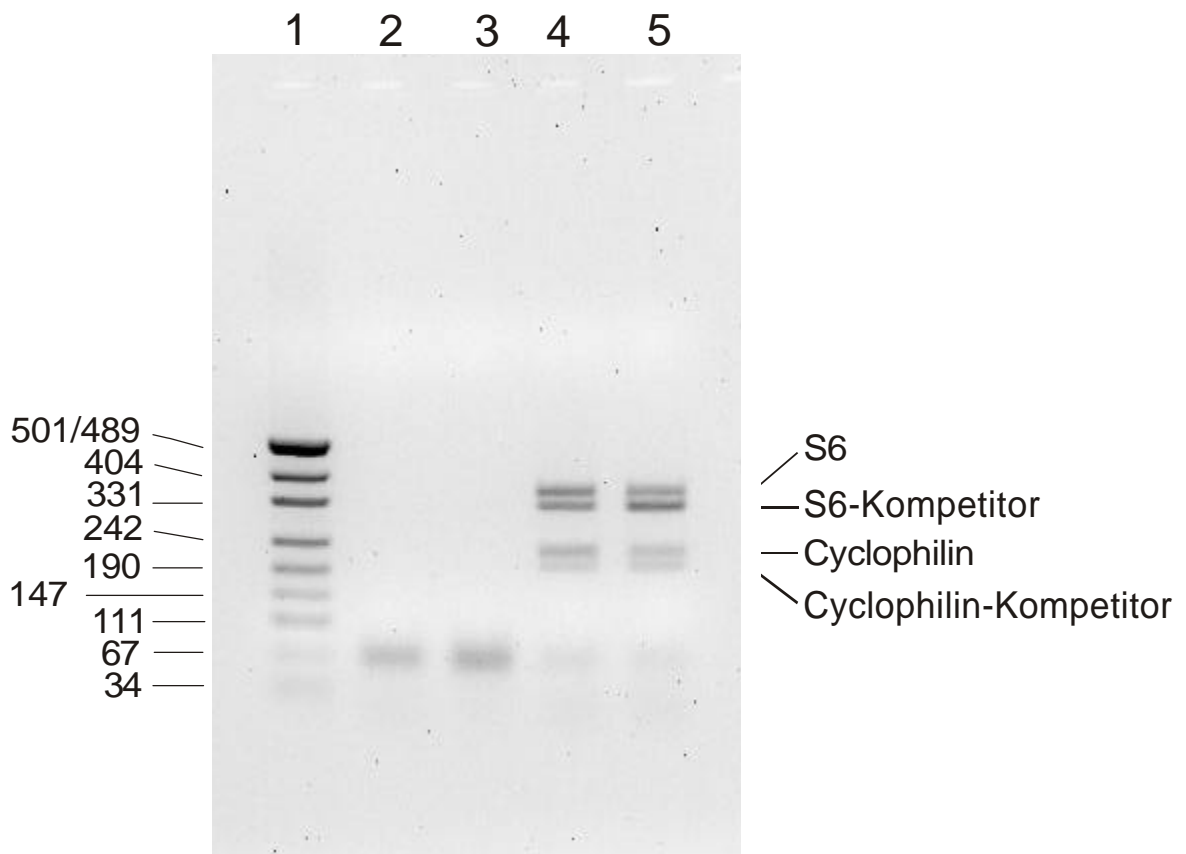
Spur 8: S6\* :  $3,6 \times 10^3$ ; Cyclophilin\* :  $1 \times 10^6$

Spur 9: S6\* :  $3,6 \times 10^2$ ; Cyclophilin\* :  $1 \times 10^5$

Spur 10: S6\* :  $3,6 \times 10^1$ ; Cyclophilin\* :  $1 \times 10^4$

S6\* : S6-Kompetitor-Kopien-Zahl

Cyclophilin\* : Cyclophilin-Kompetitor-Kopien-Zahl



### Abb. 27: Quantifizierung der S6- und Cyclophilin-mRNA in HeLa-Zellen

Die Trennung der RT-PCR-Produkte von S6 und Cyclophilin erfolgte auf einem 1.5 % igen Agarosegel.

Spur 1: DNA-Marker pUC19/Hpa II

Spur 2: Template-minus-Kontrolle

Spur 3: RT-minus-Kontrolle

Spur 4: S6\* :  $4,3 \times 10^5$  Kopien

Cyclophilin\* :  $1,3 \times 10^6$  Kopien

Spur 5: S6\* :  $5 \times 10^5$  Kopien

Cyclophilin\* :  $1,6 \times 10^6$  Kopien

### 3.6 Software-Auswertung der RT-PCR-Produkte

Die Banden der Abb. 27 wurden in die Intensitätsmessung und Software-Auswertung einbezogen. Die Intensitäten der Banden wurden mit der Imagequant Software (Molecular Dynamics) analysiert und quantifiziert. Rechteckige Ausschnitte der Banden wurden für die Quantifizierung ausgewählt und die Schwärzung wurde als „Volume“ bestimmt. Eine Hintergrund-Korrektur wurde durchgeführt. Das Verhältnis S6-mRNA zu Kompetitor betrug in der vierten Spur 54 % zu 46 % und in der fünften Spur 38 % zu 62 % (Abb. 27).

Für die Cyclophilin-mRNA ergab die optische Auswertung für die vierte Spur 58 % zu 42 % und für die fünfte Spur 44 % : 56 %. Die Berechnung ergibt  $200 \pm 20$  Kopien S6-mRNA und  $800 \pm 40$  Kopien Cyclophilin-mRNA pro HeLa-Zelle. Die ribosomale S6-mRNA und die Cyclophilin-mRNA gehören somit zu den mRNAs der mittleren Häufigkeitsklasse.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zell-Lyse unter Hitze-Inaktivierung von RNasen

Traditionell war der erste Schritt in der RT-PCR-Methode die mühsame Isolierung der RNA aus dem Probenmaterial. Bei sehr kleinen Proben ist die RNA-Präparation gewöhnlich der Zeit-limitierende Schritt der Analyse. RNA wird üblicherweise mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch (Chirgwin et al., 1979; Mensink et al., 1998) extrahiert. Die Lyse von Zellen in Guanidinium-Salzen hat sich ebenfalls für die Präparation intakter RNA bewährt (Chomczynski und Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993; Su et al., 1997).

Die direkte Lyse von Zellen (O'Brien et al., 1994; Klebe et al., 1996) führt zur Freisetzung von Nucleasen (Deutscher, 1993; Hämäläinen et al., 1999), die durch Zusatz von RNase-Inhibitoren nicht beherrscht werden können (Blackburn et al., 1977; Klebe et al., 1996). In der von mir benutzten Methode wurden die in den Kulturzellen vorhandenen RNasen durch einen Hitzeschritt in einem speziell entwickelten Zell-Lysis-Puffer sofort inaktiviert (Zale und Klibanov, 1986).

