

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.