Die RNA kann auch aus den Zellen durch Erhitzen auf 90°C mit anschließender Proteinase K-Behandlung freigesetzt werden (O'Brien et al., 1994). Jedoch kann es bei diesen hohen Temperaturen in Gegenwart zweiwertiger Ionen zum Abbau der RNA kommen (Myers und Gelfand, 1991). Beim Hitze-Denaturierungsschritt in der von mir verwendeten Methode mußten deswegen zwei kritische Bedingungen – das Volumen und die Zellzahl – genau eingehalten werden, um eine erfolgreiche Zell-Lyse ohne RNA-Abbau zu erhalten. Das maximale Volumen, d.h. das Zellvolumen plus Lysis-Puffer, das noch schnell und effektiv durch Hitze inaktiviert werden kann, beträgt optimal 100 µl (Angabe von Ambion). Die maximale Zellzahl variiert etwas mit dem Zelltyp. Für Hela-Zellen beträgt die optimale Konzentration 400 Zellen/µl, um eine maximale Empfindlichkeit der RT-PCR zu erreichen. Bei 2000 Zellen/µl werden die Messenger noch gut amplifiziert, jedoch ist die Intensität der Banden geringer als bei der optimalen Zellzahl. Wird ein höheres Puffervolumen bei der Lyse gewählt, so dauert es zu lange bis die Inaktivierungstemperatur der RNasen von 75°C erreicht wird. Die endogenen RNasen werden beim Erreichen des physiologischen Temperatur-Bereichs aktiviert, so dass eine

längere Verweilzeit in diesem Temperatur-Bereich unweigerlich zu einem Abbau der mRNAs führt (Angabe von Ambion).

## 4.2 Auswahl der Kontroll-mRNA für die RT-PCR

Bei der Auswahl der Kontroll-mRNA habe ich mich von der Annahme leiten lassen, daß mRNAs für die ribosomalen Proteine wegen der 1-5 Millionen Ribosomen pro Zelle (Blobel und Potter, 1967) relativ häufig in den Zellen vorkommen sollten. Cooper (1997) gibt in seinem Lehrbuch sogar 10 Millionen Ribosomen pro Eukaryonten-Zelle an. Für die mittlere Häufigkeitsklasse der mRNAs gibt es kommerziell zwei verschiedenen Primer-Systeme: das Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase- (Bhatia et al., 1994) und das Cyclophilin-System (Haendler und Hofer, 1990; Danielson et al., 1988). GAPDH ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse. Das Enzym wird konstitutiv in vielen Geweben exprimiert und hat sich als brauchbare, interne Kontrolle erwiesen (Inghirami et al., 1990). Die GAPDH-mRNA macht jedoch signifikante Schwankungen, z.B. in virustransformierten oder oncogentransfizierten Maus-Fibroblasten Zell-Linien durch (Bhatia et al., 1994). Cyclophilin mRNA macht etwa 0.1 % der cytoplasmatischen mRNA aus und ist hoch konserviert (Danielson et al., 1988). Die verwendete Cyclophilin-mRNA stellte eine ausgezeichnete Kontrolle für die kompetitive RT-PCR dar, wie schließlich die Daten (Abb. 27) gezeigt haben. Außerdem war für die Bestimmung der Cyclophilin-mRNA der patentierte und garantiert RNase-resistente Kompetitor kommerziell erhältlich.

## 4.3 Konstruktion des Kompetitor-Plasmids

Für die mRNA-Quantifizierung mit der kompetitiven RT-PCR wird eine Kompetitor-RNA benötigt (Celi et al., 1993; Eferl et al., 1997). Kommerziell sind RNase-stabile RNA-Sonden für medizinisch interessante mRNAs entwickelt worden (Firma Ambion), in denen die RNA in RNase-resistente Partikel verpackt worden ist. Durch Erhitzen wird die verpackte RNA freigesetzt und kann als Matrize in der RT-PCR dienen. Diese Technologie ist patentiert und stand mir für die S6-mRNA nicht zur Verfügung. Deshalb mußte ich mir einen RNase-resistenten Kompetitor über einen modifizierten Expressionsvektor *in vitro* synthetisieren. Dabei wurde der Konstruktion eines wiederverwendbaren und flexiblen Vektors mit einem T7-Promotor der Vorzug gegeben (Schenborn und Meirendorf, 1985). Im Prinzip hätte man auch das Kompetitor-DNA-Fragment direkt an einen entsprechenden

RNA-Polymerase-Promotor eines SP6- oder T7-Phagen ligieren können (Milligan et al., 1987; Kain et al., 1998). Diese Ligation zwischen Promotor-Adaptor und PCR-Fragment dauert etwa 2 Stunden. Nach der Ligation kann durch entsprechende Wahl der RT-PCR-Primer direkt der Sense- oder der Antisense-Strang der RNA *in vitro* synthetisiert werden. Der von mir konstruierte Expressionsvektor hat jedoch den immensen Vorteil, daß man ihn wiederverwenden und für andere cDNA-Fragmente einsetzen kann.

Der ideale Kompetitor muß mit der gleichen Effizienz wie die endogene RNA revers transkribiert und amplifiziert werden (Celi et al., 1993; Eferl et al., 1997). Die Sequenz des Kompetitors sollte deswegen möglichst von der endogenen Sequenz abgeleitet sein, dadurch erreicht man die gleiche Effizienz in der Amplifikation (Zimmermann und Mannhalter, 1996). Diese Voraussetzung ist erfüllt, wenn die Primer-Bindungsstellen identisch sind und die interne, zu amplifizierende RNA-Sequenz nur kleine Unterschiede aufweist. Das Kompetitor-Konstrukt muß unbedingt ein zusätzliches Oligonucleotid-Segment strangabwärts von der 3' PCR-Primerbindungsstelle besitzen. Dadurch wird die gleiche Effizienz bei der reversen Transkription von Kompetitor und endogener Target-Sequenz gewährleistet (Schenborn und Meirendorf, 1985, Aziz und Soreq, 1990). Ideal ist es, wenn die Zusatz-Sequenzen mit der endogenen mRNA-Sequenz übereinstimmen, denn diese Zusatzregion ist kritisch für eine effiziente reverse Transkription des Kompetitor-Konstrukts. Werden Random-Primer im RT-Schritt benutzt, dann spielt die Länge der Zusatzsequenz eine besonders große Rolle. Ist sie weniger als 25 Nucleotide lang, verläuft die RT um eine Zehnerpotenz weniger effektiv. Ab einer Länge von 50 Nucleotiden werden Kompetitor- und endogene Messenger-RNA mit annähernd gleicher Effizienz transkribiert (s. Konstruktionsskizze). Am einfachsten ist es eine Deletion, die etwa 10 % der amplifizierten Sequenz entspricht, in die Amplifikationsdomäne einzuführen. Bei identischen Primersequenzen für die Amplifikation unterscheiden sich die endogene mRNA und die Kompetitor-RNA nur um 25-50 Nucleotide.

Deshalb wurden aus der S6-Sequenz, die 351 Nucleotide lang war, 36 Nucleotide deletiert. In dem mir von Herrn Lipsius zur Verfügung gestellten Plasmid waren die entsprechenden Nucleotid-Sequenzen der drei Kernlokalisationsignale (s. S6-Proteinsequenz in der Einleitung) deletiert. Dieser verkürzte Kompetitor (315 Bp) ließ sich eindeutig durch Agarosegel-Elektrophorese von der endogenen S6-Sequenz trennen und optisch auswerten (Abb. 27).



#### 4.4 RNA-Konzentration des in vitro transkribierten Kompetitors

Ein weiterer kritischer Punkt war die quantitative Bestimmung der Kopienzahl des in vitro synthetisierten Kompetitors. Die Konzentration der Kompetitor-RNA wurde mit Ribogreen der Firma Molecular Probes bestimmt (Jones et al., 1998). Ribogreen ist ein sehr empfindlicher Fluoreszenzfarbstoff für die Quantifizierung von RNA-Lösungen. Mit Ribogreen lassen sich RNA-Konzentrationen von 1 ng/ml bestimmen. Diese Empfindlichkeit übersteigt diejenige von EtBr um den Faktor 200 und die UV-Messung um den Faktor 1000. Der lineare Bereich der Quantifizierung mit Ribogreen umfasst 3 Zehnerpotenzen von 1 ng/ml bis zu 1 µg/ml. Da Ribogreen an DNA bindet, müssen DNA-haltige Proben durch DNase I behandelt werden, um RNA-spezifische Analysen durchführen zu können (Jones et al., 1998).

Wie aus Abbildung 25 hervorgeht, ergab die RNA-Bestimmung des Kompetitors eine Konzentration von 84 ng/µl. Unter Verwendung des Molekulargewichts der Kompetitor-RNA von 158.164 D erhält man 531 fmol/µl, d.h.  $3.3 \times 10^8$  Kopien/µl.

Da bei der RT nur die mRNA von 2000 Hela-Zellen eingesetzt wurde, mußte die Kompetitor-Lösung entsprechend verdünnt werden. Zunächst wurde befürchtet, daß bei einer hohen Verdünnung die Kompetitor-RNA an die Plastikwand des Reagenz-Röhrchens adsorbieren würde, ein Phänomen, das von hoch verdünnten DNA-Lösungen bekannt ist (Belotserkovskii und Johnston, 1997; Bauche und Kruppa, 2000). Dadurch würde ein nicht kalkulierbarer Fehler der eingesetzten Kopienzahl anhaften. Diese DNA-Adsorption läßt sich mit  $^{32}\text{P}$ -markierter DNA nachweisen und wird bei der Bestimmung hoch verdünnter DNA-Lösungen als Verlust der Linearität erkennbar (Bauche und Kruppa, 2000).

Abbildung 25 zeigt, daß die Linearität auch bei sehr niedrigen RNA-Konzentrationen erhalten bleibt. Dieser Befund deutet darauf hin, da sämtliche Lösungen in Plastik-Reaktionsgefäßen manipuliert wurden, daß die Kompetitor-RNA trotz modifizierter Nucleotide überhaupt nicht oder nur in vernachlässigbarem Ausmaß an die Plastikwände adsorbiert. Somit sind die Kopienzahlen auch nach entsprechender Verdünnung als korrekt anzusehen.

## 4.5 Quantifizierung der S6-mRNA in Hela-Zellen

Die Anzahl der PCR-Zyklen muß so hoch gewählt werden, daß das entstandene Produkt detektierbar ist und die PCR sich noch in der exponentiellen Phase befindet (Souazè et al., 1996; Lottspeich und Zorbas, 1998; Freeman et al., 1999). Durch Variation der eingesetzten Zell-Lysat-Menge bei der Reversen Transkription (Variation der mRNA-Molekülzahl) wurde diese essentielle Voraussetzung erfüllt.

Die Methoden zur Detektion von PCR-Produkten müssen: 1. empfindlich sein, 2. einen weiten dynamischen Bereich besitzen und 3. zu einer quantitativen Aussage führen. PCR-Produkte können, wie im experimentellen Teil gezeigt, mit EtBr-gefärbten Agarosegelen quantifiziert werden. Wie bereits erwähnt, ist dies nicht die sensitivste Methode der DNA-Bestimmung, denn die untere Detektionsgrenze liegt bei 5-10 ng und die Obergrenze bei 500 ng. Der dynamische Bereich umfaßt etwa eine Zehnerpotenz. Dies bedeutet, wenn die Expression einer mRNA über mehr als eine Zehnerpotenz variiert, daß größere Fehler in der Quantifizierung entstehen würden. Um diese Limitierung zu umgehen kann von EtBr zu anderen Färbemethoden gewechselt werden, z.B. Silberfärbung und SYBR-Gold-Färbung von Molecular Probes, dadurch wird die Empfindlichkeit gesteigert und der dynamische Bereich des Systems wesentlich erweitert. Der Farbstoff SYBR-Gold (Tuma et al., 1999; Schneeberger et al., 1995) bindet präferentiell an dsDNA in Gegenwart von einzelsträngiger DNA und eignet sich deshalb zur Quantifizierung der Produkte im linearen Teil der Amplifikationsreaktion.

Wenn der dynamische Bereich der EtBr-Fluoreszenz ausreicht, kann wie in Kapitel 4.5 und 4.6 gezeigt über ein Gel-Dokumentationssystem mit entsprechender Software die Auswertung durchgeführt werden. Aus Hinweisen von Ambion ist bekannt, daß der dynamische, lineare Bereich von EtBr-gefärbter DNA etwa im Bereich  $10^3$  bis  $10^6$  Kopien liegt. Oberhalb von  $10^6$  Kopien nimmt die EtBr-Farbstoffintensität nicht mehr linear zu.

Eine Alternative den dynamischen Bereich der RT-PCR zu erhöhen, ist die Markierung mit  $^{32}\text{P}$ -dNTP. Es gibt grundsätzlich zwei Wege in PCR-Produkte  $^{32}\text{P}$  einzuführen: 1. Die PCR-Primer können durch die T4-Polynucleotidkinase mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP endmarkiert werden, 2.  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dATP oder  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP kann der PCR-Inkubation zugesetzt werden. Nach Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 6 %igen Polyacrylamid-Gel wurde das

getrocknete Gel mit dem Phosphoimager quantifiziert. Der große Vorteil einer Quantifizierung von radioaktiv markierten Produkten ist die außergewöhnliche Zunahme der Empfindlichkeit und des dynamischen Bereichs auf über 4 Zehnerpotenzen. Etwas schwieriger gestaltet sich die Verwendung von nicht radioaktiv markierten, modifizierten Nucleotiden in der PCR, denn die Amplifikationsreaktion kann durch eine zu hohe Konzentration des modifizierten Nucleotids gehemmt werden (Reischl et al., 1993; Lottspeich und Zorbas, 1998). Schließlich müssen die durch Gelelektrophorese getrennten PCR-Produkte durch Elektroblothing auf Membranen übertragen werden, damit die anschließende Detektion mit einem Chemilumineszenz-Farbstoff erfolgen kann, die ebenfalls mit einem Phosphoimager quantifiziert werden (Zheng et al., 2000).

Eine sehr sensitive Alternative zu den von mir beschriebenen Verfahren der kompetitiven RT-PCR stellt die Quantifizierung von mRNAs mit Hilfe des „Light-Cyclers“ dar (Wittwer et al., 1997). Der Light-Cycler ist ein ultraschneller Cyclus kombiniert mit einem Fluorimeter, das eine Spezialoptik für die Messung von Mikrovolumina benutzt. Die Akkumulation von dsDNA während der PCR wird über die Bindung von SYBR-Green an die entstehende DNA gemessen (Jones et al., 1998; Romppanen et al., 2000). Das Fluoreszenzsignal ist proportional der dsDNA-Konzentration. Die Durchführung von Schmelzkurven erlaubt das amplifizierte PCR-Produkt eindeutig zu identifizieren. Dadurch können Artefakte, die bei unterschiedlicher Temperatur schmelzen, entdeckt werden. Diese Methode ist sicherlich die schnellste und empfindlichste Quantifizierungsmethode von mRNA, hat jedoch den großen Nachteil, wegen der sehr hohen Kosten des Light-Cyclers, auch die teuerste Methode zu sein.

Die kompetitive RT-PCR wurde für die Messung zahlreicher, medizinisch interessanter mRNAs angewendet, z.B. bei der Regulation der P2-Rezeptor mRNA-Expression in glatten Muskelzellen (Erlinge et al., 1998), zur Messung von Metalloproteinase-Genen in menschlichen Mesangial-Zellen (Death et al., 1999), zur Quantifizierung von GABA-Transkripten im Rattenhirn (Fickova et al., 1999) und zur quantitativen Bestimmung der mRNA des natriuretischen Peptids (Iascone et al., 1999). In den meisten Publikationen wird die Bestimmung mit extrahierter Gesamt-RNA aus den entsprechenden Zellen durchgeführt, obwohl Klebe et al. bereits 1996 eine Methode beschrieben hatten, die auf die RNA-Reinigung verzichtete. Offenbar war Klebe's Vorschrift nicht auf andere Zelltypen übertragbar. Erst die Weiterentwicklung dieser Methode durch Hinzufügung

einer Hitze-Inaktivierung von potentiell freigesetzten RNasen in einem Spezialpuffer machte die direkte reverse Transkription im Zell-Lysat möglich. Die Firma Ambion hat ein entsprechendes System auf den Markt gebracht.

Mit diesem System erhielt ich durch kompetitive RT-PCR für die mRNA des ribosomalen S6-Proteins ungefähr 200 Kopien pro Zelle und für die mRNA des Cyclophilins etwa 800 Kopien pro Zelle. Beide mRNAs sind somit in die mittlere Häufigkeitsklasse (s. Tabelle 2 der Einleitung) der exprimierten mRNAs einzuordnen (Getz et al., 1992 und 1993). Entsprechende Vergleichszahlen der beiden mRNAs für Hela-Zellen sind in der Literatur nicht vorhanden. Die Kopienzahl der GAPDH-mRNA wurde von Martorana et al. (1999) in Kulturzellen (BC1 Ratten-Mamma-Carzinom Zell-Linie) mit 571 bestimmt, damit gehört auch GAPDH-mRNA zu den Messengern der mittleren Häufigkeitsklasse. In einer weiteren Publikation wurden in einer fötalen Mäuseleber (Gewicht 2 mg) pro Zelle 300 Kopien Albumin-, ~280 Kopien Transferrin- und ~150 Kopien GAPDH-mRNA-Transkripte bestimmt (Eferl et al., 1997). Andere Bestimmungen konnten zu Vergleichszwecken nicht herangezogen werden, da die Angaben der Kopienanzahl auf  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA oder eingesetztes Zellgewicht bezogen waren.

Die Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese in Eukaryonten beträgt 15 Nucleotide pro Sekunde, d.h. die 750 Nucleotide der S6-mRNA werden in 50 sec in die 249 lange Aminosäuresequenz des S6-Protein translatiert. Die S6-mRNA kann 10 - 25 Ribosomen binden, d.h. pro min könnte eine Hela-Zelle mit 200 S6-Kopien maximal 2400-6000 S6-Proteine synthetisieren. Bei einer Generationszeit der Hela-Zellen von 24 h erhält man durch Multiplikation mit 1440 min (= Tag) etwa  $3.4 \times 10^6$  -  $8.5 \times 10^6$  Ribosomen pro Zelle und Tag. Der von mir erhaltene Wert für die S6-mRNA scheint nach den obigen Abschätzungen im richtigen Bereich zu liegen, wenn man sich die Anzahl der Ribosomen pro Zelle vor Augen hält (Blobel und Potter, 1967; Cooper, 1997; Warner 1999).

Man sollte diesen Wert durch Bestimmung weiterer mRNAs von ribosomalen Proteinen stützen und die Quantifizierung mit einer unabhängigen Methode, z. B. mit Hilfe des Light Cyclers verifizieren. Interessant wäre es mit der von mir verwendeten Methode, markierte cDNAs aller Gene für ribosomale Proteine zu synthetisieren und sie als Sonden in einem DNA-Mikrochip-System einzusetzen.

## 5 Zusammenfassung

Ribosomen sind für das Leben und das Wachstum von Zellen essentiell. Ribosomale Proteine kommen in allen proliferierenden Zellen vor. Sie werden zu den *Housekeeping*-Proteinen gezählt. Die in dieser Arbeit beschriebene Quantifizierung der ribosomalen S6-mRNA durch kompetitive RT-PCR ergab, daß diese mRNA-Spezies genauso wie die als Kontrolle verwendete Cyclophilin-mRNA in die mittlere Häufigkeitsklasse der cytoplasmatischen mRNA-Population eingeordnet werden muß. Pro Zelle wurde eine Kopienzahl von etwa 200 S6-mRNAs und 800 Cyclophilin-mRNA-Molekülen in Hela-Zellen gemessen.

Voraussetzung für diese quantitative Bestimmung war die Konstruktion eines Expressionsvektors, in den ein spezieller T7-Promotor eincloniert wurde. Das relativ kurze T7-Promotor-Fragment wurde durch Oligonucleotid-Synthese kommerziell hergestellt und nach Hybridisierung in einen verkürzten pBluescript KS(-)-Vektor einligiert. Nach erfolgter, positiver Sequenzierung wurde ein S6-Fragment, dessen drei Kernlokalisationsignale deletiert waren, in die Multi-Cloning-Stelle eincloniert. Mithilfe dieses Konstruktes gelang es eine nicht-radioaktive, RNase-resistente Kompetitor-RNA (315 Bp) durch in vitro Transkription herzustellen, die um 36 Nucleotide kürzer war als das entsprechende endogene S6-mRNA-Fragment (351 Bp). Die genaue Menge der in vitro synthetisierten Kompetitor-RNA wurde nach präparativer Trennung auf einem Polyacrylamid-Gel unter Verwendung des Fluoreszenz-Farbstoffes Ribogreen quantitativ bestimmt.

Auf eine Isolierung von Gesamt-RNA bzw mRNA aus Hela-Zellen wurde verzichtet. Die Reverse Transkription wurde direkt mit einem Zell-Extrakt von etwa 2000 Zellen durchgeführt, wobei durch die sehr schnelle Zell-Lyse und gleichzeitige Erwärmung auf 75°C die Degradation der mRNA-Moleküle durch RNasen verhindert wurde.

Durch Variation der Kompetitor-RNA-Menge gelang es eine nahezu gleiche Amplifizierung des endogenen S6-Fragmentes und der um 36 Nucleotide kürzeren Kompetitor-RNA zu erreichen. Die erfolgreiche Auftrennung der RT-PCR-Produkte auf Agarosegelen wurde optisch ausgewertet und aus der eingesetzten, bekannten Anzahl der Kompetitor-Kopien wurde die oben angegebene Kopienzahl der S6- und Cyclophilin mRNAs berechnet.

Die beschriebene Methode sollte sich auch auf menschliche Gewebeproben übertragen lassen.

## 6 Literaturverzeichnis

**Aloni, R., Peleg, D. und Meyuhas, O.** (1992). Selektive translational control and nonspecific posttranslational regulation of ribosomal protein gene expression during development and regeneration of rat liver. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2003-2212.

**Antoine, M. und Fried, M.** (1992). The organization of the intron-containing human S6 ribosomal protein (rpS6) gene and determination of its location at chromosome 9p21. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 565-570.

**Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J.D.** (1995). Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

**Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E. und Tollervey, D.** (1999). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* **18**, 5399-5410.

**Allmang, C., Mitchell, P., Petfalski, E. und Tollervey, D.** (2000). Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic. Acids Res.* **28**, 1684-1691.

**Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K.** (1995). Short protocols in molecular biology. Wiley Inc., New York.

**Aviv, H. und Leder, P.** (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1408-14011.

**Avni, D., Shama, S., Loreni, F. und Meyuhas, O.** (1994). Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells: Characterization of the translational cis-regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3822-3933.

**Aziz, R.B. und Soreq, H.** (1990). Improving poor in vitro transcription from G,C-rich genes. *Nucleic. Acids Res.* **18**, 3418-3427.

**Bauche, A. und Kruppa, J.** (2000). Persönliche Mitteilung.

- Baum, E.Z. und Wormington, W.M.** (1985). Coordinate expression of ribosomal protein genes during *Xenopus* development. *Dev. Biol.* **111**, 488-498.
- Belotserkovskii, B.P. und Johnston, B.H.** (1997). Denaturation and association of DNA sequences by certain polypropylene surfaces. *Anal. Biochem.* **251**, 251-262.
- Bhatia, P., Taylor, W., Greenberg, A. and Wright, J.** (1994). Comparison of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and 28S ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal. Biochem.* **216**, 223-226.
- Blackburn, P., Wilson, G. und Moore, S.** (1977). Ribonuclease inhibitor from human placenta. *J. Biol. Chem.* **252**, 5904-5910.
- Blobel, G. und Potter, V.R.** (1967). Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. I. Distribution as related to total cellular RNA. *J. Mol. Biol.* **26**, 279-292.
- Bousquet-Antonelli, C. Presutti, C. und Tollervey, D.** (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* **102**, 765-775.
- Brookfield, J.F.Y.** (2000). Genomic sequencing: the complexity conundrum. *Curr. Biol.* **10**, 514-515.
- Brown, E.J. und Schreiber, S.L.** (1996). A signaling pathway to translational control. *Cell* **86**, 517-520.
- Celi, F.S., Zenilman, M.E. und Shuldiner, A.R.** (1993). A rapid and versatile method to synthesize internal standard for competitive PCR. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1047-1061.
- Chirgwin, J.M., Prybyla A.E., MacDonald, R.J. und Rutter, W.J.** (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299.

**Chomzynski, P.** (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**, 532-535.

**Chomzynski, P. und Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

**Cooper, G.M.** (1997). The cell: a molecular approach. ASM-Press, Washington

**Danielson, P., Forss-Petter, S., Brow, M., Calvette, L., Douglass, J., Milner, R. und Suttcliffe, J.** (1988). pIBI5: A cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA* **7**, 261-267.

**Darling, D.C. und Brickel, P.M.** (1996). Nukleinsäure-Blotting, Spektrum-Akademischer Verlag Heidelberg.

**Davidson, E.H.** (1986). Gene activity in early development. Academic Press, Orlando.

**Death, A.K., Yue, D.K. und Turtle, J.R.** (1999). Competitive RT-PCR for measuring metalloproteinase gene expression in human mesangial cells exposed to a hyperglycemic environment. *Biotechniques* **27**, 512-520.

**Decker, C.J. und Parker, R.** (1994). Mechanism of mRNA degradation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 336-340.

**Deutscher, MP.** (1993). Ribonuclease multiplicity, diversity, and complexity. *J. Biol. Chem.* **268**, 13011-13014.

**Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S. und Burd, C.G.** (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Ann. Rev. Biochem.* **62**, 289-321.

**Duncan, R. und McConkey, E.H.** (1982). Preferential utilization of phosphorylated 40S ribosomal subunits during initiation complex formation. *Eur. J. Biochem.* **123**, 535-538.



**Eferl, R., Lehner, M., Kenner, L., Kapfer, I., Gürtl, B. und Zatloukal, K.** (1997). Evaluation of different RNA standards for quantitative reverse transcription PCR: possible pitfalls and strategies for avoidance. *Tech. Tips Online* **1**, No. 26.11.1997.

**Erlinge, D., Hou, M., Webb, T.E., Barnard, E.A. und Möller, S.** (1998). Phenotype changes of the vascular smooth muscle cell regulate P2 receptor expression as measured by quantitative RT-PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 864-870.

**Ewing, B. und Green, P.** (2000). Analysis of expressed sequence tags indicates 35.000 human genes. *Nat. Genet.* **25**, 232-234.

**Farrell, R.E.** (1993). RNA methodologies. Academic Press, New York.

**Ferre, F. und Garduno, F.** (1989) Preparation of crude cell extract suitable for amplification of RNA by polymerase chain reaction. *Nucleic. Acids Res.* **17**, 2141-2153.

**Ferre, F., Pezzoli, P. und Buxton, E.** (1996). Quantitation of RNA transcripts using RT-PCR. In *A laboratory guide to RNA: isolation, analysis and synthesis*, (ed.: P.A. Krieg) Willey-Liss, New York, p.175-190.

**Fickova, M., Dahmen, N., Fehr, C. und Hiemke, C.** (1999). Quantitation of GABA transporter 3 (GAT3) mRNA in rat brain by competitive RT-PCR. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **4**, 341-350.

**Fournier, M.J. und Maxwell, E.S.** (1993). The nucleolar snRNAs: catching up with the spliceosomal snRNAs. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 131-135.

**Freeman, W.M., Walker, S.J. und Vrana, K.E.** (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* **26**, 112-125.

**Getz, M.J., Birnie, G.D., Young, B.D., MacPhail, E. und Paul, J.** (1975). A kinetic estimation of base sequence complexity of nuclear poly(A)-containing RNA in mouse Friend cells. *Cell* **4**, 121-129.

**Getz, M.J., Elder, P.K., Benz, E.W., Stephens, R.E. und Moses, H.L.** (1976). Effect of cell proliferation on levels and diversity of poly(A)-containing mRNA. *Cell* **7**, 255-265.

**Haendler, B. und Hofer, E.** (1990). Characterization of the human cyclophilin gene and of related processed pseudogenes. *Eur. J. Biochem.* **190**, 477-482.

**Hämäläinen, M.M., Eskola, J.U., Hellman, J. und Pulkki, K.** (1999). Major interference from leukocytes in reverse transcription-PCR identified neurotoxin ribonuclease from eosinophils: detection of residual chronic myelogenous leukemia from cell lysates by use of an eosinophil-depleted cell preparation. *Clin. Chem.* **45**, 465-471.

**Hadjilov, A.A.** (1985). The nucleolus and ribosome biogenesis. Springer-Verlag, Wien.

**Hastie, N.B. und Bishop, J.O.** (1976). The expression of three abundance classes of mRNA in mouse tissues. *Cell* **9**, 761-774.

**Heinze, H., Arnold, H.H., Fischer, D. und Kruppa, J.** (1988). The primary structure of the human ribosomal protein S6 derived from a cloned cDNA. *J. Biol. Chem.* **263**: 4139-4144.

**Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J.P., Petfalski, E., Kearsley, S. und Tollervey, D.** (1994). The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J.* **13**, 2452-2463.

**Howe, J.G. und Hershey, J.W.** (1984). Translational initiation factor und ribosome association with the cytoskeletal framework fraction from Hela cells. *Cell* **37**, 85-93.

**Huez, G., Marbaix, G., Hubert, E., Leclercq, M., Nudel, U., Soreq, H., Salomon R., Lebleu, B., Revel, M. und Littauer, U.Z.** (1974). Role of polyadenylate segment in the translation of globin messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 3134-3136.

**Iascone, M.R., Vittorini, S., Collavoli, A., Cupelli, A., Kraft, G., Biagini, A. und Clerico, A.** (1999). A rapid procedure for the quantitation of natriuretic peptide RNAs by competitive RT-PCR in congenital heart defects. *J. Endocrinol. Invest.* **22**, 835-842.

**Inghirami, G., Grignani, F., Sternas, L., Lombardi, L., Knowles, D. und Dalla-Favera, R.** (1990). Down-regulation of LFA-I adhesion receptors by c-myc oncogene in human B lymphoblastoid cells. *Science* **250**, 682-685.

**Jeffries, H.B.J., Reinhard, C., Kozma, S.C. und Thomas, G.** (1994). Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNAs family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4441-4445.

**Jeffries, H.B.J. und Thomas, G.** (1996). Ribosomal protein S6 phosphorylation and signal transduction. In: Translational control, (eds.: Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. und Sonenberg, N.) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Jones, L.J., Yue, S.T., Cheung, C.-Y. und Singer, V.L.** (1998). RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: Ribogreen reagent characterization. *Anal. Biochem.* **265**, 368-374.

**Kain, K.C., Orlandi, P.A. und Lanar, D.E.** (1991). Universal promotor for gene expression without cloning: expression-PCR. *Biotechniques* **10**, 366-373.

**Kass, S., Tyc, K., Steitz, J.A. und Sollner-Webb, B.** (1990). The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* **60**, 897-908.

**Kawasaki, E.S., Clark, S.S., Coyne, M.Y., Smith, S.D., Champlin, R., Witte, O.N. und McCormick, F.P.** (1988). Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5698-5702.

**Kay, M.A. und Jacobs-Lorena, M.** (1985). Selective translational regulation of ribosomal protein gene expression during early development of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3583-3592.

**Kennedy, I.M., Burdon, R.H. und Leader, D.P.** (1984). Heat shock causes diverse changes in the phosphorylation of the ribosomal proteins of mammalian cells. *FEBS Lett.* **169**, 267-273.

**Klebe, R.J., Grant, G.M., Grant, A.M., Gracia, M.A., Giambernardi, T.A. und Taylor, G.P.** (1996). RT-PCR without RNA isolation. *Biotechniques* **21**, 1094-1100.

**Knippers, R.** (1995). Molekulare Genetik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

**Krieg, P.A.** (1996). A laboratory guide to RNA. Wiley-Liss, New York.

**Kruppa, J. und Clemens, M.** (1984). Differential kinetics of changes in the state of phosphorylation of ribosomal protein S6 and in the rate of protein synthesis in MPC 11 cells during tonicity shifts. *EMBO J.* **3**, 95-100.

**Kundu-Michalik, S.** (1997). Nucleolusbindende Domänen im humanen ribosomalen S6-Protein. Dissertation, Universität Hamburg.

**Lenk, R., Ransom, L., Kaufmann, Y. und Penman, S.** (1977). A cytoskeletal structure with associated polyribosomes obtained from HeLa cells. *Cell* **10**, 67-78.

**Lewin, B.** (1975). Units of transcription and translation: sequence components of hnRNA und mRNA. *Cell* **4**, 77-93.

**Lewin, B.** (2000) Genes VII, Oxford University Press, Oxford.

**Lipsius, E.** (1998). Nuclearer Import und nucleolare Akkumulation des ribosomalen S6-Proteins. Dissertation, Universität Hamburg.

- Long, E.O. und David, I.B.** (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 727-764.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S., Matsudaira, P., Baltimore, D. und Darnell, J.** (2000). *Molecular Cell Biology*, W.H. Freeman and Company, New York.
- Lottspeich, F. und Zorbas, H.** (1998). *Bioanalytik*, Spektrum Akademische Verlag Heidelberg.
- Mager, W.H.** (1988). Control of ribosomal gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* **949**, 1-15.
- Marbaix, G., Huez, G., Burny, A., Cleuter, Y., Hubert, E., Leclercq, M., Chantrenne, H., Soreq, H., Nudel, U. und Littauer, U.Z.** (1975). Absence of polyadenylate segment in globin messenger RNA accelerates its degradation in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3065-3067.
- Martin, K. und Pardee, A.B.** (1999). Principles of differential display. *Meth. Enzym.* **303**, 234-259.
- Martorana, A.M., Zheng, G., Springall, F., Iland, H.J., O'Grady, R.L. und Lyons, J.G.** (1999). Absolute quantitation of specific mRNAs in cell and tissue samples by comparative PCR. *Biotechniques* **27**, 136-144.
- Matz, M. und Lukyanov, S.A.** (1998). Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic. Acids Res.* **26**, 5537-5543.
- Melefors, Ö. und Hentze, M.W.** (1993). Translational regulation by mRNA/protein interactions in eukaryotic cells: ferritin and beyond. *BioEssays* **15**, 85-90.
- Mélèse, T. und Xue, Z.** (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 319-324.

- Mensink, E., von de Locht, A., Schattenberg, A., Linders, E., Schaap, N., Geurts van Kessel, A. und de Witte, T.** (1998). Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br. J. Haematol.* **102**, 768-774.
- Menzo, S., Bannarelli, P., Giacca, M., Manzin, A., Varaldo, P.E. und Clementi, M.** (1992). Absolute quantitation of viremia in human immunodeficiency virus infection by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1752-1757.
- Meyuhas, O., Baldin, V., Bouche, G. und Almaric, F.** (1990). Glucocorticoids repress ribosome biosynthesis in lymphsarcoma cells by affecting gene expression at the level of transcription, posttranscription and translation. *Biochim. Biophys. Acta* **1049**, 38-44.
- Meyuhas, O., Avni, D. und Shama, S.** (1996). Translational control of ribosomal protein mRNA in eukaryotes. In: Translational control, (eds.: Hershey, J:W:B., Matthews, M.B. und Sonenberg, N) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Michael, W.M. und Dreyfuss, G.** (1996). Distinct domains in ribosomal protein L5 mediate 5S rRNA binding and nucleolar localization. *J. Biol. Chem.* **271**, 11571-11574.
- Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W. und Uhlenbeck, O.C.** (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA template. *Nucl. Acids Res.* **15**, 8783-8798.
- Mtchell, P. und Tollervey, D.** (2000). mRNA stability in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 193-198.
- Mullis, K.B.** (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* **162**, 56-65.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Meth. Enzymol.* **55**, 335-350.

**Myers, T.W, und Gelfand, D.H.** (1991). Reverse transcription and DNA amplification by *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*, **30**, 7661-7666.

**Nolte, D., Taimor, G., Kalff-Suske, M. und Seifart, K.H.** (1996). The human S3a ribosomal protein: sequence, location and cell-free transcription of the functional gene. *Gene* **169**, 179-185.

**Nomura, M.** (1973). Assembly of bacterial ribosomes. *Science* **179**, 864-873.

**O'Brien, D.P., Billadeau, D. und Van Ness, B.** (1994). RT-PCR assay for detection of transcripts from very few cells using whole cell lysates. *Biotechniques* **16**, 586-590.

**Okamoto, R., Harano, H., Matsuzaki, M., Motomura, S., Maruta, A., Kodama, F., Mohri, H. und Okuba, T.**(1995). Predicting relapse of chronic myelogenous leukemia after allogenic bone marrow transplantation by BCR/ABL mRNA and fingerprinting. *Am. J. Clin. Pathol.* **104**, 510-516.

**O'Leary, T.J.** (1999). Reducing the impact of endogenous ribonucleases on reverse transcription-PCR assay systems. *Clin. Chem.* **45**, 449-450.

**Pallansch, L., Beswick, H., Talian, J. und Zelenka, P.** (1990). Use of an RNA folding algorithm to choose regions for amplification by polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **185**, 57-62.

**Pata, L., Hoth, S., Kruppa, J. und Metspalu, A.** (1992)

The human ribosomal protein S6 gene: isolation, primary structure and location in chromosome 9. *Gene* **121**, 387-392; *Gene* **127** (1993) 275-276.

**Pennisi, E.** (2000). And the gene number is...? *Science* **288**, 1146-1147.

**Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. und White, T.J.** (1993). Molecular microbiology: Principles and applications, ASM, Washington

**Pierandrei-Amaldi, P., Campioni, N., Beccari, E., Bozzoni, I. und Amaldi, F.** (1982). Expression of ribosomal protein genes in *Xenopus laevis* development. *Cell* **30**, 163-171.

**Powell, L.M.** (1990). RNA-Processing: Apo-B. In: PCR-Protocols : A guide to methods and applications. (eds.: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J.) Academic Press, San Diego.

**Price, D.J., Grove, J.R., Calvo, V., Avruch, J. und Bierer, B.E.** (1992). Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* **257**, 973-977.

**Reischl, U., Ruger, R. und Kessler, C.** (1993). Nonradioactive labeling of polymerase chain reaction products, p.51-62. In: PCR Protocols (ed.: White, B.A.), Humana Press, Totowa, New Jersey.

**Rolfs., A., Schuller, I., Finckh, U. und Weber-Rolfs, I.** (1992). PCR: Clinical diagnostics and research. Springer Verlag, Berlin.

**Romppanen, E.-L., Savolainen, K. und Mononen, I.** (2000). Optimal use of fluorescent Picogreen dye for quantitative analysis of amplified polymerase chain reaction products on microplate. *Anal. Biochem.* **279**, 111-114.

**Ross, J.** (1996). Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes. *Trends Genet.* **12**, 171-175.

**Rudt, F. und Pieler, T.** (1996). Cytoplasmatic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs. *EMBO J.* **15**: 1383-1391.

**Sachs, A.B.** (1993). Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* **74**, 413-421.

**Sambrook, J., Fritsche, E.F. und Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

**Schenborn, E.T. und Meirendorf, R.C.** (1985). A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res.* **13**, 6223-6236.

**Schmidt, C.** (1992). Nucleocytoplasmatischer Transport des ribosomalen S6-Proteins. Dissertation, Universitat Hamburg.



**Schmidt, C., Lipsius, E. und Kruppa, J.** (1995). Nuclear and nucleolar targeting of human ribosomal protein S6. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1875-1885.

**Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F. und Zeillinger, R.** (1995). Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods and Applications* **4**, 234-238.

**Schümperli, D.** (1988). Multilevel regulation of replication-dependent histone genes. *Trends Genet.* **4**, 187-191.

**Shama, S., Avni, D., Fredrickson, R.M., Sonenberg, N. und Meyuhas, O.** (1995). Overexpression of initiation factor eIF-4E does not relieve the translational repression of ribosomal protein mRNAs in quiescent cells. *Gene Expr.* **4**, 241-252.

**Shaw, P.J. und Jordan, E.G.** (1995). The nucleolus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**: 93-12.

Souazé, F., Ntodou-Thomé, A., Tran, C.Y., Rostène, W. und Forgez, P. (1996). **Quantitative RT-PCR limits and accuracy.** *Biotechniques* **21**, 280-285.

**Steel, L.F. und Jacobson, A.** (1991). Sequence elements that affect mRNA translational activity in developing Dictostelium cells. *Dev. Genet.* **12**, 98-103.

**Stollberg, J., Urschitz, J., Urban, Z. und Boyd, C.D.** (2000). A quantitative evaluation of SAGE. *Genome Res.* **10**, 1241-1248.

**Su, S., Vivier, R.G., Dickson, M.C., Thomas, N., Kendrick, M.K., Williamson, N.M., Anson, J.G., Houston, J.G. und Craig, F.F.** (1997). High-throughput RT-PCR analysis of multiple transcripts using microplate RNA isolation procedure. *Biotechniques* **22**, 1107-1113.

**Sumida, A., Yamamoto, I., Zhou, Q., Morisaki, T. und Azuma J.** (1999). Evaluation of induction of CYP3A mRNA using HepG2 cell line and reverse transcription-PCR. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 61-65.

**Thomas, G., Martin-Perez, J., Siegmann, M. und Otto, A.M.** (1982). The effect of serum, EGF, PGF2a and insulin on S6 phosphorylation und the initiation of protein and DNA synthesis. *Cell* **30**: 235-242.

**Todorov, I.T., Noll, F. und Hadjiolov, A.A.** (1983). The sequential addition of ribosomal proteins during the formation of the small ribosomal subunit in Friend erythroleukemia cells. *Eur. J. Biochem.* **131**: 271-275.

**Tollervey, D. und Caceres, J.F.** (2000). RNA processing marches on. *Cell* **103**, 703-709.

**Tollervey, D. und Kiss, T.** (1997). Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 337-342.

**Traugh, J.A. und Pendergast, A.M.** (1986). Regulation of protein synthesis by phosphorylation of ribosomal protein S6 and aminoacyl-tRNA synthetases. *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.* **33**, 195-230.

**Tuma, R.S., Beaudet, M.P., Jin, X., Jones, L.J., Cheung, C.-Y., Yue, S. und Singer, V.L.** (1999). Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300 nm ultraviolet transilluminators. *Anal. Biochem.* **268**, 278-288.

**Warner, J.R.** (1989). Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Rev.* **53**, 256-271.

**Warner, J.R.** (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 437-440.

**Watson, K.L., Konrad, K.D., Woods, D.F. und Bryant, P.J.** (1992). Drosophila homolog of the human S6 ribosomal protein is required for tumor suppression in the hematopoietic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11302-11306.

**White, B.A.** (1993). PCR protocols. Humana Press. Totowa, New Jersey.

**Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. und Rasmussen, R.P.** (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplifications. *Biotechniques* **22**, 130-138.

**Wool, I.G., Chan, Y.L. und Glück, A.** (1996). Mammalian ribosomes: The structure and evolution of proteins. In: Translational control, (eds.: Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. und Sonenberg, N.) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Xue, Z. und Mélése, T.** (1994). Nucleolar proteins that bind NLSs: a role in nuclear import or ribosome biogenesis? *Trends Cell Biol.* **4**: 414-417.

**Zale, S.E. und Klibanov, A.M.** (1986). Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures? *Biochemistry* **25**, 5432-5444.

**Zheng, H., Yan, W., Toppari, J. und Härkönen, P.** (2000). Improved nonradioactive RT-PCR method for relative quantification of mRNA. *Biotechniques* **28**, 832-834.

**Zimmermann, K. und Mannhalter, J.W.** (1996). Technical aspects of quantitative competitive PCR. *Biotechniques* **21**, 268-279.

## 7 Anhang

### Verwendete Primer

#### S6-Primer:

5'-CTG GGC CCA AAA AGA GCT AG-3'

5'-TTT CTG ACT GGA TTC AGA CTT AG-3'

#### S3a-Primer:

5'-GAC TTG AAA GAA GTG GTC AAT AAA-3'

5'-AAC AGA TTC TTG GAC TGG TGG-3'

#### T7-Promotor:

5'-GGC GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG GAG GAG CT-3'

5'-CTG CAG GAA TTC GTG GCT GAT TAT GAT CAG-3'

#### Kompetitor-Primer:

**Comp-1:** 5'-CCC GGG GGA TCC CTG ATA CTA CAG TGC C-3'

**Comp-2:** 5'-CTG CAG GAA TTC GTG GCT GAT TAT GAT CAG-3'

### DNA-Molekulargewichtsmarker

**pUC19/Hpa II** Verdau, dsDNA-Marker (Ambion) mit folgenden Banden:

501, 489, 404, 331, 222, 190, 147, 111, 110, 67, 34.

**Marker III:**  $\lambda$ -DNA geschnitten mit Eco RI und Hind III, 500 ng/ $\mu$ l (Appligene), mit folgenden Banden:

21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2927, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125

**100 bp-DNA-Leiter:** 500 ng/ $\mu$ l (NEB), mit folgenden Banden:

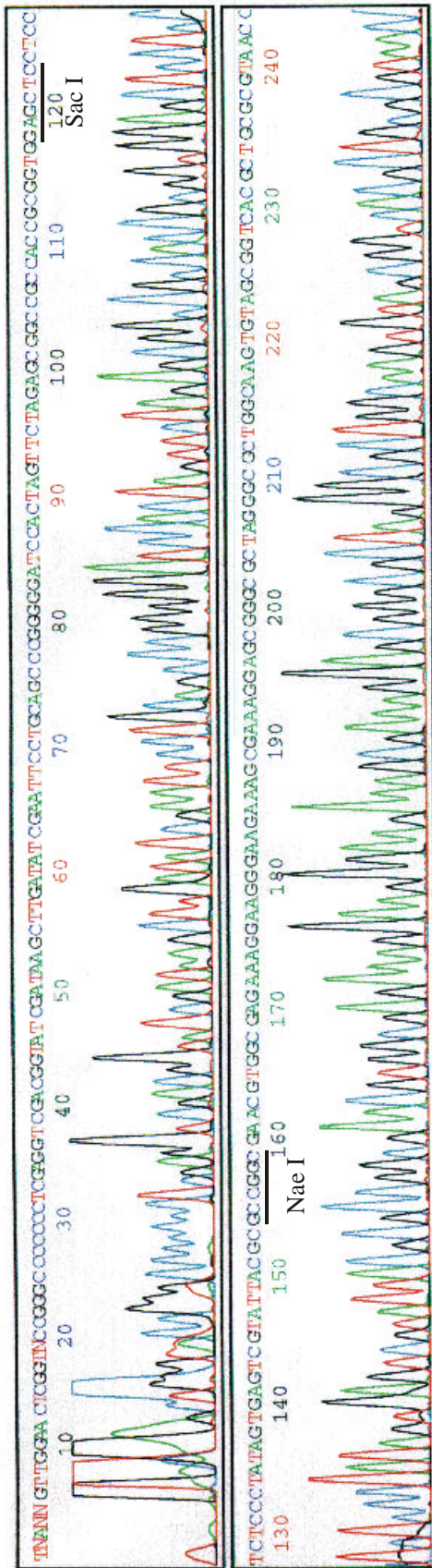
1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.

#### Kontrolle für die T7-Transkription:

pTRIamp18-Cyclophilin (del) DNA, 0.5  $\mu$ g/ml; 195 Bp langes Maus-Cyclophilin-Fragment unter T7-Promotor-Kontrolle in der Sinn-Orientierung (Ambion).

#### Kontrolle für RT-PCR:

Armored RNA-Kompetitor,  $1 \times 10^9$  Kopien/ $\mu$ l: Fragment aus Maus-Cyclophilin-Gen mit einer Deletion von 20 Nucleotiden, enthält am 3'-Ende Poly(A)-Sequenz (Ambion).



**Sequenzierung des pBS II KS(-) T7AMB-Plasmids.**

Dargestellt ist die Sequenz des inklonierten T7-Promotors zwischen den Restriktionsstellen Nae I und Sac I

## 8 Danksagung

Mein besonderer herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Joachim Kruppa für die interessante Aufgabenstellung. Er hat mich bei meiner Arbeit die ganze Zeit hervorragend betreut. Ebenfalls danke ich seiner Frau Dr. Antonie Kruppa, die mir oft Mut zugesprochen hat. Beide haben mich in vieler Hinsicht unterstützt und an meinen Erfolg geglaubt.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Andreas Bauche, Dr. Edgar Lipsius, Thomas Klokow und Anette Rosche für deren Einweisung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken und für die vielseitigen Ratschläge bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Edgar Lipsius für seine permanente Hilfsbereitschaft.

Ebenso gilt mein sehr herzlicher Dank den Gutachter für die zügige Begutachtung meiner Arbeit.

Besonders bei den Familien Siginakel und Karakas möchte ich mich für deren finanzielle und moralische Unterstützung ganz herzlich bedanken, aber auch bei den anderen Familien und Personen, die namentlich nicht erwähnt wurden.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau, die mit vier kleinen Kindern die größte Last während dieser Arbeit zu ertragen hatte und somit mir vieles erleichtert hat.

## 9 Lebenslauf

Name: Amil Haji-Younes  
Geburtsdatum: 30.10.67  
Geburtsort: Amouda/Syrien  
Familienstand : verheiratet  
Staatsangehörigkeit: syrisch

### Schulbildung

173-1978 Grundschohle  
1978-1981 Mittelschohle  
1981-1985 Gymnasium

### Berufsausbildung

1985-1987 Sprachenschule (deutsch) in Hannover  
1987-1988 Vorbereitungsjahr für das Medizinstudium in Hamburg  
1989-1997 Medizinstudium an der Universität Hamburg  
Mai-August 1995 Praktisches Jahr in der Augenklinik des UKE/Hamburg  
August-Dezember 1995 Praktisches Jahr in der Medizinischen Klinik des UKE/Hamburg  
August-September 1996 Praktisches Jahr in der Chirurgischen Klinik des UKE/Hamburg

### Auslandserfahrung/Fortbildung

März-Juni 1996 Praktisches Jahr in der Chirurgischen Abteilung des  
Nationalkrankenhause in der Stadt Kamischli/Syrien  
November 1995 Trainingskurs „Hospital und Labor unter einfachen Bedingungen“,  
Würzburg  
1998-1999 Ultraschall-Diagnostik (Grundkurs), Hamburg  
November-Dezember 1999 EKG-Grundkurs, Hamburg

**Berufspraxis**

Mai 98-Januar 99	Arzt im Praktikum in Dialyse und Urologie, Praxis Dr. Fellenberg/ Dr. Glaser, Hamburg
Februar 99-Januar 00	Arzt im Praktikum in Allgemeinmedizin, Praxis Dr.Bauer/Dr. D. Holthusen, Hamburg
1989-1993	Beschäftigung im Pflegebereich als Sitzwache/Nachtwache im AK Wandsbek, Hamburg
1993-1997	Beschäftigung im Pflegebereich als Studentische Hilfskraft, UKE/Hamburg



## **10 Erklärung**

Hiermit versichere ich, Amil Haji-Younes, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt und andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet habe. Die den benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht, und die Inanspruchnahme persönlicher Hilfe habe ich namentlich aufgeführt.

Amil Haji-Younes

Hamburg, den 02.01.01